

ELOIZA DE REZENDE

ESTUDO DO EFEITO DE BISFOSFONATOS NAS CÉLULAS CLÁSTICAS DURANTE A
OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA DO JOELHO DE RATOS E EM CULTURA PRIMÁRIA:
ABORDAGENS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

ELOIZA DE REZENDE

ESTUDO DO EFEITO DE BISFOSFONATOS NAS CÉLULAS CLÁSTICAS DURANTE A
OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA DO JOELHO DE RATOS E EM CULTURA PRIMÁRIA:
ABORDAGENS MORFOLÓGICAS E MOLECULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Victor Elias Arana Chavez

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD);

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rezende, Eloiza de.

Estudo do efeito de bisfosfonatos nas células clásticas durante a ossificação endocondral do joelho de ratos e em cultura primária: abordagens morfológicas e moleculares / Eloiza de Rezende. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia óssea.

Versão do título para o inglês: Study of bisphosphonate effects on clastic cells during endochondral ossification in the rat knee and in primary cultures: morphological and molecular approaches.

1. Ossificação endocondral 2. Osteoclasto 3. Osteoblasto
4. Bisfosfonatos 5. Alendronato 6. Etidronato I. Arana-Chavez,
Prof. Dr. Victor Elias II. Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0184/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eloiza de Rezende.

Título da Tese: Estudo do efeito de bisfosfonatos nas células clásticas durante a ossificação endocondral do joelho de ratos e em cultura primária: abordagens morfológicas e moleculares.

Orientador(a): Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez.

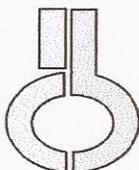
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **062** nas fls. **88** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Victor Elias Arana-Chavez, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo "in vivo" e em culturas primárias do efeito de bisfosfonatos nas células clásticas durante a ossificação endocondral de joelhos de ratos** do qual participou(aram) o(s) **Eloíza de Resende, Vivian Bradaschia Correa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **30.06.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 30 de junho de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

Aos meus pais, Luiz e Verginia, meus irmãos Mônica e Leonardo, sobrinhos Felipe, Thales e Helena e ao companheiro e amigo que escolhi para dividir os dias e os sonhos, Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Orientador Prof. Dr. Victor Elias Arana Chavez por acreditar no meu potencial, me incluir em seu grupo de pesquisa, pela oportunidade de aprendizado diário em seu laboratório, pela paciência, conselhos, conhecimentos compartilhados, por toda dedicação depositada durante estes anos e por ser o grande responsável pela realização de um grande sonho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Processo FAPESP: 2010/07509-8), fundamental para a execução deste projeto.

Aos colegas de laboratório Claudia, Daniela, Fê Yamamoto, Giovana, Lorraine Lourdes Vanesa, Luana, Lucas (Mascotão!!!), Mariana, Natasha, Tais, Tatiani, Viviam e aos colegas que estão em outros países Imaculada e Berenice, por todo aprendizado, conhecimentos compartilhados e afagos.

Aos colegas que fiz na Faculdade de Odontologia Feitosa, Milton, Guilherme, Daniel, Flavia, Daniele, Cintia, Ana, Felipe, Juliana, Cibele, às secretárias Edilene, Rosinha e Elidamar, ao técnico Douglas e aos professores Alyne e Fernando.

Agradeço a todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, em especial às secretárias Ana Lúcia, Eloise, Celiana e Regina pela ajuda, amizade e conselhos e a todos os funcionários do ICB, por serem sempre cordiais e prestativos.

Aos professores Glaucia Machado Santelli e Fabio Siviero, por serem a minha casa no ICB, por todos os equipamentos e conhecimentos compartilhados, aos pós-graduandos, estagiários e técnicos destes dois grandes grupos, obrigada por todo o auxílio e em especial à Paula Rezende por todas as “corridas” cedidas nos finais de semana.

Aos funcionários da Biblioteca que sempre conseguiram os artigos essenciais e que não estavam disponíveis no PubMed, pela revisão da tese e por sempre terem um sorriso simpático.

Agradeço aos colegas que participaram da realização de um sonho e grande projeto o I Curso de Verão em Biologia Celular e do Desenvolvimento Tatiani, Lázaro,

Rodolfo, Felipe e ao Prof. Fábio por apoiar nossas ideias e loucuras. Aos colegas que deram continuidade ao projeto no II Curso de Verão em Biologia Celular e do Desenvolvimento e aos colegas que não deixarão que o projeto se extinga.

Agradeço ao prof. Fábio por ser antes de um excelente docente, um amigo incondicional que sempre pôde me ouvir, ajudou a traçar rumos para a conclusão de meus sonhos e objetivos, por ter sido perseverante e conseguido que nosso livro fosse editado e lançado com muito sucesso e “glamour”.

A todos os grandes amigos que fiz no doutorado Fábio Feitosa, Lu Dзки, Poliana, Andrews, Felipe, Fernanda Ortis e Jonatas e aos que nunca me abandonaram desde o mestrado César, Marley, Paola, e Tati muito obrigada pela força, papos, risadas, protocolos e principalmente pela amizade, sempre terá um lugar do lado esquerdo do peito para cada um de vocês.

Aos meus pais, Luiz e Verginia, pelo carinho, confiança, incentivo, amor e por apoiarem todas as minhas decisões; em especial a minha mãe, por ser meu porto seguro, confidente, companheira e por me ensinar que sem sonho não há vida. Aos Tios, primos e avós (em qualquer plano que vocês estejam) muito obrigada por ajudarem a me tornar quem sou.

Aos meus irmãos Mônica e Leonardo por terem sonhado comigo e serem parte fundamental da minha vida! Obrigada por encherem a minha vida de alegria e amor, trazendo ao mundo as joias mais preciosas que tenho Felipe, Thales e Helena. E aos irmãos que a vida me deu a chance de escolher, Fernanda Almeida, Tatiani Donato, Daniela Oliveira, Renata Rebizzi, Felipe Cavaliere, Felipe Daltoé, Juliana Santarossa, Camila Hissnauer, Thiago Lopes, Karla Rezende, obrigada por existirem.

Ao namorado, amigo e companheiro Gustavo que tive a graça de conhecer no começo desta jornada, apoiou meus sonhos e principalmente sempre me deu forças, conselhos, carinho e incentivo para lutar pelos meus ideias, os dias ao seu lado têm sido os melhores da minha vida!

É necessário ter o caos cá dentro para gerar uma estrela.

“Friedrich Nietzsche”

A força não provém da capacidade física. Provém de uma vontade indomável.

“Mahatma Gandhi”

RESUMO

REZENDE, E. **Estudo do efeito de bisfosfonatos nas células clásticas durante a ossificação endocondral do joelho de ratos e em cultura primária:** abordagens morfológicas e moleculares. 2013. 130 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As células clásticas são essenciais durante os períodos iniciais da ossificação endocondral, para que ocorra a reabsorção dos remanescentes de cartilagem seguida de formação do osso pelos osteoblastos. Os bisfosfonatos são drogas amplamente utilizadas em diversas desordens osteometabólicas, incluindo as que acometem indivíduos em fase de crescimento. Sabe-se que estas drogas atuam principalmente inibindo a ação dos osteoclastos. O presente estudo avaliou o efeito de dois tipos de bisfosfonatos, alendronato e etidronato, durante o desenvolvimento endocondral de ratos com 21 dias (modelo *in vivo*) e na cultura primária de células clásticas (modelo *in vitro*). As epífises dos fêmures e tíbias dos animais foram radiografadas, analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). Cortes histológicos foram realizados e corados com H-E, Tricrômico de Mallory ou histoquímica para TRAP. Além disso, foram extraídos RNA para análise gênica por PRC-*Real Time* de genes relacionados ao ciclo celular, à apoptose, ao complexo mediado por $Nf\kappa\beta$ e à osteogênese, bem como proteínas para análise proteica por Western Blotting de RANK, RANKL e OPG. O efeito destas drogas também foi avaliado em cultura primária derivada da medula óssea de ratos com a mesma idade e extraídos RNA para análise gênica por PRC-*Real Time* dos mesmos genes mencionados acima e proteína para análise proteica por Western Blotting de membros ligados à osteoclastogênese. Durante o tratamento com etidronato foi notado menor ganho de peso em relação aos demais grupos; as análises radiográficas também mostraram diferença entre os grupos. A microscopia de luz revelou que a lâmina epifiseal destes animais apareceu desorganizada e com extensa área de cartilagem na zona de ossificação, com pouca matriz óssea. As análises de MEV mostraram pouco osso trabecular com lacunas de reabsorção nos animais tratados com etidronato, enquanto nos animais que receberam alendronato estas lacunas não foram observadas. O grupo alendronato apresentou numerosas células TRAP-positivas latentes, dados confirmados por MET. As células clásticas do grupo etidronato apresentaram características de intensa atividade, diferente dos osteoblastos que eram fusiformes. A análise da expressão gênica mostrou que os bisfosfonatos diminuem a expressão de todos os genes analisados no modelo *in vivo*, enquanto no modelo *in vitro* o alendronato aumenta a expressão de genes relacionados com ciclo celular, apoptose, e diminuindo somente a expressão de Runx2, que também se encontra menos expresso no grupo tratado com etidronato, assim como o gene de Spp1, que também está relacionado à osteogênese. A expressão proteica variou entre os grupos. Os resultados indicam que o tratamento com alendronato é o mais potente em inibir a ação dos osteoclastos enquanto o etidronato atua mais intensamente sobre os osteoblastos.

Palavras-chave: Ossificação endocondral. Osteoclastos. Osteoblastos. Bisfosfonatos. Alendronato. Etidronato.

ABSTRACT

REZENDE, E. **Study of bisphosphonate effects in clastic cells during endochondral ossification in the rat knee and in primary culture:** morphological and molecular approaches. 2013. 130 p. Ph. D. thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The clastic cells are essential during the initial endochondral ossification, which occurs for the reabsorption of the remaining cartilage followed by bone formation by osteoblasts. Bisphosphonates are drugs widely used in various metabolic bone disorders, including those that affect individuals in the growth phase. It is known that these drugs act primarily by inhibiting the action of osteoclasts. The present study evaluated the effect of different bisphosphonates, alendronate and etidronate during development endochondral of 21-day-old rats (*in vivo* model) and in primary cultures of clastic cells (*in vitro* model). The epiphyses of the femurs and tibias of the animals were x-rayed, analyzed by scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy. Sections were made and stained with H-E, Mallory Trichrome or TRAP histochemistry. Moreover, RNA for gene analysis by PRC-Real Time of genes related to cell cycle, apoptosis, mediated by the complex $Nf\kappa\beta$ and osteogenesis, as well as protein for proteic analysis by Western blotting for RANK, RANKL and OPG were extracted. The effect of these drugs was also assessed in primary culture derived from bone marrow of rats at the same age and RNA extracted for gene analysis by PCR Real-Time of the same genes mentioned above; the protein to proteic analysis by Western blotting members connected to osteoclastogenesis. During treatment with etidronate less weight gain compared to other groups was noticed; radiographic analyzes also showed differences. Light microscopy revealed that these animals showed epiphyseal plate and disorganized with large area of cartilage in the ossification zone with few bone matrix. SEM analyzes showed few bone trabeculae with resorption lacunae in animals treated with etidronate, while the animals that received alendronate they were not observed. The alendronate group showed numerous TRAP-positive latent cells, data confirmed by TEM. Clastic cells in etidronate group showed characteristics of intense activity, but osteoblasts were fusiform. The gene expression analysis showed that bisphosphonates decrease the expression of all genes analyzed *in vivo* model, while in the *in vitro* model alendronate increases the expression of genes related to cell cycle, apoptosis, while decreasing the expression of Runx2, which expression is also less than in the etidronate-treated group, as well as the gene of SPP1 that is also related to osteogenesis. Protein expression varied among the groups. The results indicate that treatment with alendronate is more potent for inhibiting the clastic function, while etidronate acts more intensely on osteoblasts.

Keywords: Endochondral ossification. Osteoclasts. Osteoblasts. Bisphosphonates. Alendronate. Etidronate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema mostrando o recrutamento e mecanismos de ativação das células clásticas.....	29
Figura 2: Esquema de osteoclasto reabsorvendo matriz óssea.....	30
Figura 3. Visão geral do desenvolvimento de um osso por ossificação endocondral.....	36
Figura 4. Comparação entre estruturas químicas.....	38
Figura 5. Gel representativo de PCR convencional dos <i>primers</i> de estudo.....	48
Figura 6. Eficiência de β -Tubulina.....	50
Figura 7. Eficiência de Gapdh.....	51
Figura 8. Eficiência de Ppia.....	52
Figura 9. Eficiência de Rpl19.....	52
Figura 10. Eficiência de α -Actina.....	53
Figura 11. Teste de endógenos para RNA extraído do tecido de animais tratados ou não com bisfosfonatos.....	54
Figura 12. Eficiência de Mad211.....	58
Figura 13. Eficiência de Cdk4.....	58
Figura 14. Eficiência de Mapk3.....	59
Figura 15. Eficiência de Smad3.....	59
Figura 16. Eficiência de Mdm2.....	60
Figura 17. Eficiência de Casp3.....	60
Figura 18. Eficiência de p53.....	61
Figura 19. Eficiência de Myc.....	61
Figura 20. Eficiência de Nf κ 1.....	62
Figura 21. Eficiência de Nf κ 2.....	62
Figura 22. Eficiência de Runx2.....	63
Figura 23. Eficiência de Spp1.....	63
Figura 24. Eficiência de Rank.....	64
Figura 25. Eficiência de Rankl.....	64
Figura 26. Eficiência de Opg.....	65
Figura 27. Teste de endógenos para RNA extraído da cultura de células tratadas ou não com bisfosfonatos.....	70

Figura 28. Variação de peso dos animais durante o tratamento com bisfosfonatos.....	73
Figura 29. Radiografia do joelho de ratos.....	74
Figura 30. Lamina epifiseal.....	75
Figura 31. Histologia da zona de ossificação.....	76
Figura 32. Zona de ossificação mineralizada.....	78
Figura 33. Histoquímica para fosfatase ácido-resistente.....	80
Figura 34. Contagem de células TRAP-positivas.....	82
Figura 35 Microscopia eletrônica de transmissão mostrando detalhes ultraestruturais da ossificação endocondral.....	84
Figura 36. Expressão gênica de Caspase3 <i>in vivo</i>	86
Figura 37. Expressão gênica de Mdm2 <i>in vivo</i>	86
Figura 38. Expressão gênica de P53 <i>in vivo</i>	87
Figura 39. Expressão gênica de Myc <i>in vivo</i>	87
Figura 40. Expressão gênica de Cdk4 <i>in vivo</i>	88
Figura 41. Expressão gênica de Mad211 <i>in vivo</i>	89
Figura 42. Expressão gênica de Mapk3 <i>in vivo</i>	89
Figura 43. Expressão gênica de Smad3 <i>in vivo</i>	90
Figura 44. Expressão gênica de Nfκβ1 <i>in vivo</i>	91
Figura 45. Expressão gênica de Nfκβ2 <i>in vivo</i>	91
Figura 46. Expressão gênica de Runx2 <i>in vivo</i>	92
Figura 47. Expressão gênica de Spp1 <i>in vivo</i>	93
Figura 48. Expressão proteica relativa de proteínas envolvidas na osteoclastogênese <i>in vivo</i>	94
Figura 49. Expressão gênica de Rank <i>in vivo</i>	95
Figura 50. Expressão gênica de Rankl <i>in vivo</i>	95
Figura 51. Expressão gênica de OPG <i>in vivo</i>	96
Figura 52. Cultura primária de Osteoclastos com histoquímica para fosfatase ácido tártaro resistente (TRAP).....	97
Figura 53. Viabilidade celular.....	99
Figura 54. Expressão gênica de Caspase 3 <i>in vitro</i>	100
Figura 55. Expressão gênica de Myc <i>in vitro</i>	101
Figura 56. Expressão gênica de Mdm2 <i>in vitro</i>	101

Figura 57. Expressão gênica de p53 <i>in vitro</i>	102
Figura 58. Expressão gênica de Cdk4 <i>in vitro</i>	103
Figura 59. Expressão gênica de Mad211 <i>in vitro</i>	103
Figura 60. Expressão gênica de Mapk3 <i>in vitro</i>	104
Figura 61. Expressão gênica de Smad3 <i>in vitro</i>	104
Figura 62. Expressão gênica de Nfκβ1 <i>in vitro</i>	105
Figura 63. Expressão gênica de Nfκβ2 <i>in vitro</i>	105
Figura 64. Expressão gênica de Runx2 <i>in vitro</i>	106
Figura 65. Expressão gênica de Spp1 <i>in vitro</i>	107
Figura 66. Expressão proteica relativa de proteínas envolvidas na osteoclastogênese em cultura primária de células tratadas ou não com bisfosfonatos.....	108
Figura 67. Expressão gênica de Rank <i>in vitro</i>	109
Figura 68. Expressão gênica de Rankl <i>in vitro</i>	109
Figura 69. Expressão gênica de OPG <i>in vitro</i>	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de citocinas e hormônios na remodelação óssea através da secreção de RANKL e OPG.....	33
Tabela 2. <i>Primers</i> Endógenos.....	49
Tabela 3. Genes e <i>primers</i> relacionados ao ciclo celular.....	55
Tabela 4. Genes e <i>primers</i> relacionados a apoptose.....	56
Tabela 5. Genes e <i>primers</i> relacionados à transdução de sinal mediado por $Nf\kappa\beta$	56
Tabela 6. Genes e <i>primers</i> relacionados à osteogênese.....	57
Tabela 7. Genes e <i>primers</i> relacionados à osteoclastogênese.....	57
Tabela 8. Anticorpos.....	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
<u>2.1 Tecido ósseo</u>	21
2.1.1 Matriz óssea	21
2.1.2 Células	23
<u>2.1.2.1 Osteoblastos</u>	23
<u>2.1.2.2 Osteócitos</u>	24
<u>2.1.2.3 Osteoclastos</u>	26
2.1.2.3.1 Formação dos osteoclastos	27
2.1.2.3.2 Mecanismos de ação dos osteoclastos	29
<u>2.1.2.4 Remodelação</u>	31
<u>2.2 Formação do tecido ósseo</u>	33
2.2.1 Ossificação Intramembranosa	34
2.2.2 Ossificação Endocondal	34
<u>2.3 Bisfosfonatos</u>	36
2.3.1 Etidronato	38
2.3.2 Alendronato	39
2.3.3 Aplicação dos bisfosfonatos	40
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
<u>4.1 Tratamento dos animais com bisfosfonatos</u>	43
<u>4.2 Obtenção dos espécimes e fixação</u>	43
<u>4.3 Radiografia</u>	44
<u>4.4 Análise histológica</u>	44
<u>4.5 Método histoquímico TRAP</u>	44
<u>4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão</u>	45
<u>4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura</u>	46
<u>4.8 Expressão Gênica</u>	46
4.8.1 Extração de RNA Total dos Tecidos	46

4.8.2 Transcrição Reversa (RT)	47
4.8.3 RT-PCR Quantitativo em tempo real (Real Time)	47
<u>4.8.3.1 Desenho dos primers</u>	47
<u>4.8.3.2 Teste dos primers</u>	48
<u>4.8.3.3 Escolha do gene endógeno</u>	48
<u>4.8.3.4 Genes de interesse</u>	54
4.9 Expressão Proteica	65
4.9.1 Extração de Proteínas Totais	65
4.9.2 Western Blotting	66
4.10 Obtenção da Cultura Primária de Osteoclastos	67
4.11 Método Histoquímico da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente	67
4.12 Tratamento da Cultura Primária com Bisfosfonatos	68
4.13 Análise da Viabilidade Celular	68
4.14 Expressão Gênica	68
4.14.1 Extração de RNA Total da Cultura Primária	68
4.14.2 Transcrição Reversa	69
4.14.3 RT-PCR Quantitativo em Tempo Real	69
<u>4.14.3.1 Escolha do gene endógeno</u>	69
<u>4.14.3.2 Genes de interesse</u>	70
4.15 Expressão Proteica	70
4.15.1 Extração de Proteínas Totais	71
4.16 Análise estatística	71
5 RESULTADOS	72
<u>5.1 In vivo</u>	72
5.1.1 Peso dos animais durante o tratamento	72
5.1.2 Análise da Radiografia	73
5.1.3 Área de cartilagem calcificada	74
5.1.4 Análise morfológica	75
5.1.5 Atividade de reabsorção das células clásticas	78
5.1.6 Análise ultraestrutural	83

5.1.7 Expressão gênica	85
<u>5.1.7.1 Genes envolvidos com apoptose</u>	85
<u>5.1.7.2 Genes envolvidos com ciclo celular</u>	87
<u>5.1.7.3 Genes membros do complexo de $Nf\kappa\beta$</u>	90
<u>5.1.7.4 Genes ligados à osteogênese</u>	92
5.1.8 Expressão de moléculas envolvidas na osteoclastogênese	93
<u>5.2 In vitro</u>	96
5.2.1 Padronização da Cultura primária de osteoclastos	96
5.2.2 Tratamento da Cultura primária de osteoclastos com Bisfosfonatos	98
5.2.3 Expressão gênica	99
<u>5.2.3.1 Genes envolvidos com apoptose</u>	99
<u>5.2.3.2 Genes envolvidos com ciclo celular</u>	102
<u>5.2.3.3 Genes membros do complexo de $Nf\kappa\beta$</u>	104
<u>5.2.3.4 Genes ligados à osteogênese</u>	106
5.2.4 Expressão de moléculas envolvidas na osteoclastogênese	107
6 DISCUSSÃO	111
7 CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS	121

1 INTRODUÇÃO

Os ossos são os principais constituintes do esqueleto, estrutura responsável pelo suporte e sustentação do organismo; é formado por células e cristais de fosfato de cálcio (hidroxiapatita) cuja proporção dos componentes varia de acordo com a localização e o tipo do osso. As células do tecido ósseo são osteoblastos, responsáveis pela síntese da matriz orgânica, osteócitos que realizam a manutenção desta matriz e osteoclastos, células multinucleadas e gigantes que realizam a reabsorção óssea, necessária para o processo de remodelamento ósseo, que ocorre durante toda a vida do indivíduo. Este tecido pode ser formado por dois processos distintos: a ossificação intramembranosa, que ocorre pela diferenciação de células mesenquimais embrionárias em osteoblastos; ou pela ossificação endocondral, onde o tecido ósseo substitui um molde de cartilagem pré-existente.

As células clásticas estão presentes em dois momentos durante o processo de ossificação endocondral, na zona de cartilagem calcificada da lâmina epifisária, onde são chamados de condroclastos e reabsorvem parcialmente os tabiques de matriz cartilaginosa calcificada, permitindo a entrada de células que se diferenciarão em osteoblastos para depositar matriz óssea sobre os remanescentes desses tabiques; e na zona de ossificação da lâmina epifisária, onde os osteoclastos iniciam a remoção do trabeculado ósseo que contém cartilagem calcificada no seu interior, para sua substituição por tecido ósseo maduro (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009, 2012). O processo de remodelação óssea ocorre mantendo a homeostase do tecido, onde a reabsorção e a formação são balanceadas e o osso reabsorvido é constantemente substituído por osso novo, principalmente para adaptar-se à carga e tensão mecânicas sofridas por este tecido. O excesso de reabsorção óssea é observado em doenças como a doença de Paget ou osteoíde deformante, mielomas, metástases ósseas, osteoporose e em alguns casos de osteogênese imperfeita (LANDESBURG et al., 2009; RUSSELL, 2006). As doenças osteometabólicas, que envolvem alterações nos processos de reabsorção óssea, têm sido amplamente tratadas com bisfosfonatos (BPs), drogas que inibem a ação das células de reabsorção, os osteoclastos. Uma grande quantidade destes compostos químicos foi sintetizada ao longo dos anos, provendo maior ou menor

intensidade de ação deste grupo de fármacos, que são prescritos de acordo com a doença e necessidade de cada paciente (RUSSELL, 2011).

Os bisfosfonatos têm sido amplamente utilizados no tratamento de doenças onde ocorra excesso de reabsorção óssea, devido a seu efeito inibitório da atividade osteoclástica. Acredita-se que os BPs, como o alendronato, que contém nitrogênio em sua fórmula, são tóxicos a essas células, ocasionando defeito na organização do citoesqueleto e na sinalização intracelular, bem como inibição de mecanismos de adesão, mudanças estruturais na região da borda em escova e diminuição na produção de enzimas, eventos que podem levar à perda de sua capacidade de reabsorção ou levar à apoptose destas células (RUSSELL, 2006, 2011).

O tratamento das doenças osteometabólicas com bisfosfonatos apresentam alta eficiência terapêutica, porém os mecanismos de ação dessas drogas nas células clásticas ainda não são totalmente conhecidos. De maneira geral, sabe-se que ocorrem alterações na atividade dos osteoclastos, uma vez que, ocorre a interrupção na formação da maquinaria pela qual ele se liga à matriz óssea. Assim, o citoesqueleto é um dos mais afetados nestas condições, levando a alterações no transporte de vesículas, organelas, além de mudanças morfológicas que inviabilizam a reabsorção óssea muitas vezes levando a morte celular. Estudos mostraram que as células clásticas presentes na cabeça da mandíbula, local onde ocorre ossificação endocondral, permanecem latentes sob efeito do alendronato (BRADASCHIA-CORREA et al., 2012). Como também ocorre ossificação endocondral nos osso que compõem a articulação do joelho, que se desenvolvem com claros e bem definidos discos epifisários, tanto na epífise distal do fêmur como na epífise proximal da tíbia, esta representa um excelente modelo para o estudo da ossificação endocondral, visando à avaliação do efeito dos BPs nas células clásticas.

O presente estudo visou investigar os mecanismos moleculares relacionados aos eventos que envolvem apoptose e fatores relacionados ao ciclo celular, além de traçar uma análise morfológica comparativa entre as células do tecido ósseo sob a ação de BPs de diferentes gerações em modelos de ossificação endocondral. Propôs-se, a combinação de estudos *in vitro* com análises *in vivo*, a fim de integrar os resultados obtidos pelas duas abordagens, além da comparação dos resultados

moleculares e morfológicos, uma vez que a associação dessas duas visões proverá um melhor entendimento dos acontecimentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

Por ser um tipo especializado de tecido conjuntivo os componentes estruturais deste tecido consistem em matriz extracelular (matriz óssea - mineralizada), colágeno e células, além de poder ser formado por diferentes processos de ossificação, a intramembranosa e a endocondral (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

As células que constituem o tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos são os responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz óssea. Esta matriz, quando recém-sintetizada e ainda não calcificada, recebe o nome de osteóide. Os osteoblastos apresentam-se dispostos lado a lado na superfície óssea e ainda são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando dos processos de mineralização da matriz (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os osteócitos são osteoblastos circundados pela matriz óssea cuja função é realizar a manutenção desta matriz. O outro tipo celular presente no tecido ósseo é o osteoclasto, célula de origem hematopoiética, gigante e multinucleada e responsável pela reabsorção da matriz óssea (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012).

2.1.1 Matriz óssea

A matriz óssea inorgânica apresenta um componente mineral, o fosfato de cálcio, na forma de cristais de hidroxiapatita $[3Ca_3(PO_4)_2(OH)_2]$, que estão intimamente ligados a moléculas secretadas pelos osteoblastos, que constituem os componentes orgânicos da matriz. No início da formação óssea, ocorre a deposição de uma matriz orgânica constituída principalmente por grande quantidade de fibrilas

colágenas do tipo I e proteoglicanas sulfatadas de cadeia longa, do tipo condroitin, heparan e sulfato de dermatan. Este passo é seguido pela mineralização, onde ocorre a deposição de uma matriz constituída por 90% de colágeno e 10% de componentes não colágenos, como osteopontina e sialoproteína óssea, moléculas que apresentam grande afinidade pela hidroxiapatita e irão se associar ao colágeno para que ocorra a mineralização e outras proteínas como osteocalcina e a osteonectina que estão intimamente relacionadas à ligação de cálcio, estabilização dos cristais de hidroxiapatita e regulação da formação óssea, elas também são sintetizadas pelos osteoblastos e compõem a matriz orgânica (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012).

Dos osteoblastos, brotam pequenas vesículas, originadas da membrana plasmática, que apresentam a enzima fosfatase alcalina e recebem o nome de vesículas da matriz. Estas vesículas se misturam aos componentes orgânicos secretados e a íons de cálcio ligados as proteoglicanas. Quando as proteoglicanas são degradadas os íons de cálcio entram nas vesículas onde os compostos que contém fosfato são quebrados sendo formados assim os primeiros cristais de hidroxiapatita. Os osteoblastos se reúnem ao redor da matriz recém-sintetizada que contém vesículas de matriz, estabelecendo junções celulares do tipo oclusivas entre si e começam a secretar enzimas não colágenas, as membranas das vesículas tornam-se descontínuas e assim, os cristais de mineral entram em contato com a matriz e ocorre a progressão da mineralização para o restante desta matriz, onde os cristais são depositados no interior das fibrilas colágenas e nas regiões interfibrilares, formando os glóbulos de mineralização. Com a mineralização da matriz, os osteoblastos continuam secretando matriz orgânica, que recebe o nome de osteóide. Este osso recebe o nome de osso primário, uma vez que seus componentes estão dispostos de maneira desorganizada e podem apresentar extensas áreas interfibrilares com muitas proteínas não colágenas (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; GUNTUR; ROSEN, 2011).

O osso primário sofre remodelação, pela ação em conjunto de osteoclastos e osteoblastos e é substituído pelo osso secundário. Durante o processo de remodelação a matriz é disposta em camadas ou lamelas, apresenta fibrilas colágenas mais densamente dispostas e organizadas na mesma orientação (dentro

da mesma lamela), com poucas e menores áreas interfibrilares. As camadas de matriz podem ser concêntricas ou paralelas, dependendo da presença de vasos (canais de Havers ou canais vasculares), espessura e região em que o osso se encontra (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

2.1.1 Células

2.1.2.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação do tecido ósseo. Elas têm origem nas células mesenquimais que possuem a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares como osteoblastos, adipócitos, condrócitos, mioblastos ou fibroblastos. Os osteoblastos são encontrados na superfície da matriz óssea, onde, em conjunto, executam sua função de produzir matriz (HADJIDAKIS, 2006). Os osteoblastos apresentam um grande e centralizado núcleo com até três nucléolos, um proeminente retículo endoplasmático rugoso (RER) e uma grande área é ocupada pelo complexo de Golgi além de alguns curtos prolongamentos celulares que adentram o osteóide (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006).

Membros de importantes vias de sinalização como PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), AKT (proteína quinase específica) em conjuntos com BMP2 (bone morphogenetic protein 2) são responsáveis por mediar a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos levando à expressão de importantes fatores de transcrição como RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), que controla a diferenciação destas células elevando a expressão de genes essenciais na formação da matriz óssea como o gene da osteopontina (*Spp1*), sialoproteína óssea (*Bsp*) e osteocalcina (*Bglap2*) (GUNTUR; ROSEN, 2011; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006). O Osterix, fator mediado por RUNX2, também é importante na diferenciação de osteoblastos, regulando positivamente a expressão de *Col1a1* (*Collagen, type I, alpha 1*) através de sua interação com NFATc1 (*Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*). Outros fatores de transcrição expressos

especificamente em osteoblastos têm sido constantemente alvo de novas pesquisas, como o ATF4, outro importante fator de transcrição específico em osteoblastos, que além de controlar a expressão de osteocalcina, atua na modulação da reabsorção por regular a expressão de RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), requerido para a diferenciação de osteoclastos (BOYCE; YAO; XING, 2009; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; GUNTUR; ROSEN, 2011; LONG; ORNITZ, 2013).

No tecido normal, os processos de formação e maturação da matriz ocorrem na mesma proporção, com os mesmos níveis de produção e mineralização (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; LONG; ORNITZ, 2013). A atividade dos osteoblastos é regulada de maneira autocrina e parácrina por uma série de hormônios como, por exemplo, paratormônio, insulina, progesterona, estrógenos, vitamina D3 e por fatores de crescimento como TGF- β (*Transforming growth factor beta*), IGF (*Insulin-like growth factors*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*), BMP (*Bone morphogenetic proteins*), entre outros (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

Ao final da fase de formação óssea os osteoblastos podem ter diferentes destinos: ser envolvido pela matriz, se tornando um osteócito; transformar-se em um osteoblasto quiescente, constituindo as células presentes ao redor da última camada de osteóide secretado (tornam-se achatados e constituem as células de revestimento ósseo); ou entrar em apoptose. A proporção de células que segue cada destino é diferente dependendo da origem do osso, da idade do indivíduo, do gênero ou da espécie, foi observado ainda que no osso esponjoso 65% dos osteoblastos entram em apoptose e cerca de 30% se transformam em osteócitos, outros relatos indicam que entre 10 e 20% dos osteoblastos se tornam osteócitos (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; PARFITT, 2002; QIU et al., 2002).

2.1.2.2 Osteócitos

Os osteócitos são as células mais abundantes no tecido ósseo, apresentando cerca de 10 vezes mais que os osteoblastos além de serem as células com a maior meia vida neste tecido (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; PARFITT, 2002;).

A formação dos osteócitos dá a partir de um osteoblasto que é passivamente envolto por osteóide, os osteoblastos, agora osteócitos diminuem suas atividades mantendo contato com as demais células deste tecido, sendo esta comunicação essencial para manter a integridade de todo o tecido ósseo (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006). Estas células ainda produzem proteínas de matriz e são responsáveis pela manutenção do tecido ósseo. Possuem uma grande quantidade de processos celulares ricos em microfilamentos que são organizados durante a formação da matriz e antes da mineralização, formam uma rede de contato com outros osteócitos através de finos prolongamentos e mantêm comunicação entre si por junções comunicantes. Estes prolongamentos são responsáveis pelo transporte de pequenas moléculas e íons entre os osteócitos (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; BONEWALD, 2011; FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006).

A transformação do osteoblasto em osteócito requer uma série de mudanças morfológicas no recém-formado osteócito, e uma das primeiras mudanças que ocorrem nestas células é a formação de prolongamentos, além da diminuição do corpo celular e mudanças nas organelas intracelulares. O fato de o osteócito estar envolvido na matriz não significa que o processo de transformação desta célula está finalizado. Os osteócitos mais jovens, recém “enterrados” são maiores que os mais antigos e ainda apresentam o complexo de Golgi bem desenvolvido, aos poucos esta célula deixa de expressar os marcadores de osteoblastos, passando a expressar marcadores de osteócitos e seus prolongamentos aumentam à medida que a matriz ao seu redor se espessa (BONEWALD, 2011; FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; PARFITT, 2002).

Durante o processo de transição entre osteoblasto e osteócito, as células diminuem a expressão de fosfatase alcalina, aumentam a expressão de osteocalcina e passam a expressar a metaloproteinase MT1-MMP necessária para que a célula aumente o número e tamanho dos prolongamentos celulares, além de outras moléculas importantes, como a CapG necessária para que ocorra o rearranjo do

citoesqueleto. Reguladores negativos da via de Wnt/ β -catenina essenciais para o funcionamento e viabilidade dos osteócitos, passam a ser expressos, como a esclerostina, antagonista do receptor 5 para lipoproteína (LRP5), responsável por regular positivamente a massa óssea. A inibição de Wnt/ β -catenina pela esclerostina também induz a diminuição os processos de diferenciação e ativação osteoblástica. β -catenina nos osteócitos está relacionada com a expressão de osteoprotegerina (OPG), importante fator anticlastogênico e contrariamente a apoptose destas células leva a liberação de corpos apoptóticos que expressam RANKL, necessário para o recrutamento e fusão dos osteoclastos (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; BONEWALD, 2011).

A atividade funcional e morfologia variam de acordo com a idade da célula, osteócitos jovens apresentem muitas características de osteoblastos, porém com menor atividade de síntese e volume celular, os osteócitos mais velhos, localizados mais profundamente, nas lacunas do osso calcificado, apresentam volume celular mais reduzido e grande acúmulo de glicogênio no citoplasma. Quando necessário estas células são fagocitadas e digeridas durante a reabsorção do osso pelo osteoclastos (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; QIU et al., 2006). Os canalículos que se formam ao redor dos prolongamentos dos osteócitos constituem o sistema lacuno-canalicular, onde ocorre um intenso tráfego de fluido ósseo, nos interior da matriz mineralizada, este fluido apresenta uma composição semelhante a do plasma sanguíneo, por onde chegam os nutrientes e sinais a todos os osteócitos, alterações neste fluido podem desencadear a apoptose destas células (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; BONEWALD, 2011).

2.1.2.3 Osteoclastos

Os osteoclastos foram primeiramente descritos em 1873 por Albert Kolliker (LERNER, 2000). São células multinucleadas, gigantes, que podem chegar a medir mais de 100 μ m de diâmetro, derivam do tecido hematopoiético de linhagem mononuclear e são as células do tecido ósseo responsáveis por sua reabsorção. O osteoclasto é geralmente encontrado em contato com a superfície calcificada formando a lacuna a de Howship, estrutura essencial para que exerça sua primordial

atividade, a reabsorção (ARANA-CHAVEZ; BRADACHIA-CORREA, 2012; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

Células clásticas são requeridas durante o desenvolvimento do esqueleto, para moldar os ossos durante toda a vida, nos processos de remodelamento que mantém o tecido ósseo saudável, realizando reparos contínuos de microfraturas e na manutenção da homeostase do cálcio (BOYCE; YAO; XING, 2009; LI; KONG; QI, 2006). O aumento da atividade de reabsorção dos osteoclastos ocorre em uma variedade de condições patológicas, como osteoporose, artrite reumatoide, periodontite e doenças malignas. Por outro lado, a diminuição desta atividade leva ao acúmulo excessivo de tecido ósseo observado em doenças como a osteopetrose (doença congênita, caracterizada pela alta densidade óssea e comprometimento das cavidades medulares, atribuída a perda ou disfunção dos osteoclastos) (LI; KONG; QI, 2006).

2.1.2.3.1 Formação dos osteoclastos

Na década de 1980, experimentos realizados em camundongos que apresentavam osteopetrose, apresentavam melhora significativa no quadro, quando transplantados com medula óssea de animais sem a doença, confirmando a origem hematopoiética destas células, que foi descrita primeiramente em 1963 por Jee e Nolan em 1963 (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007; JEE; NOLAN, 1963).

Atualmente sabe-se que precursores dos osteoclastos são derivados de uma linhagem monócito-fagocítica, sendo, portanto, membros de uma família de leucócitos pertencentes às células sanguíneas e por isso, com algumas características destes tipos celulares. Seus precursores podem proliferar, mas não a célula diferenciada. O osteoclasto propriamente dito, assim como os leucócitos, apresenta alta mobilidade (UDAGAWA et al., 1990). Entretanto, um dos últimos estágios da diferenciação dos osteoclastos acontece próximo ao osso mineralizado, os osteoclastos multinucleados nunca aparecem na circulação (LERNER, 2000).

Há mais de três décadas, os osteoclastos originados de células precursoras mononucleadas presentes na medula óssea ou em outros tecidos hematopoiéticos, têm sido material de estudo. *In vitro* os osteoclastos são formados somente em culturas onde existe o contato entre as células do estroma. A ausência de receptores do paratormônio (PTH) e vitamina D3 $1\alpha,25\text{-(OH)}_2$ em precursores de osteoclastos e a presença destes receptores em células do estroma e osteoblastos são importantes para os últimos estágios da osteoclastogênese (LERNER, 2000). Técnicas de cultura *in vitro* usando cultura proveniente do tecido hematopoiético, em certos estágios de diferenciação, expressam marcadores tanto de osteoclastos quanto de monócitos. Sabe-se que os precursores destas células são responsivos a fatores de crescimento secretados por diferentes tipos de células mesenquimais, como o fator estimulatório de colônia de macrófagos (M-CSF), que são secretados pelas células do estroma da medula óssea e se ligam aos receptores de membrana presentes nas células precursoras que vão se diferenciar em pré-osteoclastos (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009; ROODMAN, 2006).

Os pré-osteoclastos precisam então se fundir para formar as células multinucleadas. Esta fusão acontece graças à presença de um receptor de $\text{NF-}\kappa\beta$ (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), chamado RANK (*Receptor Activator of NK- κ B*) que é altamente expresso na membrana plasmática dos pré-osteoclastos e dos osteoclastos. Uma proteína que se liga a este receptor é expressa por osteoblastos presentes na cavidade medular e osteócitos circundados por matriz óssea, e recebe o nome de RANKL. Quando ligado ao receptor, RANKL estimula a fusão destas células e ativa cascatas de sinalização intracelulares essenciais para a diferenciação e fusão das células. A expressão de RANKL é induzida por $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{D3}$ (vitamina D3), paratormônio, prostaglandinas e M-CSF. Quando necessário um antagonista de RANKL, também sintetizado por osteoblastos, a osteoprotegerina (OPG) se liga a RANKL, impedindo que o mesmo se ligue a RANK e consequentemente impedindo a fusão dos pré-osteoclastos (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007; ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009; LI; KONG; QI, 2006; XING; XIU; BOYCE, 2012), como exemplificado na figura 1. A interação de RANKL com RANK leva ao recrutamento de fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs) como MAP quinases e Src tirosina quinases que ativam a sinalização de $\text{NF}\kappa\beta$, c-Fos entre outros, que são fatores de transcrição essenciais

para a diferenciação de osteoclastos (XING; XIU; BOYCE, 2012). Muitos grupos têm estudado sobre os mecanismos de fusão dos pré-osteoclastos e uma grande quantidade de moléculas têm sido descritas por fazerem parte destes mecanismos de fusão das células, porém, todos os grupos têm o mesmo consenso, RANK e RANKL e OPG são fatores chave nos processos de formação e ativação dos osteoclastos.

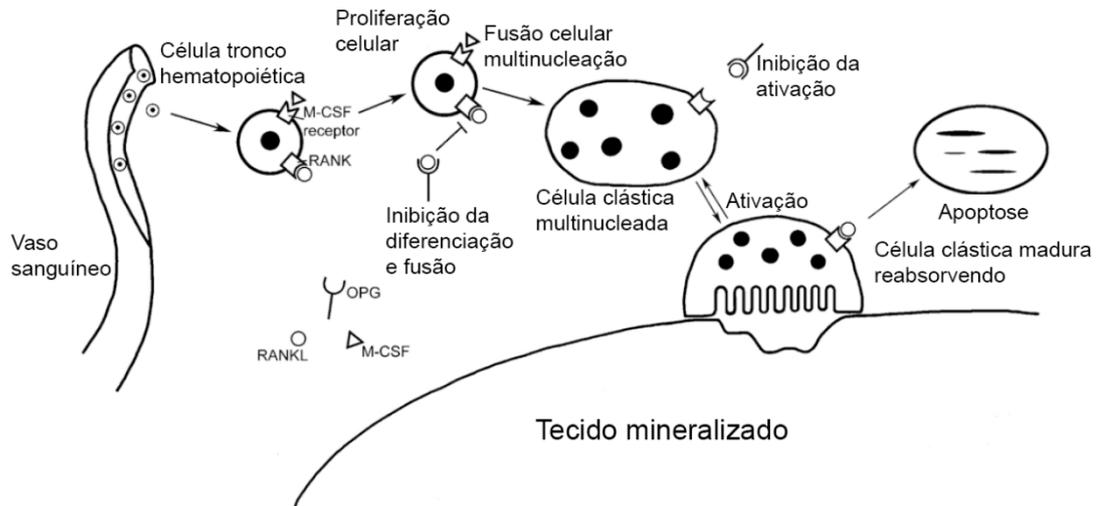


Figura 1: Esquema mostrando o recrutamento e mecanismos de ativação das células clásticas. Precursores hematopoiéticos são atraídos da circulação sanguínea até a área de reabsorção. RANKL e M-CSF se ligam a RANK e ao receptor de M-CSF presentes nas células tornando-as precursoras de osteoclastos, que vão proliferar e se fundir em células multinucleadas. A ativação das células multinucleadas ocorre em resposta a RANKL, chegando ao estágio de célula clástica madura. A diferenciação, fusão e ativação podem ser inibidas pela ligação de OPG e RANKL (adaptado de ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009).

Morfologicamente, estas células apresentam abundantes complexos de Golgi, mitocôndrias e vesículas de transportes carregadas com enzimas lisossomais como a fosfatase ácido tártaro resistente, a catepsina K e metaloproteinasas que são ativamente sintetizadas pelos osteoclastos e secretadas na lacuna de Howship para que ocorra o processo de reabsorção do osso (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

2.1.2.3.2 Mecanismos de ação dos osteoclastos

Para que ocorra a reabsorção óssea é necessária uma série de atividades do osteoclasto, como migração para o sitio de reabsorção, polarização, formação de novos domínios de membrana, dissolução da hidroxiapatita, degradação da matriz orgânica, remoção dos produtos degradados da lacuna até que a atividade da célula não seja mais requerida pelo organismo e entre em apoptose. Durante a atividade osteoclástica, a célula se polariza e sua membrana plasmática apresenta uma grande diversidade de domínios diferentes: a zona clara (ou zona de selamento), a borda em escova, a membrana basolateral e a membrana apical que apresenta função secretória como exemplificado na figura 2.

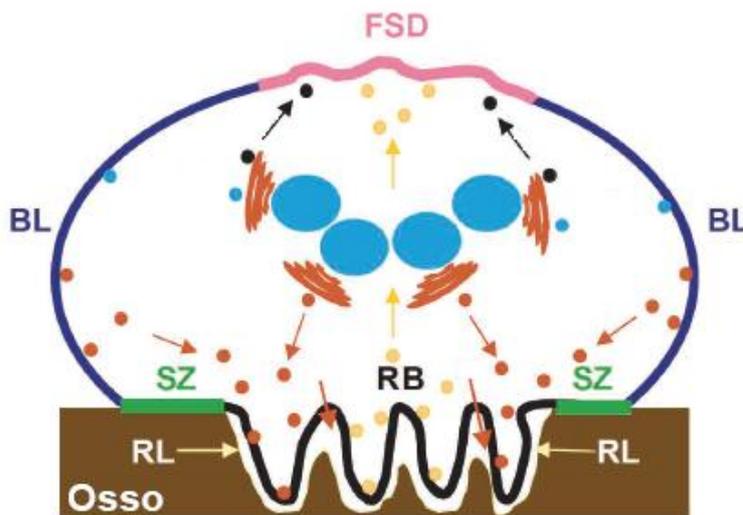


Figura 2: Esquema de osteoclasto reabsorvendo matriz óssea. Extensivo tráfego vesicular envolvendo os diferentes domínios de membrana, característica das células ativas. BL, domínio basolateral (azul); FSD domínio com função secretora (rosa); SZ, zona clara (verde); RB borda em escova (preto). Vesículas marrons ilustram o percurso de do complexo de golgi para RB e vesículas amarelas ilustram o caminho de RB para FSD. RL, lacuna de reabsorção (adaptado de VAANANEN, 2000).

Depois de migrar até o sitio de reabsorção, ação que necessita de uma grande atividade do citoesqueleto, uma região específica da membrana, a zona clara, se forma ao redor do osteoclasto. Esta ligação ocorre via estruturas dinâmicas chamadas podossomos, através de sua contínua montagem e desmontagem o osteoclasto se movimenta através da superfície do osso durante os processos de reabsorção. A membrana plasmática se liga fortemente a matriz óssea e sela a região onde ocorrerá a reabsorção ao redor de toda a célula. Nesta região é observada a presença de um anel de actina que circunda toda a célula e junções do tipo zônulas de aderência são formadas na presença de caderinas além da interação de integrinas do tipo $\alpha_v\beta_3$ a um receptor do fator estimulante de colônias de

macrófagos (cFms) à superfície da matriz óssea (ILVESARO; LAKKAKORPI; VAANANEN, 1998; STENBECK; HORTON, 2000; VAANANEN et al., 2000; ELSEGOOD et al., 2006; WANG et al., 2013), a sinalização de integrinas e a subsequente formação dos podossomos dependem de uma grande variedade de quinases de adesão incluindo o protooncogene Src (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

Depois de formada a zona clara (ou zona de selamento), a próxima região da membrana a se especializar é a borda em escova. A borda em escova é a região onde ocorrerá a reabsorção da matriz, ela é formada pela fusão de vesículas ácidas intracelulares com a região da membrana em contato com o osso. Durante esta fusão são formadas projeções, como se fossem dedos, que penetram na matriz óssea enquanto na face da membrana em contato com a matriz extracelular se fundem membranas endossomais. Não existe nenhum outro domínio de membrana que seja corresponde a este, sendo exclusivamente encontrado nos osteoclastos. As outras regiões da membrana de um osteoclasto ativo são formadas por um domínio apical, com função de exocitar o produto da degradação da matriz e a membrana basolateral que dá suporte a célula (VAANANEN et al., 2000).

A principal função fisiológica dos osteoclastos é degradar a matriz óssea. Para que isso ocorra é necessária a dissolução dos cristais de hidroxiapatita e a proteólise da matriz orgânica, rica em colágeno. A região da borda em escova secreta HCl na lacuna de Howship para a dissolução dos cristais de hidroxiapatita. O baixo pH desta região é necessário para que ocorra a ação de reabsorção. As fibras de colágeno são digeridas por catepsinas ou por collagenases ativadas e os resíduos desta digestão são internalizados por vesículas. Os produtos de todas estas degradações formados na lacuna de Howship são agrupados em vesículas e transportados desde a borda em escova até a membrana apical onde serão liberados para o meio extracelular (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; VAANANEN et al., 2000).

2.1.2.4 Remodelação

O osso é um tecido dinâmico, que está em constante processo de remodelação. O processo de remodelação foi descrito em 1990, por Frost e é o resultado da interação entre osteoblastos e osteoclastos (FROST, 1990). Em equilíbrio homeostático a reabsorção e a formação são balanceadas e o osso “antigo” é constantemente substituído por tecido novo, para adaptar-se a carga e tensão mecânicas sofridas por tal tecido. Os dois tipos celulares colaboram intimamente para este processo que recebe o nome de unidade básica multicelular (BMU – *basic multicellular unit*). A organização da BMU acontece de forma distinta nos diferentes tipos de tecido ósseo formado no organismo. Por apresentar uma maior superfície de contato e estar mais sujeito a traumas e tensão o osso trabecular é mais ativamente remodelado que o osso cortical (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

A remodelação inicia-se quando células pré-osteoblasticas, osteoblasto e/ou osteócitos liberam RANKL, que irá interagir com o receptor RANK presente nos pré-osteoclastos. Esta interação, como observado na figura 1, resulta na ativação, diferenciação e fusão dos pré-osteoclastos, além de prolongar a sobrevivência dos osteoclastos suprimindo a apoptose (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009; HSU et al., 1999). Os efeitos de RANKL são bloqueados por OPG que também é produzido por osteoblastos, esta proteína regula a absorção óssea por inibir o final da diferenciação e ativação dos osteoclastos, além de induzir a sua apoptose (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; SIMONET et al., 1997; XING; XIU; BOYCE, 2012).

Em condições fisiológicas, a manutenção do tecido ósseo é regulada por uma grande quantidade de citocinas e hormônios que estão envolvidos no processo de remodelação óssea por exercerem efeitos diretos sobre a osteoclastogênese através da modulação da produção de RANKL e OPG, como observado na tabela 1, em condições patológicas alterações em qualquer destes moduladores pode levar a uma maior reabsorção ou formação óssea (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

Tabela 1. Efeito de citocinas e hormônios na remodelação óssea através da secreção de RANKL e OPG (Adaptado de HADJIDAKIS, 2006).

	RANKL	OPG
Fator de crescimento transformante β (TGF- β)	—	↑
Paratormônio	↑	↓
Vitamina D3 1,25(OH) ₂	↑	—
Glicocorticoides	↑	↓
Estrógeno	—	↑
Fator de crescimento de fibroblasto	↑	↓
Prostaglandina	↓	↑

2.2 Formação do tecido ósseo

O tecido ósseo é formado por dois processos distintos durante a embriogênese. A ossificação intramembranosa dá origem aos ossos corticais ou compactos e é o processo formador dos ossos frontal, parietal, partes do occipital, do temporal e dos maxilares, além de contribuir para o crescimento em espessura dos ossos longos pela condensação direta das células mesenquimais. Em contraste, a ossificação endocondral que é responsável pela formação dos demais ossos do organismo, incluindo os ossos longos, também chamados de ossos trabeculares ou esponjosos se dá por intermédio do molde de cartilagem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.2.1 Ossificação Intramembranosa

Os ossos formados por ossificação intramembranosa são densos e compactos, constituem cerca de 80% do esqueleto, apresentam remodelação mais lenta, alta resistência à flexão e torção e constitui a parte externa de todas as estruturas do esqueleto (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009, 2012; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). O processo de ossificação destes ossos se dá a partir de uma membrana de tecido conjuntivo e o local de início da ossificação é denominado centro de ossificação primária. O princípio deste processo se dá pela diferenciação das células mesenquimais embrionárias em osteoblastos que irão sintetizar matriz orgânica óssea que logo irá mineralizar (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2012; GUNTUR; ROSEN, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.2.2 Ossificação Endocondral

Os ossos formados por ossificação endocondral representam cerca de 20% da massa do esqueleto. Este tipo de osso é menos denso e mais elástico, além de apresentar um grau de remodelamento mais alto que o osso cortical também exerce maior função metabólica que este (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A formação do osso trabecular se dá a partir de um molde de cartilagem hialina, com forma parecida, porém de menor tamanho, ao osso que irá formar. É um processo que dependem da proliferação, diferenciação e interação coordenada de vários tipos celulares e de diferentes tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; MACKIE; TATARCZUCH; MIRAMS, 2011).

O desenvolvimento do osso endocondral inicia-se com a condensação de células mesenquimais da crista neural na região crânio facial (na cabeça da mandíbula) ou da mesoderme, nos outros locais do corpo. A formação da condensação mesenquimal é pré-requisito para a subsequente diferenciação condrogênica (LONG; ORNITZ, 2013). Seguindo a condensação mesenquimal, células do centro da condensação se diferenciam em condrócitos que secretam matriz de cartilagem, rica em colágenos do tipo II, IX e XI além de proteoglicanos específicas como agregan. Células na periferia da condensação formam o

pericôndrio que expressa colágeno do tipo I e demarca o desenvolvimento de elementos do esqueleto ao redor do mesênquima (LONG; ORNITZ, 2013; MACKIE; TATARCZUCH; MIRAMS, 2011).

A ossificação do molde de cartilagem é precedida pela hipertrofia dos condrócitos, a diferenciação dos osteoblastos ocorre primeiramente na região do pericôndrio, processo denominado ossificação pericondral, desta maneira uma fina camada de matriz mineralizada circunda todo o molde de cartilagem, formando o colar ósseo (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2012; BIANCO et al., 1998; LONG; ORNITZ, 2013; MACKIE; TATARCZUCH; MIRAMS, 2011; RIMINUCCI et al., 1998), processo que podemos acompanhar na figura 3, a diferenciação dos osteoblastos continua na cavidade medular seguida da vascularização e hipertrofia da cartilagem. Esta diferenciação só acontece quando ocorre a liberação de IHH (*Indian hedgehog*) pelos condrócitos pré-hipertóxicos, que é necessário para a sinalização de PI3K e expressão de Runx2 (LONG; ORNITZ, 2013). Vasos sanguíneos, osteoclastos, medula óssea e precursores de osteoblastos também invadem o molde de cartilagem pelo colar ósseo formando o centro primário de ossificação. Este centro primário se expande em direção às extremidades do molde de cartilagem. Células clásticas reabsorvem a matriz de cartilagem e osteoblastos iniciam a deposição de matriz óssea. Nos ossos longos, ocorre subsequentemente, o centro de ossificação secundária, nas extremidades do molde de cartilagem. Esta ossificação secundária é responsável pela formação de uma região cartilaginosa denominada placa de crescimento, entre os dois centros de ossificação, responsável pelo crescimento em tamanho do osso longo e pela formação da cartilagem articular nas extremidades finais destes ossos. A ossificação endocondral se inicia na vida fetal e é interrompida no início da vida adulta, quando o centro primário de ossificação se funde com o centro secundário e o crescimento do indivíduo cessa (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; MACKIE; TATARCZUCH; MIRAMS, 2011).

A dinâmica do tecido ósseo vai além do crescimento até que ocorra o fechamento da placa de crescimento, durante toda a vida do indivíduo ocorre o processo de remodelação óssea. Em condições fisiológicas normais o remodelamento do esqueleto é determinado pelo balanço entre neoformação óssea,

pelos osteoblastos e reabsorção óssea pelos osteoclastos (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

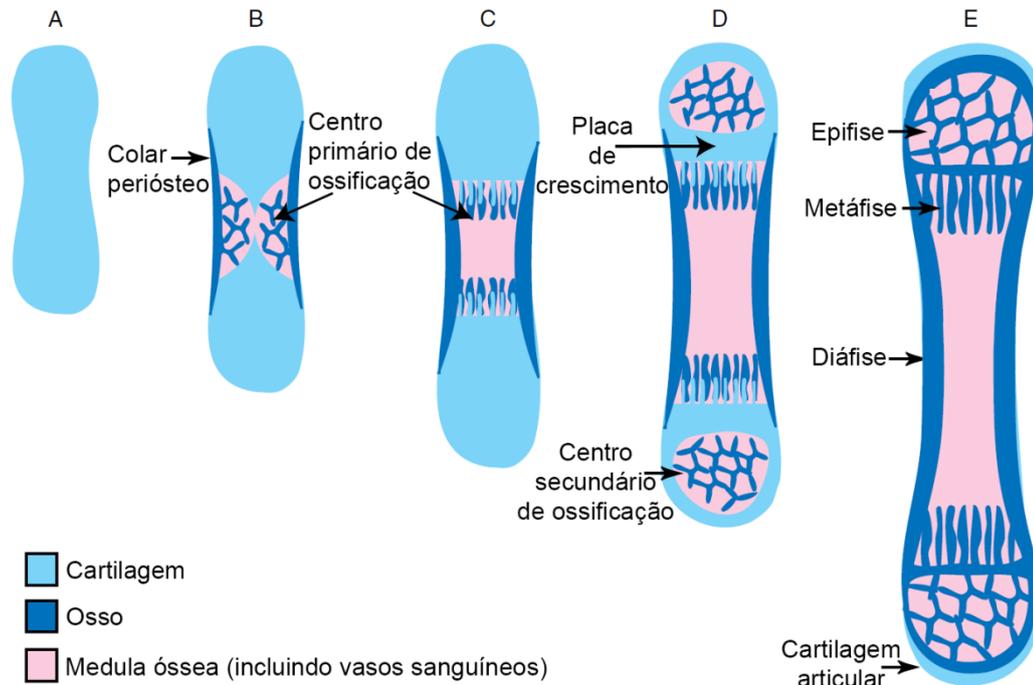


Figura 3. Visão geral do desenvolvimento de um osso por ossificação endocondral. (A) O molde de cartilagem do futuro osso. (B) O colar periosteal sendo formado e o início da formação do centro primário de ossificação. (C) O centro primário de ossificação começa a se expandir para as extremidades finais do molde de cartilagem. (D) Os centros secundários de ossificação são formados nas extremidades finais dos moldes de cartilagem, formando a placa de crescimento entre os centros primário e secundário de ossificação. (E) A maturidade do esqueleto é alcançada pela completa substituição da cartilagem na placa de crescimento por osso, somente a cartilagem articular permanece nas extremidades finais do osso. (adaptado de MACKIE; TATARCZUCH; MIRAMS, 2011).

2.3 Bisfosfonatos

Os primeiros bisfosfonatos (BPs) foram sintetizados por volta de 1800, mas só começaram a ser utilizados na medicina na década de 1960. O uso inicial destes compostos foi industrial, principalmente como inibidores de corrosão, além de outras aplicações nos processos industriais. Os BPs são análogos aos pirofosfatos (PPi), compostos metabolizados pelo organismo, responsáveis por prevenir a

calcificação de tecidos moles e regularem a mineralização óssea. Nos estudos iniciais os BPs mostraram que não só preveniam a calcificação de tecidos moles como a pele, rim e vasos sanguíneos *in vivo*, mas também inibiam a mineralização de tecido ósseo ectópico assim como a calcificação normal de tecidos como osso e cartilagem (RUSSELL, 2006). Foi observado que em ratos em fase de crescimento, os BPs diminuem a substituição da cartilagem por osso, por retardar o remodelamento das metáfises, apresentando diminuição do diâmetro trabecular e da formação óssea (RUSSELL, 2011; SCHENK et al., 1986). Se não utilizado em excesso, BPs mantêm as propriedades bioquímicas do osso, tanto em animais normais, quanto em modelos experimentais de osteoporose (RUSSELL, 2006).

Talvez o mais importante passo para o futuro uso dos BPs no tratamento de doenças osteometabólicas tenha ocorrido após a observação de que estes compostos, assim como os PPI, também apresentavam a propriedade de inibir a dissolução dos cristais de hidroxiapatita, o que foi determinante para supor que eles também poderiam inibir a reabsorção óssea. A fração P-C-P dos BPs é responsável pela forte afinidade dessa molécula aos cristais de hidroxiapatita (HAP) e permite um grande número de variações, baseadas na substituição dos átomos de carbono nas cadeias R1 e R2 (Figura 4). A habilidade dos BPs em ligar-se aos HAP é reforçada quando a cadeia R1 apresenta um grupo hidroxila (etidronato), esse grupo aumenta a afinidade pelo cálcio, mais do que quando o grupo R1 é reforçado por uma cadeia halógena (clodronato). O etidronato e o clodronato fazem parte dos chamados BPs de primeira geração. Alguns BPs apresentam diferenças na cadeia R2, como um átomo de nitrogênio na cadeia alcalina (pamidronato e alendronato), tornando-os até 100 vezes mais potentes que as BPs de primeira geração e são, por isso, denominados BPs de segunda geração. A partir da década de 80 os componentes dos BPs foram sintetizados para aperfeiçoar seus efeitos anti-reabsortivos, sendo que os mais potentes apresentam um anel heterocíclico com um átomo de hidrogênio (risendronato e zolendronato), os BPs de terceira geração, apresentando uma eficiência 10.000 vezes maior que os da primeira geração (RUSSELL, 2006).

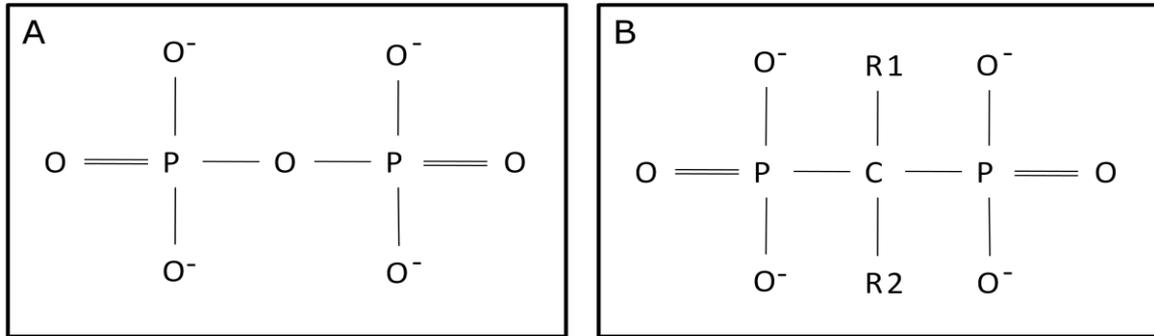


Figura 4. Comparação entre estruturas químicas. A. Estrutura química dos pirofosfatos. B. Estrutura química básica dos bisfosfonatos.

2.3.1 Etidronato

Os BPs de primeira geração, como o etidronato, são metabolicamente incorporados como análogos não hidrolisados de adenosina trifosfato (ATP), que podem inibir as enzimas intracelulares dependentes de ATP (RUSSELL, 2011).

Este BP foi o primeiro utilizado em humanos, para prevenir a calcificação ectópica e a ossificação em tratamentos de lesão na medula espinhal, no tratamento de fibrodysplasia ossificante progressiva (FOP) e também na aplicação de cremes dentais, a fim de prevenir cálculos dentários - para estes efeitos, foram requeridas altas doses de etidronato (HAUSMANN et al., 1970; RUSSELL, 2006, 2011).

A inibição da mineralização não acontece quando o etidronato é usado em doses baixas, como as recomendadas no tratamento da osteoporose, por exemplo. Além disso, este BP também foi o primeiro no tratamento da doença de Paget, e sintetizado cerca de 100 anos antes desta aplicação, que ocorreu em meados de 1970, além de utilizado ainda em alterações no metabolismo ósseo, especialmente as decorrentes de tumores, que podem acometer indivíduos jovens, com o crescimento do esqueleto incompleto (RUSSELL et al., 2008; SHAW; BISHOP, 2005; SPARIDANS; TWISS; TALBOT, 1998; TABUCHI et al., 2005;). Ainda na década de 1970 foram publicados os primeiros trabalhos científicos descrevendo os efeitos este BP em osso trabecular de rato (LARSSON, 1977; MILLER; JEE, 1975; SCHENK et al., 1973). Recentemente renovou-se o interesse em desvendar os

efeitos de etidronato no tratamento da calcificação quando ocorre falha renal e também em doenças vasculares (RUSSELL, 2011).

2.3.2 Alendronato

Os BPs de segunda geração, nitrogenados, como o alendronato, bloqueiam a via do mevalonato, tendo como principal alvo a farnesil difosfato sintase que impede a biossíntese de compostos isoprenóides essenciais para a modificação pós-traducional de pequenas GTPases Rho, Rac, Rab e Ras, proteínas intermediárias do metabolismo do colesterol e essenciais em diversos processos importantes para a atividade dos osteoclastos, como controle da morfologia, organização do citoesqueleto, alterações no transporte por membrana, formação da borda em escova, tráfico de endossomos e apoptose (COXON; TAYLOR, 2008; HALL, 1998; MOORE, 2002; ORY et al., 2008; ROSENFELD; KNOLL; RUSSELL, 2006; TAYLOR et al., 2011).

Nosso grupo mostrou que durante a investigação da erupção dentária de molares de ratos tratados diariamente com alendronato desde o nascimento, ocorreu falta de reabsorção no trabeculado do processo alveolar durante a ossificação intramembranosa, com a consequente parada da erupção destes dentes. Nesses espécimes notou-se a presença de numerosos osteoclastos, estas células apresentaram-se multinucleadas, sem zona clara nem borda em escova, e em sua maioria afastada das superfícies ósseas, em estado latente, indicando que os precursores haviam sido recrutados, ocorrido proliferação e subsequente fusão. Dessa forma, o alendronato afetou a ativação dessas células, as quais eram TRAP-positivas, porém, localizavam-se a certa distância da matriz óssea (BRADASCHIA-CORREA; MASSA; ARANA-CHAVEZ, 2007; BRADASCHIA-CORREA; MOREIRA; ARANA-CHAVEZ, 2013).

Além dos danos ao osteoclasto, outros estudos indicam que o alendronato, pode interferir na remodelação óssea por agir também nos osteoblastos (SHIMIZU; TAMASI; PARTRIDGE, 2012).

2.3.3 Aplicação dos bisfosfonatos

A doença de Paget que leva ao aumento do número de osteoclasto, por defeitos (muitas vezes genéticos) nos mecanismos que induzem à célula a apoptose, é a principal característica da doença, que leva a sintomas como dor, fratura e deformidades no esqueleto, por induzir a morte de osteoclastos os BPs foram primariamente utilizados na terapêutica desta doença (DAROSZEWSKA; RALSTON, 2005).

A osteoporose é reconhecidamente uma das doenças osteometabólicas mais incidente em todo o mundo, está intimamente associada a fraturas graves e muitas vezes em locais de difícil reparo. O edidronato foi o primeiro BP usado no tratamento de osteoporose, seguido pelo alendronato e risedronato, todos comprovadamente eficientes por aumentar a massa óssea e reduzir os níveis de fratura. A redução nas fraturas não está associada somente inibição da perda de massa óssea, pela diminuição da frequência de remodelamento ósseo, mas também por aumentar os níveis de mineralização deste tecido. Os BPs previnem a perda de massa óssea mais eficientemente quando associada à administração de glucocorticosteróides (ADACHI et al., 1997; BOONEN et al., 2005; RUSSELL, 2006; SAAG et al., 1998).

Muitos cânceres são associados com hipercalcemia (aumento de cálcio no sangue) e aumento da destruição óssea. Os BPs podem prevenir a reabsorção óssea, particularmente quando ocorrem metástases ou tumores ósseos, podem não só cessar o crescimento do tumor, mas em alguns casos, como em tumores de tecidos moles, a massa tumoral total pode diminuir. Este efeito direto, está relacionado à adesão celular e à indução da apoptose. Em pacientes que apresentam mielomas, câncer de mama, próstata, pulmão, carcinomas de células renais e outros tumores sólidos, os BPs são utilizados para auxiliar a diminuir a incidência de alguns eventos relacionados aos ossos, como fraturas, compressão do cordão espinhal, hipercalcemia além de reduzir a necessidade de radiação e cirurgias neste tecido (GUISE; MUNDY, 1998; MUNDY, 1998; MUNDY; YONEDA, 1998; RUSSELL, 2006).

O tratamento das doenças osteometabólicas com BPs apresentam grande eficiência terapêutica, porém os mecanismos de ação dessas drogas nas células clásticas ainda não são totalmente conhecidos. De maneira geral, sabe-se que ocorrem alterações na atividade dos osteoclastos, uma vez que, ocorre a interrupção na formação da maquinaria pela qual se ligam à matriz óssea.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de dois bisfosfonatos, um de primeira e outro de segunda geração, etidronato e alendronato respectivamente, sobre as células clásticas em dois sistemas: “*in vivo*” durante o desenvolvimento endocondral de ossos longos e “*in vitro*”, a partir de cultura primária de células derivadas da medula óssea. Pretendeu-se analisar os seguintes aspectos:

- Alterações morfológicas no tecido ósseo e nas células clásticas durante a ossificação endocondral decorrentes dos tratamentos com os dois BPs.
- Investigar alterações moleculares em genes relacionados com o ciclo celular, apoptose e transdução de sinal mediada por NFκB e em proteínas alvo na remodelação óssea, presentes no tecido ósseo de animais tratados com os dois BPs.
- Investigar alterações moleculares em genes relacionados com o ciclo celular, apoptose e transdução de sinal mediada por NFκB e em proteínas alvo na remodelação óssea, presentes na cultura primária de osteoclastos tratados com os dois BPs.
- Traçar uma relação entre as alterações morfológicas e os eventos moleculares observados nas células que compõem o tecido ósseo, correlacionando os resultados *in vivo* com os achados *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tratamento dos animais com bisfosfonatos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foram utilizados 72 ratos Wistar, recém-nascidos que foram divididos em 3 grupos, sendo 1 controle e 2 tratados, o tratamento ocorreu desde o nascimento até o 21º dia de vida. Nos grupos tratados, os animais foram administrados, no dorso com a técnica subcutânea com 2,5 mg/kg/dia de alendronato sódico (MASSA, 2006) ou 8 mg/kgpeso/dia de etidronato sódico (TAKANO, 1998) diluídos em 10 µl de PBS. Já o grupo controle foi injetado diariamente com 10 µl de solução salina.

4.2 Obtenção dos espécimes e fixação

No 21º dia de vida os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma combinação de ketamina e xilazina, na dose de 0,1 mL de cada solução para cada 100 g de massa corporal. Em seguida, foram eutanasiados por decaptação e tiveram as epífises e as metáfises dos fêmures e das tíbias removidos. Os espécimes destinados à microscopia sofreram imediata fixação por imersão em solução fixadora contendo glutaraldeído a 2% + formaldeído a 2,5% (preparado do paraformaldeído) em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4. Os espécimes foram alocados em béquer de vidro contendo a solução fixadora o qual estava posicionado em forma de vidro contendo gelo picado e submetido à irradiação de micro-ondas em forno de laboratório Pelco 3440 (Ted Pella, Redding, C.A. USA). Um termômetro imerso na solução fixadora foi utilizado para o controle da temperatura a qual não excedeu a temperatura máxima de 37 °C (MASSA, 2006). O material foi exposto a três ciclos de 5 minutos a potência máxima (100%). Em seguida esse material foi imerso em nova solução fixadora e permaneceu overnight a 4 °C (MASSA, 2000).

Após esse procedimento, o material foi lavado por cerca de 1 hora em tampão cacodilato 0,05 M e submerso em EDTA a 4,13% durante aproximadamente trinta dias, para descalcificação (WARSHAWSKY, 1967), a solução de EDTA foi trocada a cada três dias. Após a completa descalcificação do material, o mesmo foi submetido à lavagem em água corrente durante 24 horas e a desidratação em etanol crescente.

4.3 Radiografia

Depois que os espécimes foram completamente fixados e dissecados, eles foram radiografados em um equipamento de radiografia odontológico Spectro 70X (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com os seguintes parâmetros: 1,2 ampéres e 0,7 segundos de exposição.

4.4 Análise histológica

Os espécimes foram infiltrados em três séries de 30 minutos de submersão em xilol o qual foi trocado a cada série, seguida da submersão em parafina a cerca de 60 °C, também em três séries e com troca da parafina a cada seção. A inclusão em parafina foi realizada através dos sistemas Mícron HMP110. Foram realizados cortes de 4 µm de espessura, algumas lâminas foram estocadas para posterior análise por histoquímica para TRAP, enquanto outras foram desparafinizadas com xilol, hidratadas em concentrações decrescentes de álcool e coradas com hematoxilina de Harris e eosina ou com tricômio de mallory, as lâminas foram montadas utilizando-se como meio de montagem Entellan (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), analisadas e fotografadas em microscópio Olympus BX-60 (Olympus, Shinjuku-ku, Tokyo, Japão).

4.5 Método histoquímico TRAP

Para este procedimento foram utilizadas lâminas de vidro previamente lavadas em etanol absoluto, secas e mergulhadas em solução de 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Chemical CO, St Louis, Mo/USA) a 20% em etanol absoluto por dois minutos, seguida de cinco sessões de passagem em água destilada e secagem por pelo menos 24 horas em estufa a 37 °C. Os cortes de 4 µm de espessura foram esticados nas lâminas silanizadas, seguidas de secagem. Os cortes foram desparafinizados seguindo-se a hidratação em etanol iniciando-se no absoluto e passando concentrações maiores de água até a imersão em água destilada pura. Os grupos foram analisados através do método histoquímico TRAP (*Tartrate resistant acid phosphatase*), onde as lâminas foram incubadas em solução completa de Burstone (4 mg de naphotol AS-BI phosphate substrate em 0,25 mL de N,N-dimetil-formamida, com adição de 25 mL de tampão acetato a 0,2 M pH 5,0 + 35 mg de Fast Red Violet LB e 60 µL de MgCl a 10%) filtrada e aquecida a 37 °C durante 5 minutos, seguida da adição de ácido tartárico D(-) a uma concentração final de 50 mM. Os cortes foram incubados por 3 horas a 37 °C, lavados durante 10 minutos em água corrente e contracorados com Hematoxilina de Harris. As lâminas foram montadas utilizando-se como meio de montagem Entellan (Merck) e analisadas em microscópio Olympus BX60 (Olympus). Os osteoclastos TRAP+ foram contados e classificados de acordo com a atividade (ativos, inativos/latente ou apoptóticos) e pela quantidade de núcleos (mononucleados, de dois a cinco núcleos e com mais de cinco núcleos). Os osteoclastos foram considerados ativos quando aderidos à superfície óssea na qual houvera a presença de lacunas de reabsorção, considerados latentes quando arredondados e distantes das superfícies ósseas e apoptóticos quando apresentavam núcleos picnóticos. Foram contados osteoclastos numa área de 4,4 x 3,3 mm, e realizado teste estatístico.

4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Após a lavagem dos espécimes em solução tampão estes foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por uma hora. Então, procedeu-se a desidratação dos espécimes em uma série crescente de etanol. As amostras foram então infiltradas e incluídas em resina Spurr. Os blocos obtidos foram aparados e cortados em um

micrótomo MICRON, com a utilização de facas de vidro feitas com um "knife maker" LKB 7800-B. Os cortes semifinos foram montados em lâminas de vidro, corados em solução alcoólica de azul de toluidina a 0,25% e observados ao microscópio de luz. Selecionada a área, os blocos foram novamente aparados, para a obtenção de cortes ultrafinos (80 nm), em ultramicrótomo Leica Ultracut R (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA) utilizando facas de diamante. Os cortes foram coletados em telas de níquel de 200 ou 300 "meshes", recobertas com película de Parlodion. As amostras foram examinadas e fotografadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1010 (Jeol USA Inc. Peabody, MA, USA) operando a 80 kv. As imagens foram obtidas digitalmente com o programa de imagens GATAN equipado com câmera SC1000 Orius CCD.

4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após a fixação já descrita anteriormente, os espécimes tiveram as estruturas orgânicas desnaturadas e removidas através da imersão em solução de hipoclorito e sódio a 2% por um período de 3 horas, seguido de 3 minutos em um aparelho de ultrassom Branson 1210. Em seguida, os espécimes foram lavados em água destilada, desidratados em concentrações crescentes de etanol e, finalmente, dessecados com HMDS (hexamethyldisilazane) durante um período de 10 minutos, seguido de 24 horas de secagem em um dessecador a temperatura ambiente. Os espécimes foram afixados em *stubs* de alumínio com cola de prata coloidal, e em seguida metalizados no aparelho Bal-Tec SCD 050. O material foi examinado em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6100, operado com 15 kV.

4.8 Expressão Gênica

4.8.1 Extração de RNA Total dos Tecidos

O RNA total foi extraído das epífises e metáfises dos fêmures e tíbias, tratados ou não com os bisfosfonatos, baseado na técnica desenvolvida por Chomczynski e Sacchi (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), usando reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

Após a extração as amostras foram quantificadas por método fluorimétrico em equipamento Qubit (Life Technologies).

4.8.2 Transcrição Reversa (RT)

Para geração de DNA complementar (cDNA) (REIS, 2005), 1 µg de RNA total, na presença de 0,5 µg de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (Promega, Madison, WI, USA), 10 U de inibidor de RNase (Life Technologies), 1 mM de deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP mix) (Life Technologies), 10 mM de DTT (Life Technologies), tampão de RT 1x e 200 U de ImPromII transcriptase reversa (Promega), para volume total de 20 µL foi colocada à 25 °C por 5 minutos, à 42 °C por 60 minutos, a 70 °C por 15 minutos e 4 °C até a retirada do equipamento em termociclador Veriti (Life Technologies).

4.8.3 RT-PCR Quantitativo em tempo real (Real Time)

4.8.3.1 Desenho dos primers

Os *primers* utilizados para as reações de RT-PCR foram desenhados utilizando como base sequências depositadas no *GeneBank*, e utilizando o programa PerlPrimer, para confirmação dos primers escolhidos as sequências foram blastadas no programa Primer3. Os primers sense (Fw) e anti-sense (Rv) foram escolhidos em éxons distintos, para maior confiabilidade dos produtos.

4.8.3.2 Teste dos primers

Os *primers* foram confeccionados pela Life Technologies , diluídos em água DEPC e armazenados conforme orientação do fabricante. Foi realizada diluição e testes dos *primers* com PCR qualitativo, utilizando 45 µl de solução PCR Super Mix (Life Technologies), acrescidos de cDNA, *primer forward* e *primer reverse* em volume de 5 µl totalizando 50 µl de volume final de reação. Para todos os testes foi realizado o controle negativo, onde o cDNA foi substituído por água DEPC. A reação foi colocada à 94 °C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos à 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, seguido de resfriamento à 4 °C até a retirada do equipamento termociclador Veriti (Life Technologies). Após o procedimento 5 µl de cada amostra foi misturada a 1 µl de BlueJuicer™ Gel Loading Buffer (Life Technologies) e estas foram colocadas em gel de agarose à 1,2% acrescido 1:10000 Syber Safe (Life Technologies). O gel foi submetido eletroforese em cuba de eletroforese, analisado e fotografado no equipamento PrepOne TM Sapphire Blue Ligth Transilluminator (EmbiTec, San Diego, CA, USA). Foram considerados eficientes os *primers*, cujo produto da reação apresentou tamanho aproximado ao esperado segundo sua confecção (Figura 5).

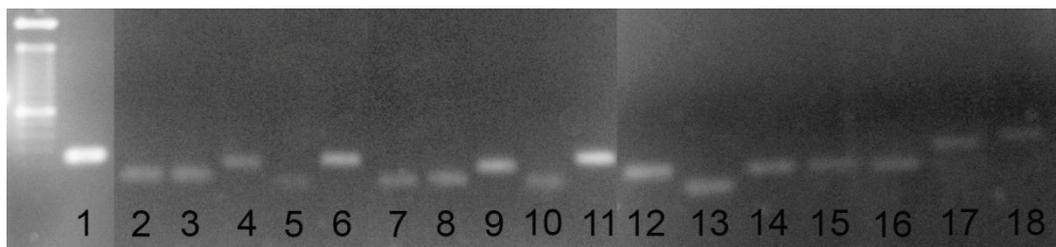


Figura 5. Gel representativo de PCR convencional dos *primers* de estudo. 1 – Mdm2; 2 – Myc; 3 – Ppia; 4 – Gapdh; 5 – Rpl19; 6 – α -Tubulina; 7 – β -Actina; 8 – Nf κ B1; 9 – Rankl; 10 – Cdk4; 11 – Smad3; 12 – P53; 13 – Mad2l1; 14 – Casp3; 15 – Rank; 16 – Opg; 17 – Mapk3; 18 – Nf κ B2; 19 – Runx; 20 – Ssp1.

4.8.3.3 Escolha do gene endógeno.

Para a escolha do melhor gene endógeno para este trabalho foram desenhados *primers* para cinco genes endógenos (Tabela 2), a eficiência e a curva de denaturação (temperatura de *melting*) foram testadas para cada *primer* avaliado (Figuras 6-10) e a expressão gênica comparada entre os três grupos de trabalho, controle, alendronato e etidronato. Cada reação de PCR foi realizada em triplicatas, utilizando-se para cada uma 50 ng de cDNA, 10 µl de SYBR[®]Green PCR Master Mix (Life Technologies) e *primers* em volume total de 25 µl em equipamento Gene Rotor Gene (Quiagen, Hilden, Germany). O gene endógeno escolhido foi o Gapdh, que apresentou menor variação entre os grupos de animais tratados ou não (Figura 11).

Tabela 2. *Primers* Endógenos

Gene	Sequencia	TM	Eficiência
β -tubulina	Fw – TTGCTAAGTTCTGGGAGGCA Rv – GAGTACACAGAGATTCGGTCTG	55°C	0,98
Gapdh	Fw – GAGAAAGCTGCCAAGTATGATGAC Rv – GGGAGTTGGTGTGAAGTCAC	55°C / 57°C	1 / 1
Ppia	Fw – CAAGCTGTTTGCAGACAAACT Rv – CGCCCTGGCACATGAATCGT	55°C	0,87
Rpl19	Fw – TTGCCAACTCTCGTCACCAG Rv – ACCTCATCCTTCGCATACAG	55°C	1
α -actina	Fw – TAAGATGGGTAAGTGTCGAG Rv – CACAATTCCTTTGCGTGTG	55°C	0,98

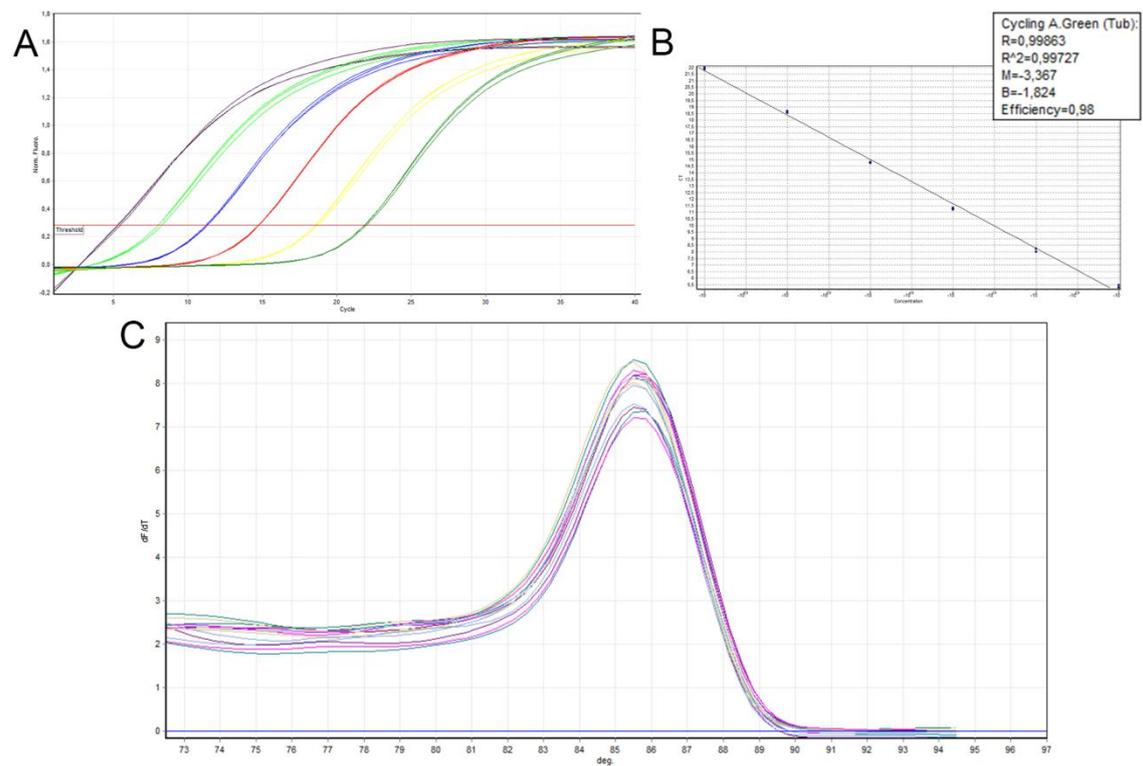


Figura 6. Eficiência de β -Tubulina. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

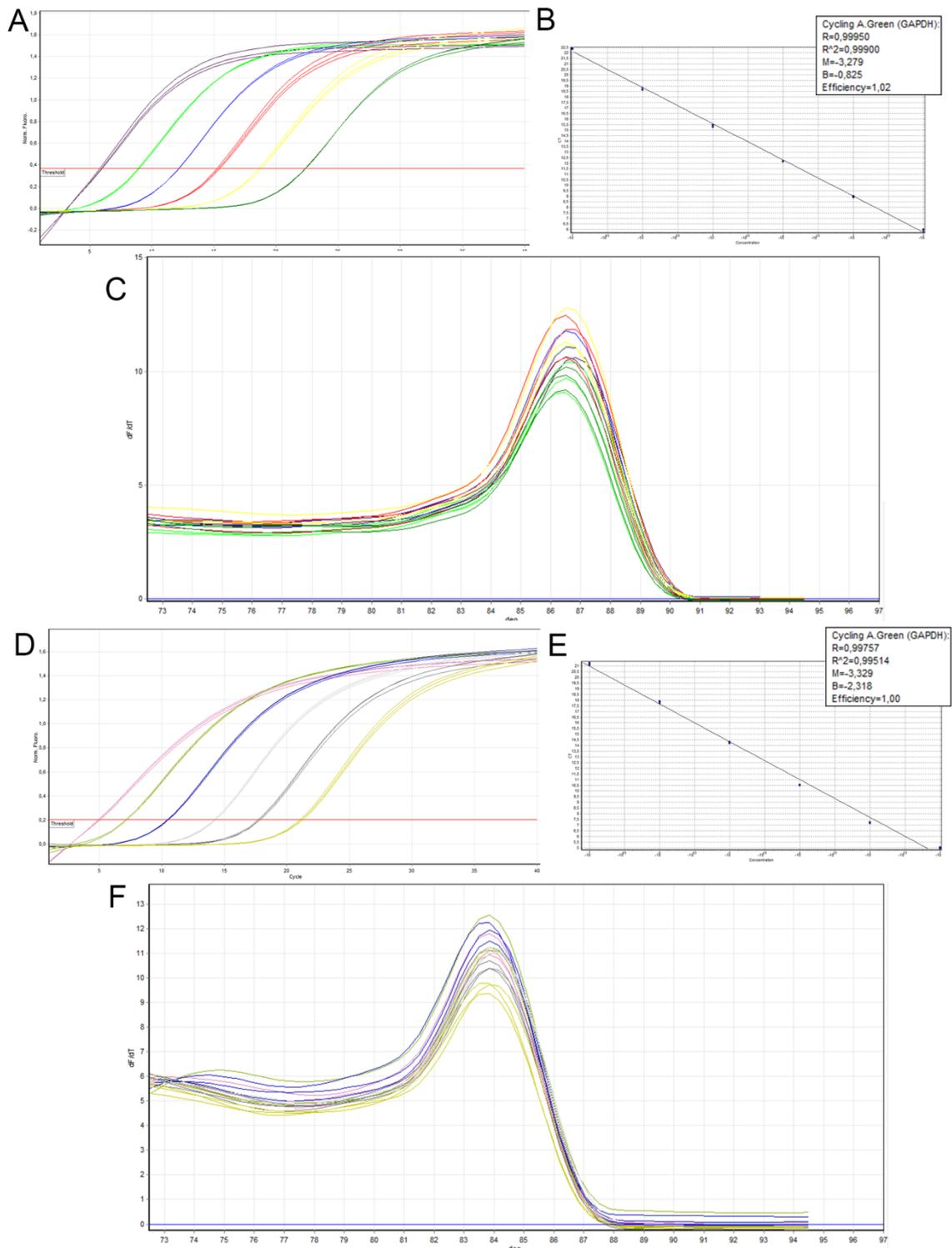


Figura 7. Eficiência de Gapdh. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado e temperatura de melt à 55°C. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência e temperatura de melt à 55°C. Em **C** Curva de Melt da reação e temperatura de melt à 55°C. Em **D** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado e temperatura de melt à 57°C. Em **E** Gráfico com os valores da reta e da eficiência e temperatura de melt à 57°C. Em **F** Curva de Melt da reação e temperatura de melt à 57°C.

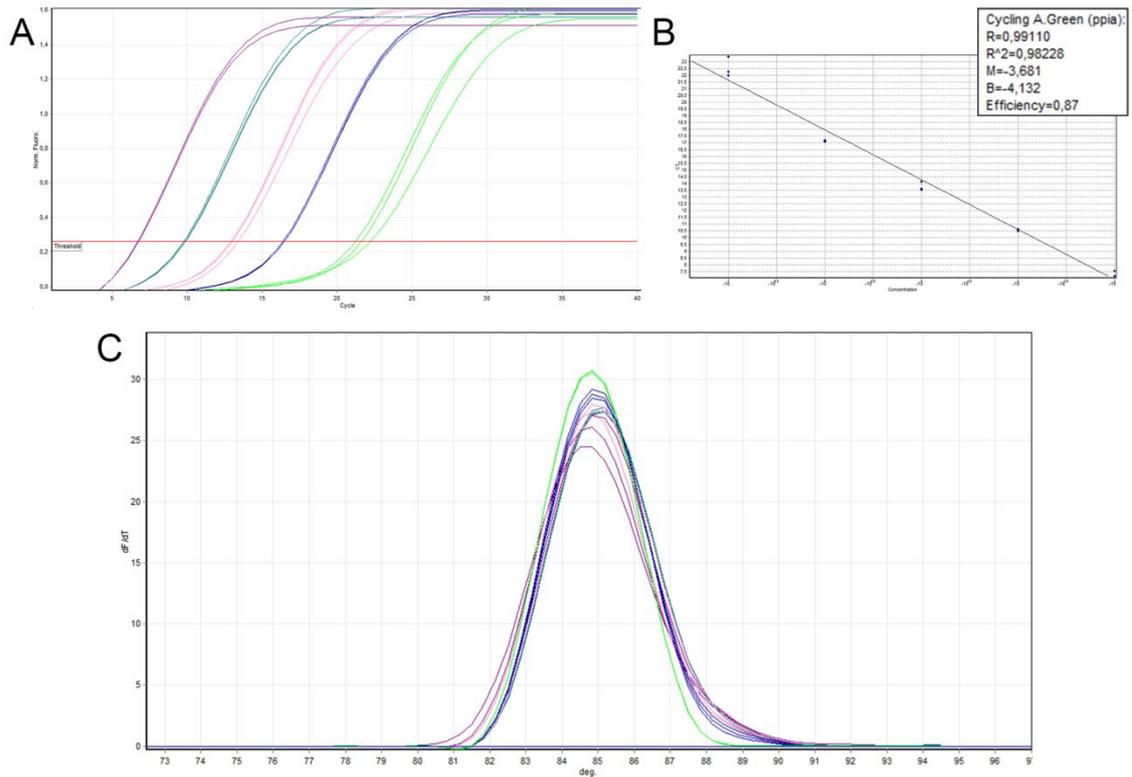


Figura 8. Eficiência de Ppia. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

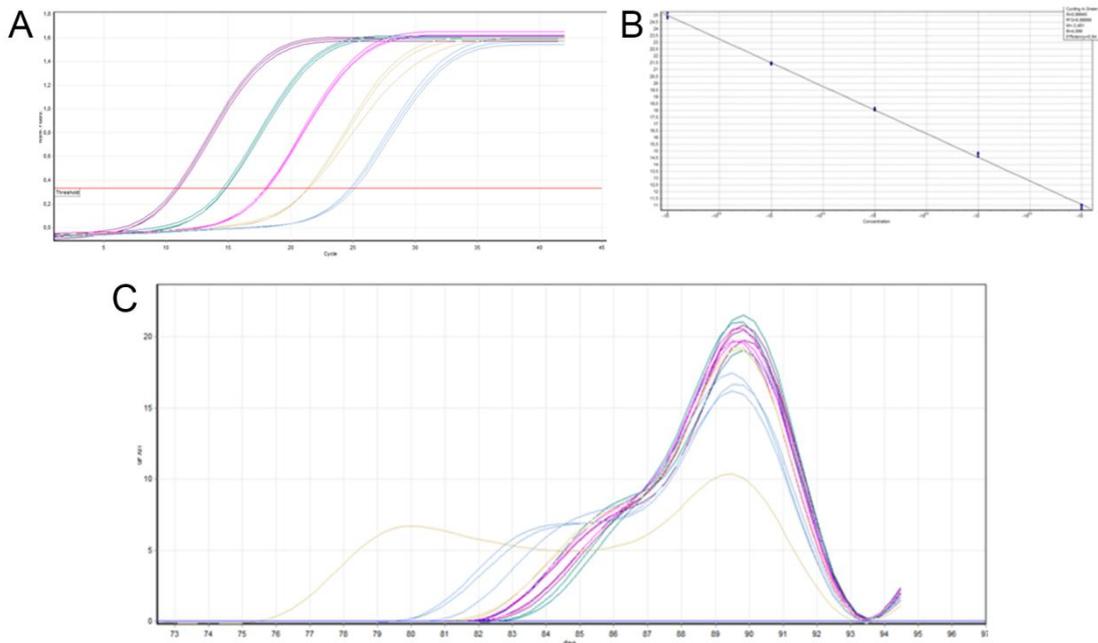


Figura 9. Eficiência de Rpl19. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

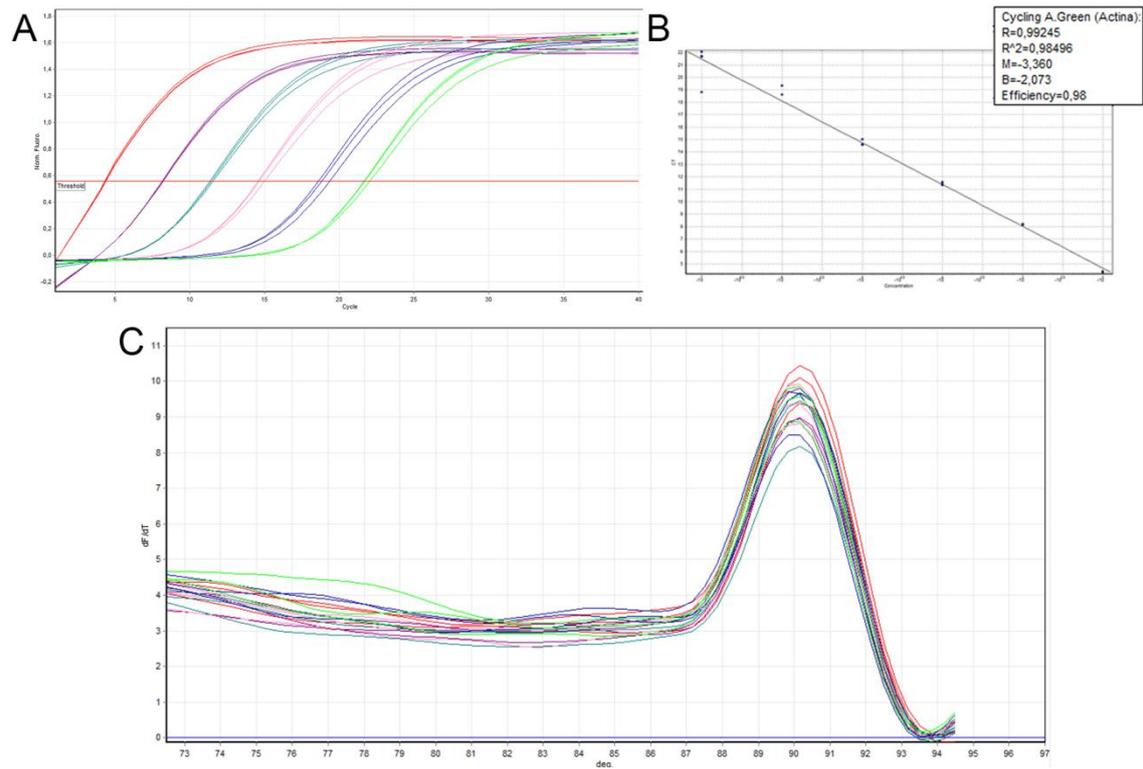


Figura 10. Eficiência de α -Actina. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

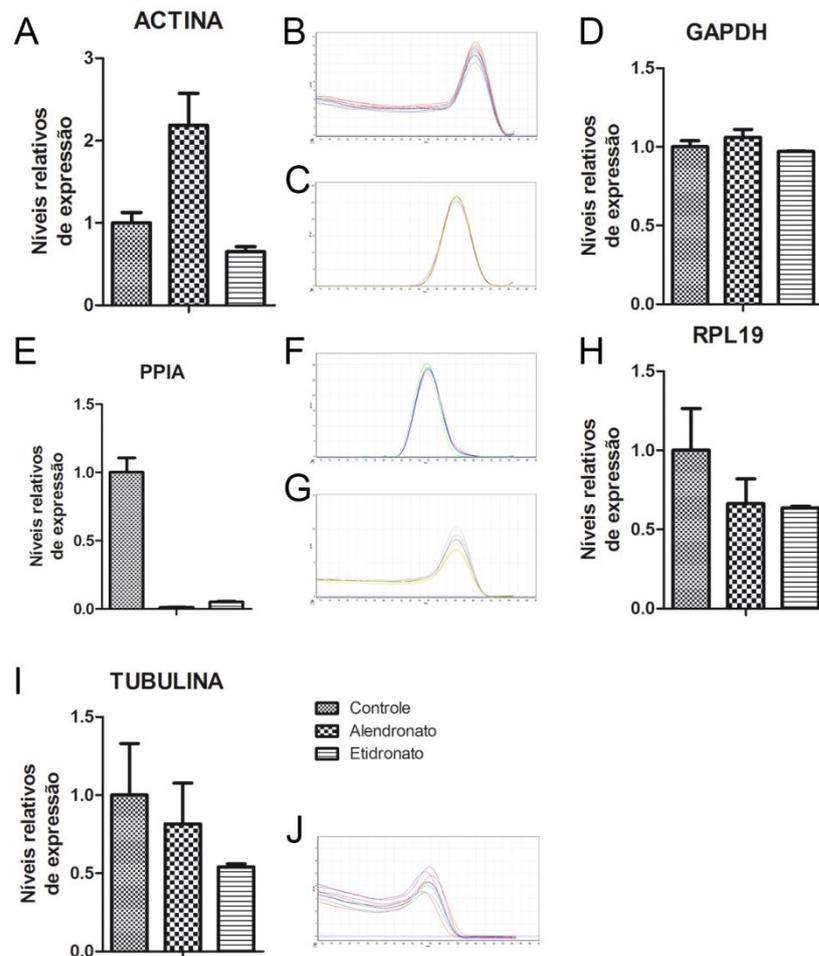


Figura 11. Teste de endógenos para RNA extraído do tecido de animais tratados ou não com bisfosfonatos. Em **A** expressão gênica de α -actina. Em **B** Curva de Melt de α -actina. Em **C** Curva de Melt de Gapdh. Em **D** expressão gênica de Gapdh. Em **E** expressão gênica de Ppia. Em **F** Curva de Melt de Ppia. Em **G** Curva de Melt de Rpl19. Em **H** expressão gênica de Rpl19. Em **I** expressão gênica de β -tubulina. Em **J** Curva de Melt de β -tubulina. Os níveis de expressão dos grupos controles foram normalizados para 1 e a expressão dos grupos tratados foram normalizados pelo grupo controle.

4.8.3.4 Genes de interesse

Para análise quantitativa da expressão gênica por RT-PCR *real time* (REIS, 2005), foram desenhados *primers* específicos para os genes referentes ao ciclo celular (Tabela 3), apoptose (Tabela 4), genes relacionados a transdução de sinal mediada por NF κ B (Tabela 5), envolvidos na osteogênese (Tabela 6) e na osteoclastogênese (Tabela 7). A eficiência e temperatura de *melting* foram testadas

para cada *primer* avaliado (Figuras 12 – 26). Cada reação de PCR foi realizada em triplicatas, utilizando-se para cada uma 50 ng de cDNA, 10 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies™) e *primers* em volume total de 25 µl em equipamento Gene Rotor Gene (Quiagen).

Tabela 3. Genes e *primers* relacionados ao ciclo celular.

Gene	Primer	TM	Eficiência
Mad2l1	Fw – GAAGTCCCAGAAAGCCATTCAG Rv – AATCAAATGAACCGTCTCTACAG	55°C	0,82
Cdk4	Fw – CATGTTGTACGGCTGATGGG Rv – AAGTTTGCATGAAGGAAATCTAGA	55°C	1
Mapk3	Fw – CAGACTCCAAAGCTCTTGATC Rv – CTGCCACTGGTTCATCTGCC	55°C	0,95
Smad3	Fw – TCGAGACACCAGTGCTACAC Rv – TAGCTAGTTTCTCCATCTTCCT	55°C	1

Tabela 4. Genes e *primers* relacionados a apoptose.

Gene	Primer	TM	Eficiência
MDM2	<i>Fw</i> – AGTAAGTGACCATTCTGCC <i>Rv</i> – CCCGATAGACCTCATCATTG	55°C	1
Casp3	<i>Fw</i> – CATGTCGATGCAGCTAACAC <i>Rv</i> – GATCTCCATGACTTAGAATCACTC	55°C	1
p53	<i>Fw</i> – AGAAGACTGGATAACTGTCATTG <i>Rv</i> – TACAACCTCTGCAACATCCGG	55°C	1
Myc	<i>Fw</i> – ACAGCCTTCTCTTCTTCCCC <i>Rv</i> – ACGGACACCACATCAATTTCTTTC	55°C	0,89

Tabela 5. Genes e *primers* relacionados à transdução de sinal mediado por Nfκβ.

Gene	Primer	TM	Eficiência
NfκB1	<i>Fw</i> – CACGAAATCAAAGACAAGGCA <i>Rv</i> – CCCCGTAAGCAGGAAATCAG	55°C	0,99
NfκB2	<i>Fw</i> – GCCTCAAACCTGAAGATTTCC <i>Rv</i> – CGAACCTCAATGTCATCTTTCTG	55°C	1

Tabela 6. Genes e *primers* relacionados à osteogênese.

Gene	<i>Primer</i>	TM	Eficiência
Runx2	<i>Fw</i> – AGA GTC AGA TTA CAG ATC GACC <i>Rv</i> – GTG TCA TCA TCT GAA ATA CCGC	55°C	0,96
Spp1	<i>Fw</i> – TAA GCA AGA AAC TCT TCC CGA A <i>Rv</i> – AGG ACT CAT CAG ATT CAG GCT	55°C	0,98

Tabela 7. Genes e *primers* relacionados à osteoclastogênese.

Gene	<i>Primer</i>	TM	Eficiência
Tnfrsf11a (Rank)	<i>Fw</i> – ATCAACATCCCTTGCAGCCT <i>Rv</i> – CTGAGACTGGGCAAGTAAACTC	55°C	0,99
Tnfsf11 (Rankl)	<i>FW</i> – ACTATGATGGAAGGTTCTGGG <i>Rv</i> – GAGAGGACAGACTGACTTTATTG	55°C	1
Tnfrsf11b (OPG)	<i>Fw</i> – TAAGATCATCCAAGACATTGAAG <i>Rv</i> – GTGATCCTCCACAAGCTCCC	57°C	0,96

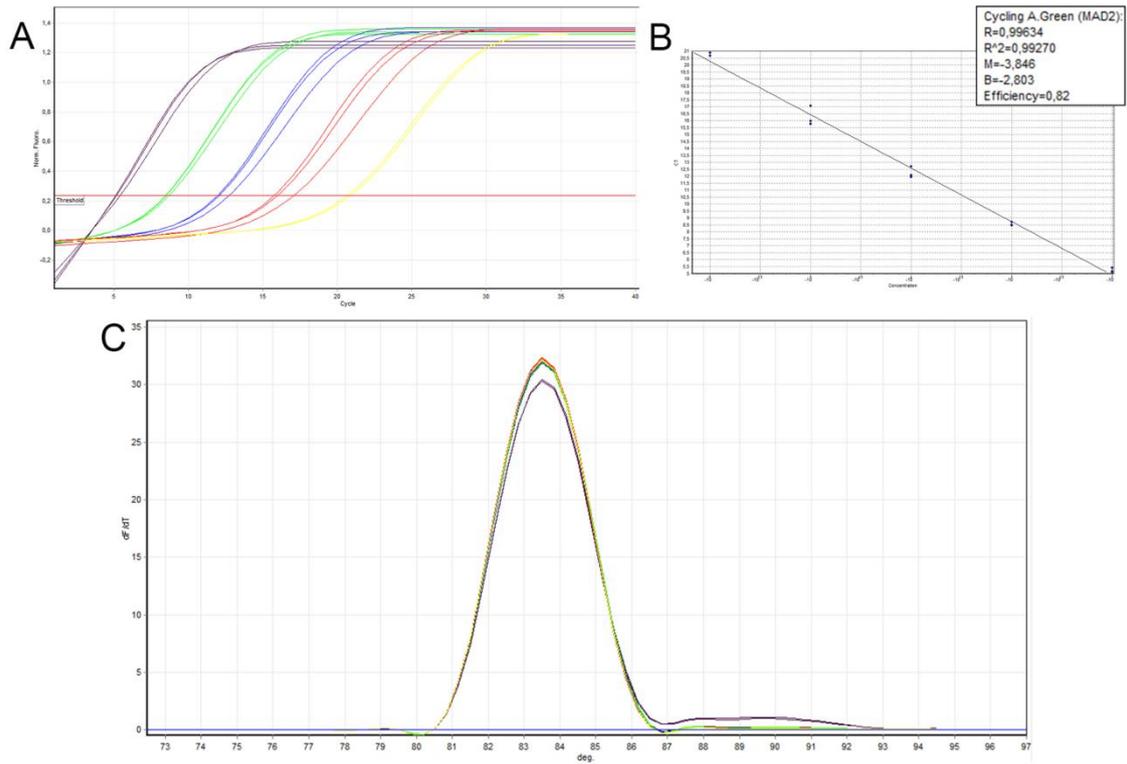


Figura 12. Eficiência de Mad211. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

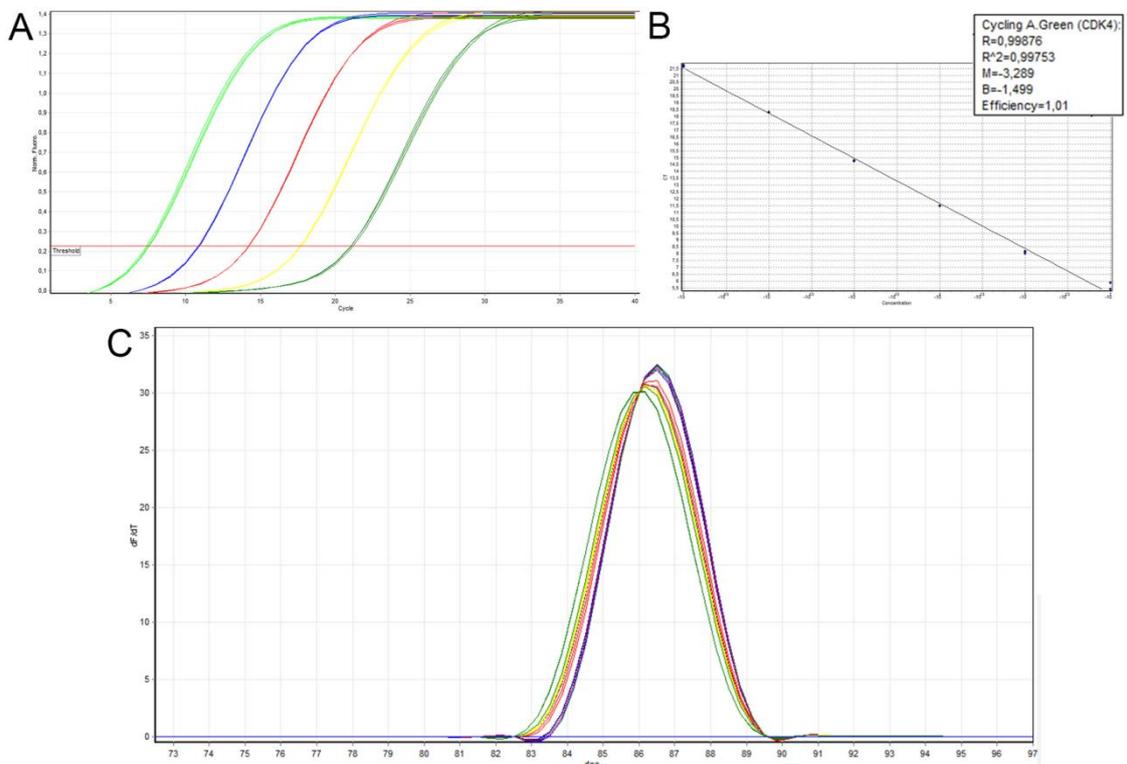


Figura 13. Eficiência de Cdk4. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

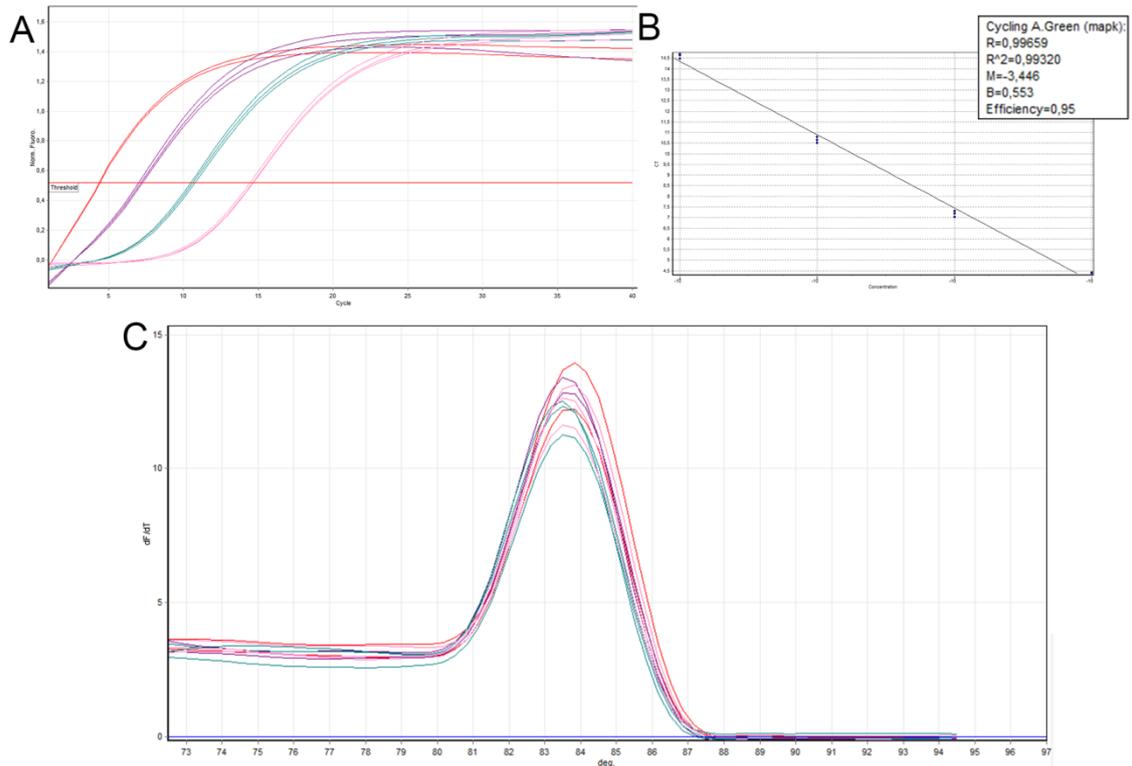


Figura 14. Eficiência de Mapk3. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

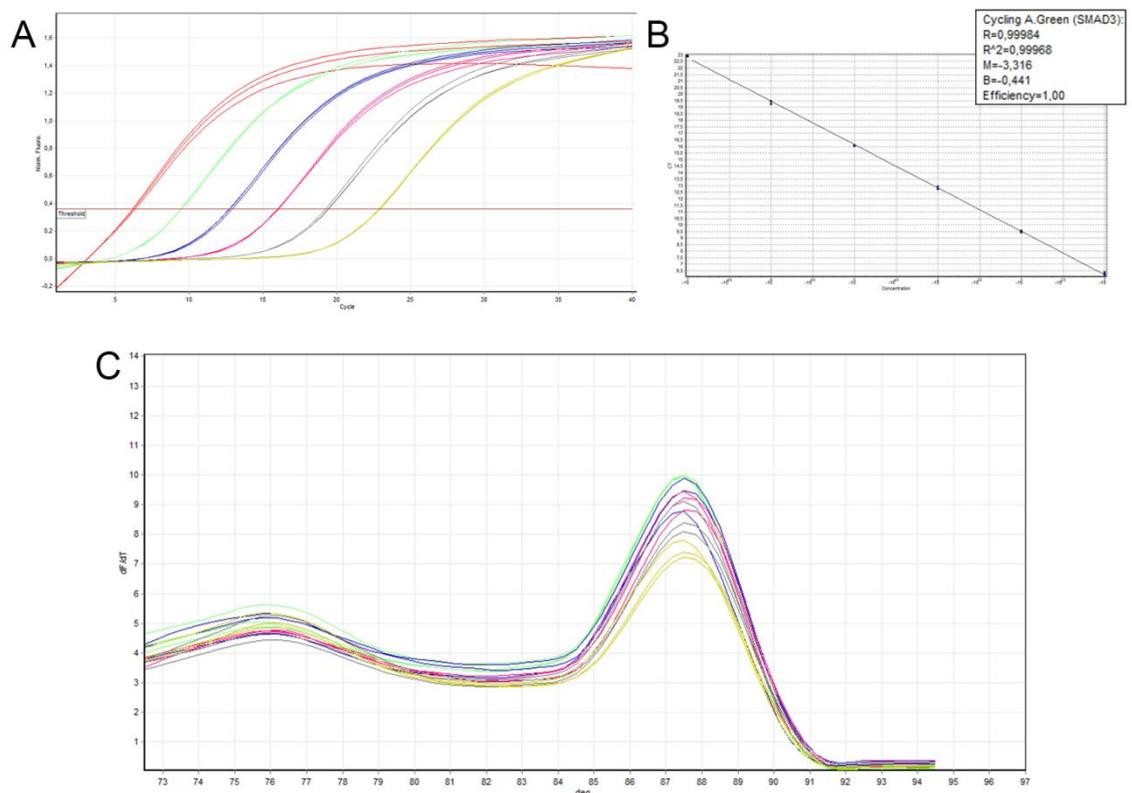


Figura 15. Eficiência de Smad3. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

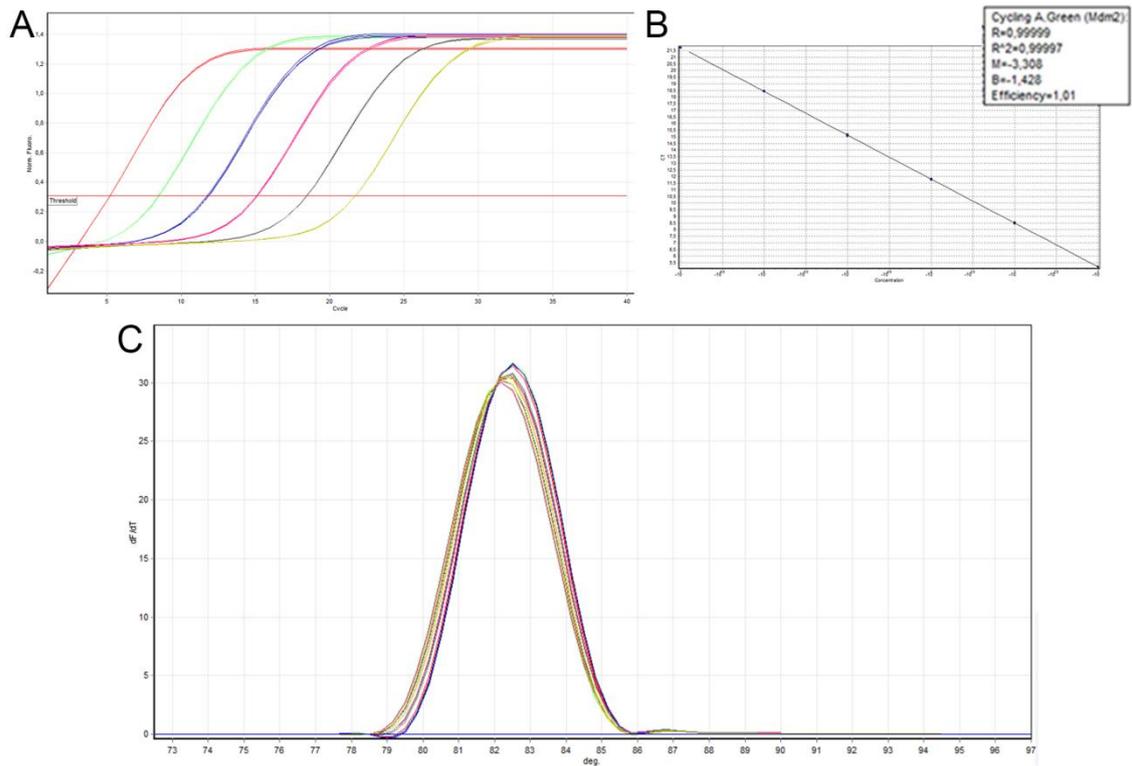


Figura 16. Eficiência de Mdm2. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

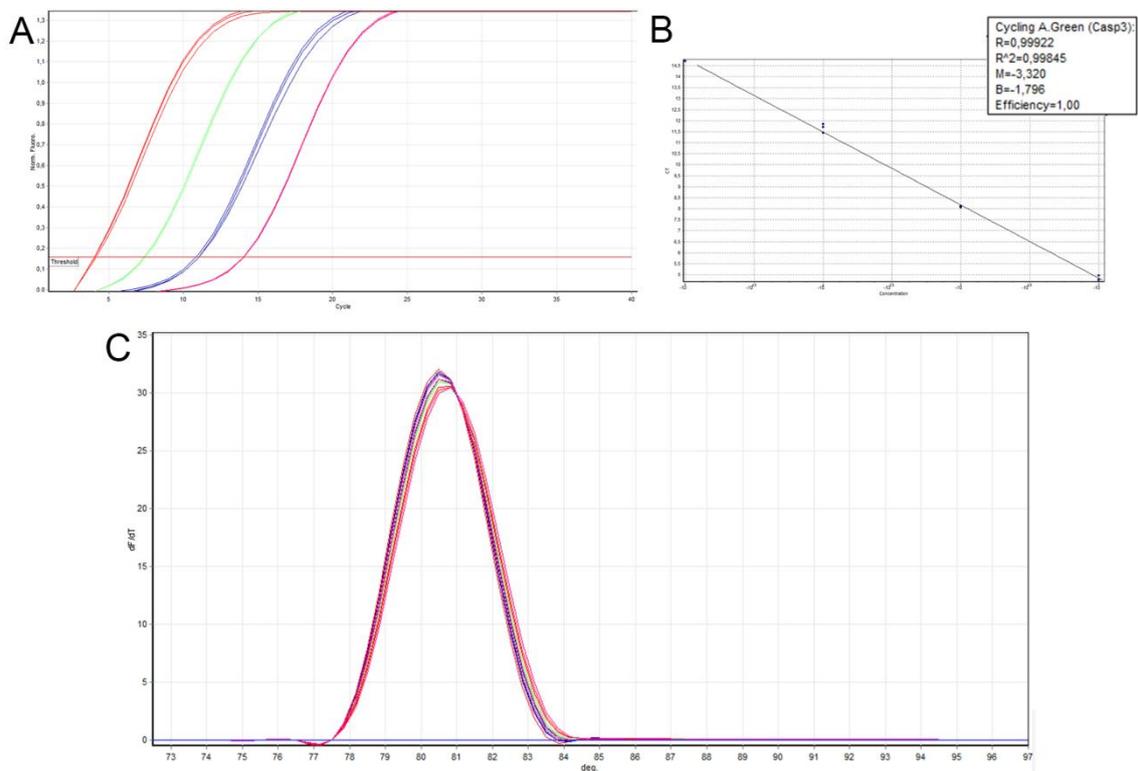


Figura 17. Eficiência de Casp3. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

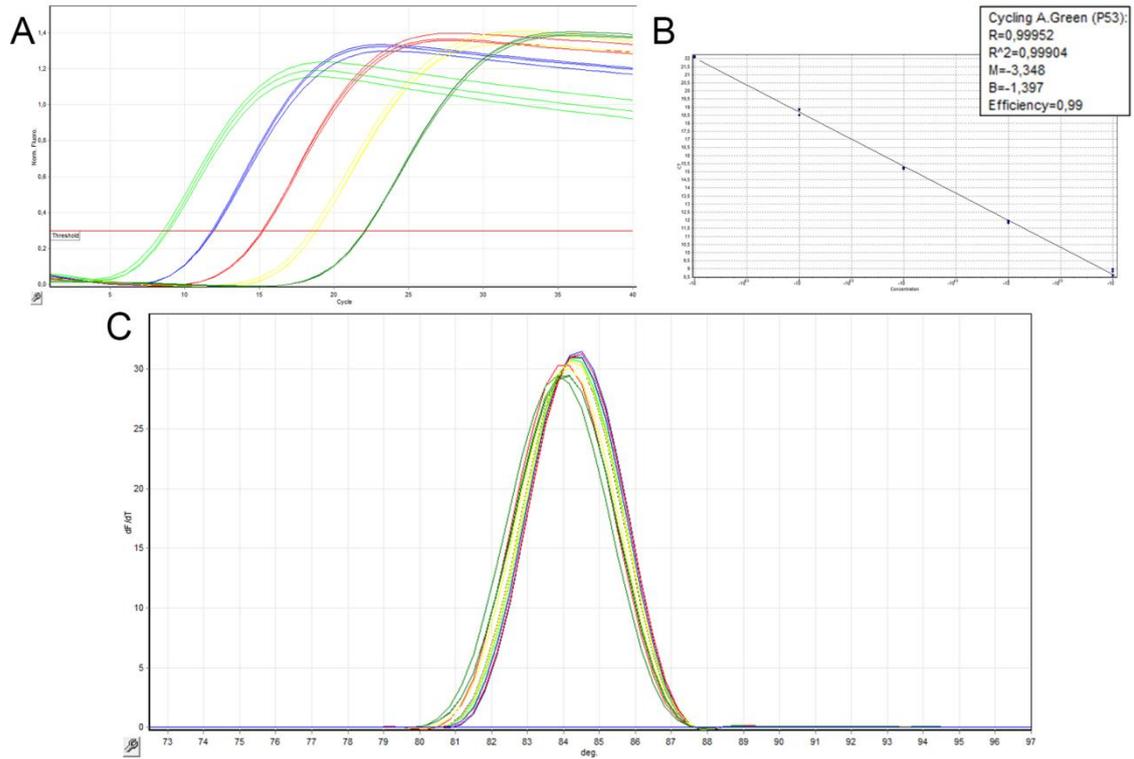


Figura 18. Eficiência de p53. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

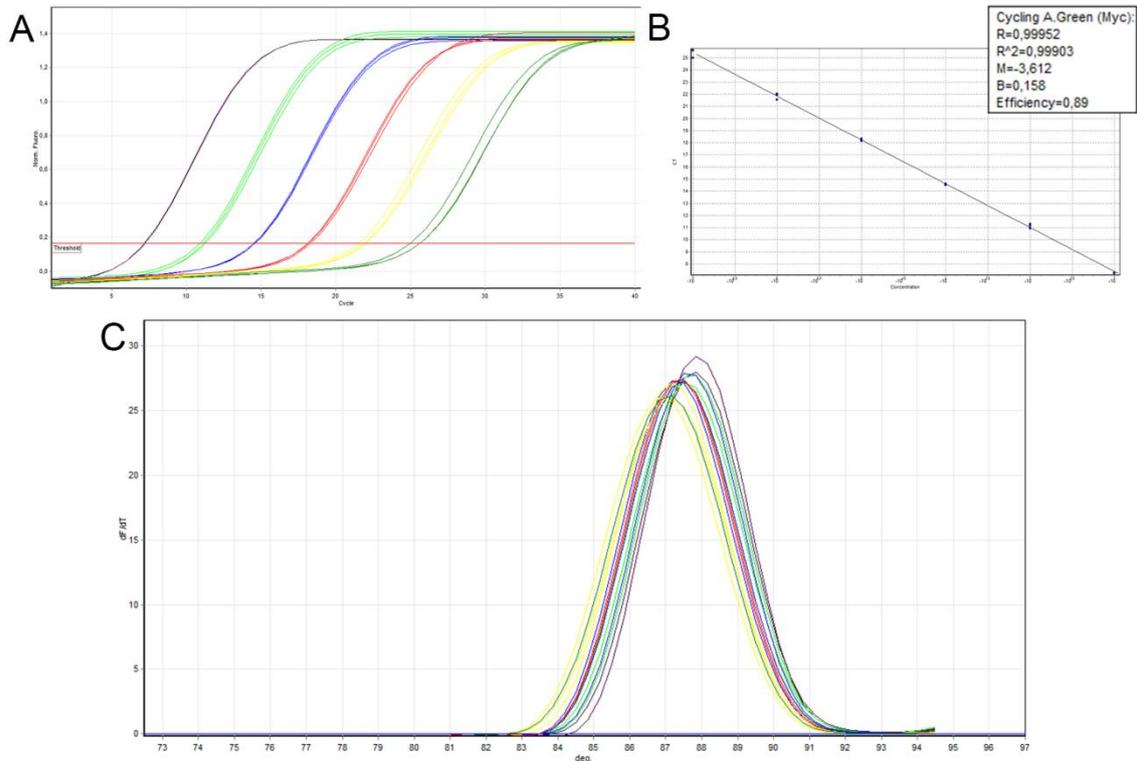


Figura 19. Eficiência de Myc. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

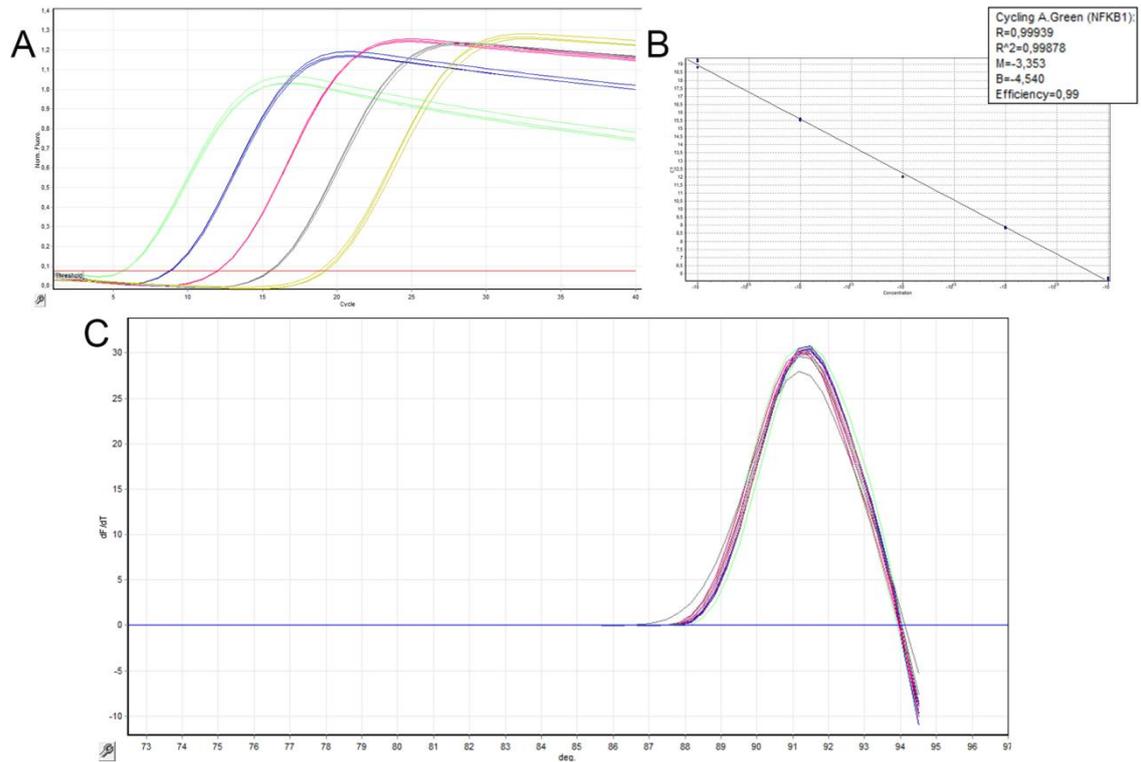


Figura 20. Eficiência de NfκB1. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

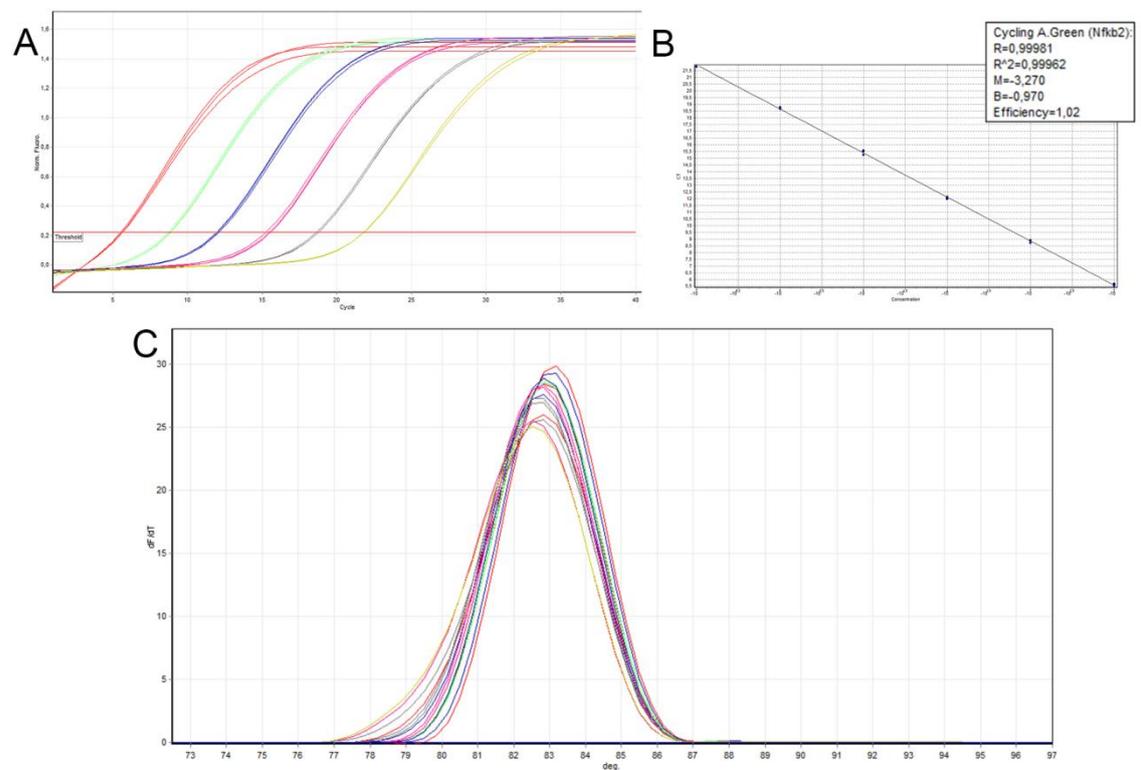


Figura 21. Eficiência de NfκB2. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

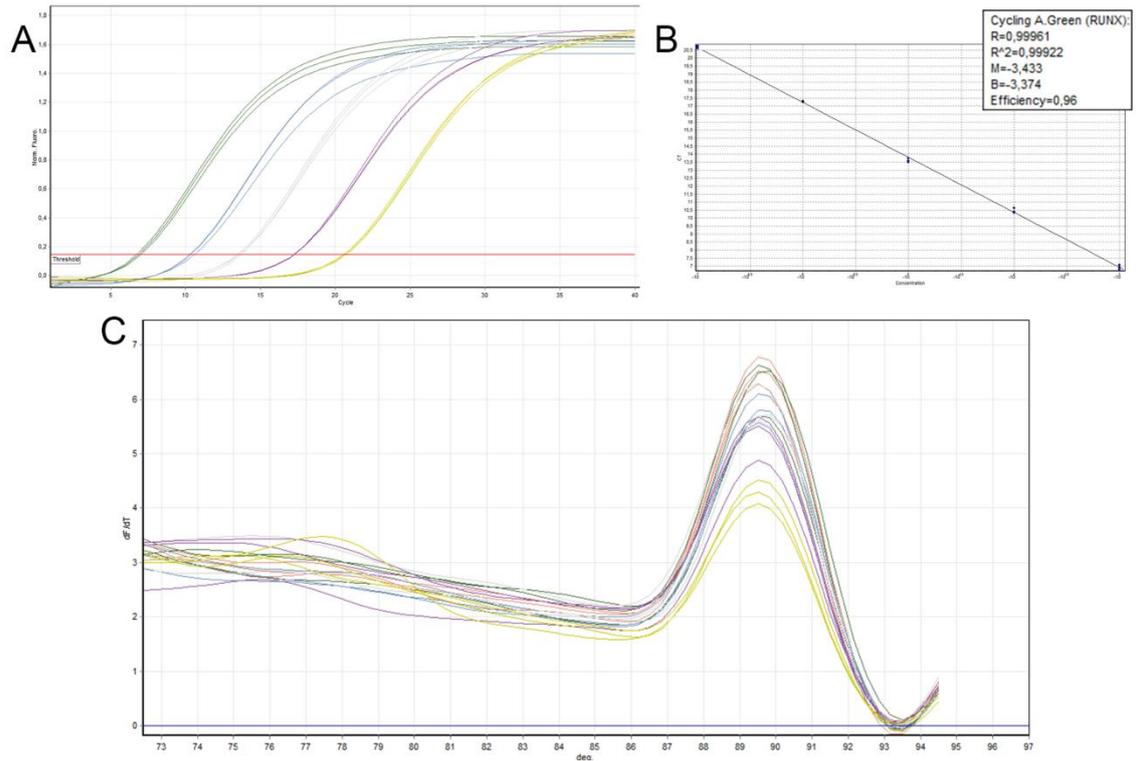


Figura 22. Eficiência de Runx2. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

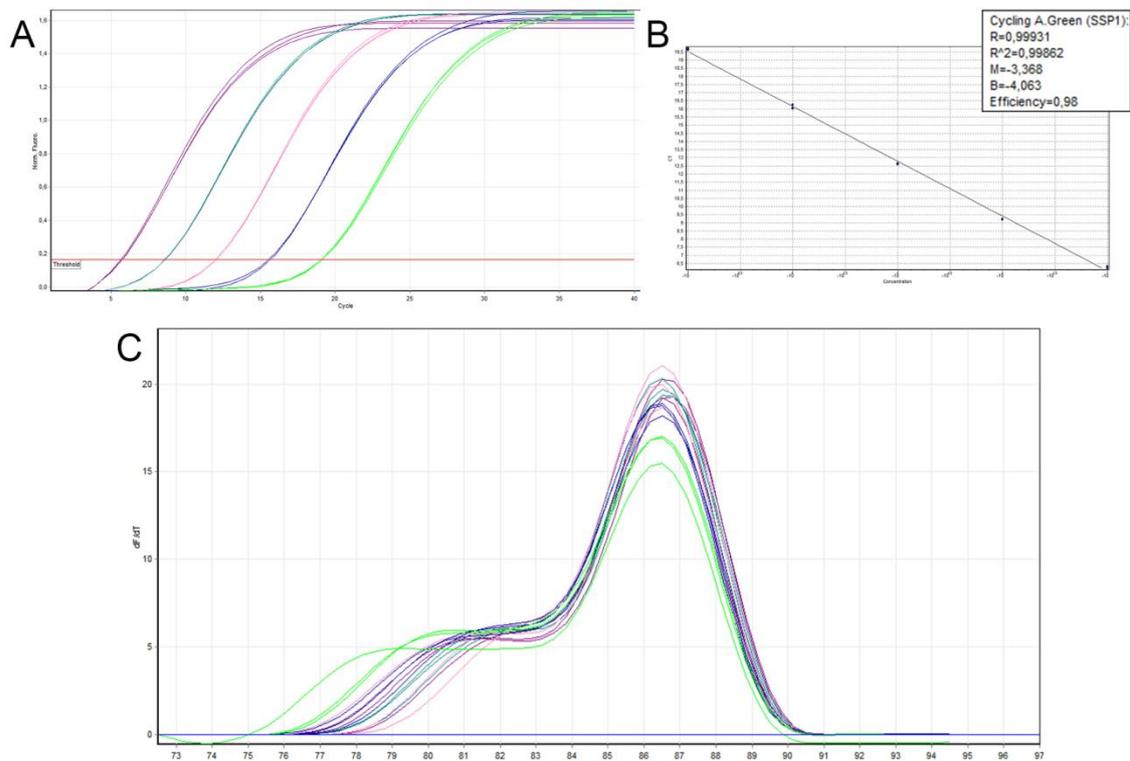


Figura 23. Eficiência de Spp1. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

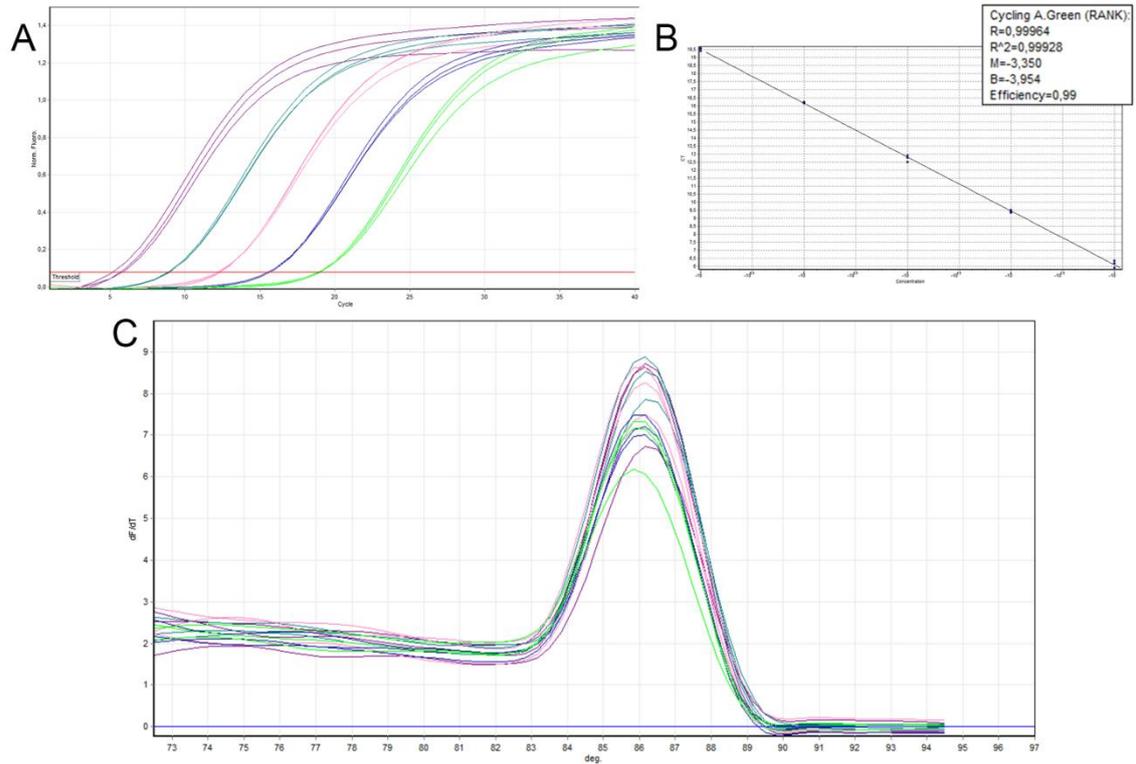


Figura 24. Eficiência de Rank. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

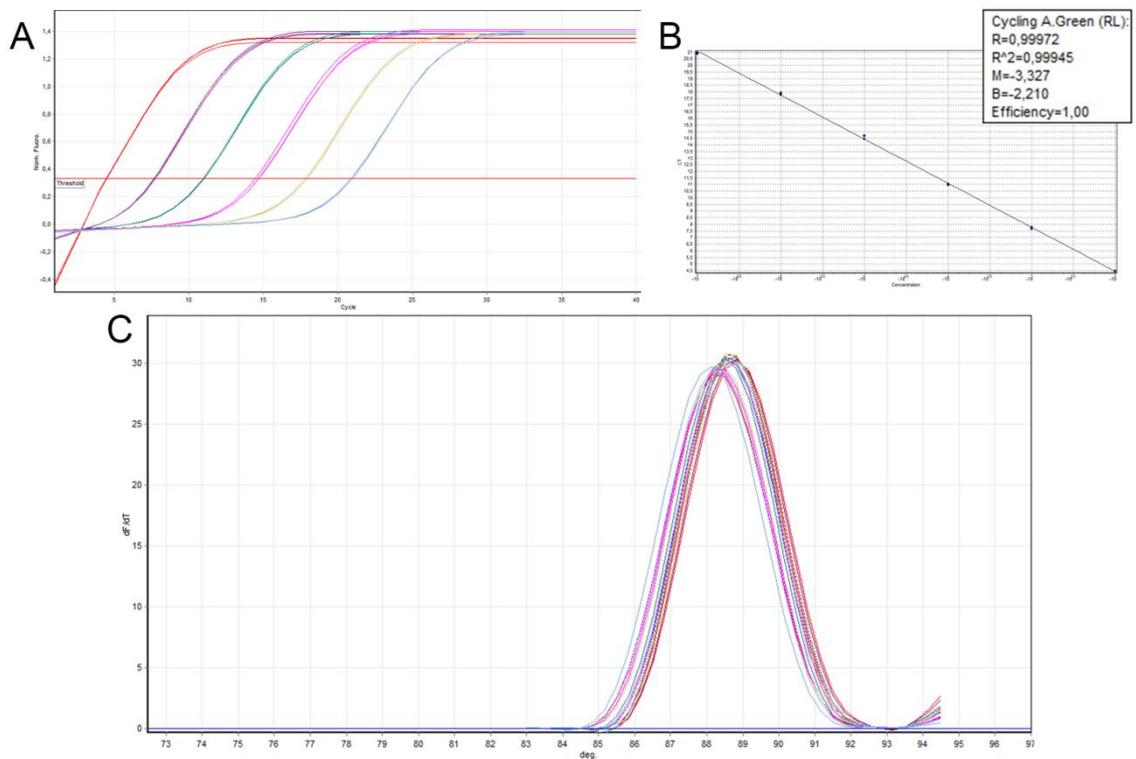


Figura 25. Eficiência de RankI. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

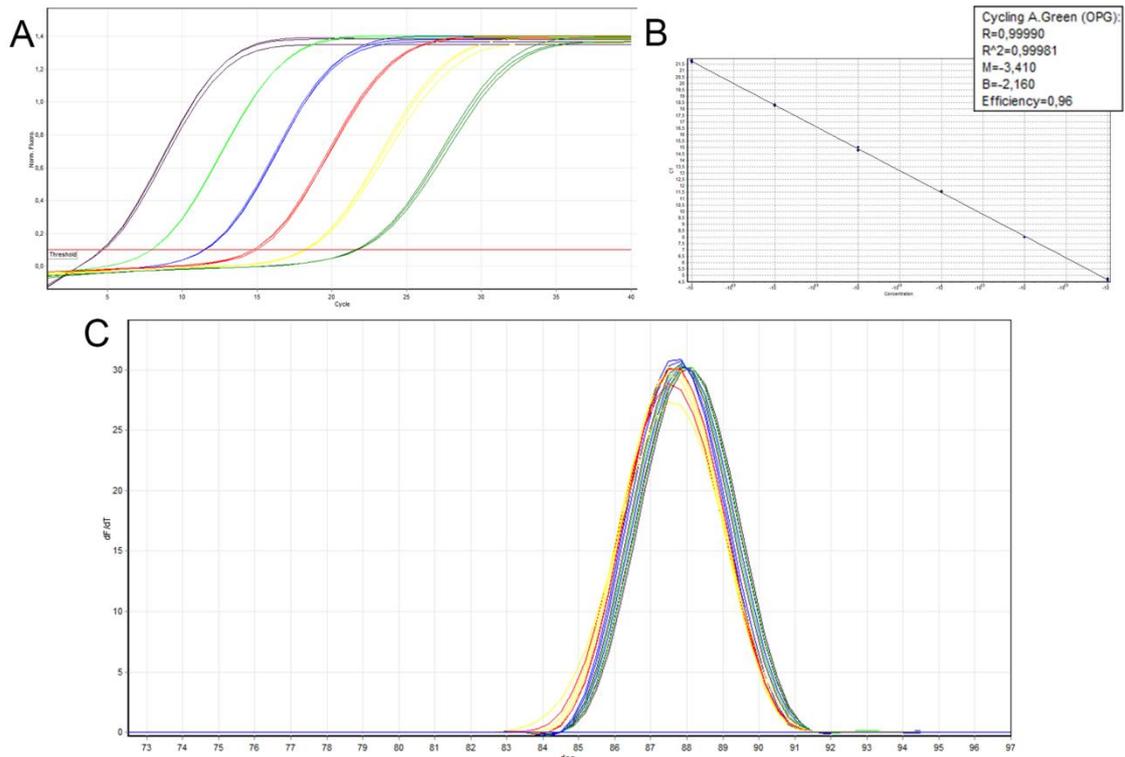


Figura 26. Eficiência de Opg. Em **A** Curvas de diluição do produto do PCR precipitado. Em **B** Gráfico com os valores da reta e da eficiência. Em **C** Curva de Melt da reação.

Os valores obtidos na reação de PCR *real time* forma expressos em *threshold cycle* (CT). A expressão de cada gene alvo foi determinada utilizando-se o programa REST 2009 (Quiagen) levando em consideração os valores de CT do gene endógeno obtido durante o mesmo ensaio do gene alvo e a eficiência previamente obtida.

4.9 Expressão Proteica

4.9.1 Extração de Proteínas Totais

Após serem macerados em N_2 , os cõndilos dos fêmures e tibias, foram homogeneizados em tampão de extração (100M m kCl, 10 mM Hapes, 3 mM MgCl,

5 mM EDTA, glicerol 10%, 1 mM DTT, 10% SDS) e inibidor de protease. O sobrenadante foi coletado após centrifugação e a concentração de proteínas totais foi estimada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.9.2 Western Blotting

A expressão de proteínas RANK, RANKL e OPG foi avaliada após extração de proteínas totais das células. Cerca de 50 µg de proteínas totais foram eluídas 1:5 (v:v) em tampão de amostras 5 x (Tris 0,5 M pH 6.8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 1% e β-mercaptoetanol), submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando equipamento de transferência semi-úmido (Trans Blot® SD semi-dry), (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e tampão Towbin. As membranas foram incubadas com anticorpos primários e secundários específicos (tabela 8) e em seguida, as proteínas foram reveladas com ECL PLUS™ *Western Blotting Analysis System* (GE – *Healthcare*, General Electric Company, Fairfield, CT, USA), segundo especificações do fabricante, em equipamento G:Box Chemi-XR5 (Syngene, Cambridge, United Kingdom). A expressão da proteína β-actina foi utilizada como controle em todos os ensaios. O valor densitométrico das bandas encontradas foram estimados utilizando o software ImageQuant® (Molecular Dynamics), normalizados pela expressão de actina e expressos em unidades arbitrárias.

Tabela 8. Anticorpos

Anticorpo	Origem	Fabricante - código
Anti-RANK	<i>Rabbit</i>	Santa Cruz Biothecnology, Inc - sc-9072
Anti-RANKL	<i>Rabbit</i>	Santa Cruz Biothecnology, Inc - sc-9073
Anti-OPG	<i>Rabbit</i>	Santa Cruz Biothecnology, Inc - sc-11383
Anti- β -actina-IgG	<i>Mouse</i>	Santa Cruz Biothecnology, Inc - sc-47778
Anti-mouse-IgG	Sheep	GE – <i>Healthcare</i> - RPN2124
Anti-rabbit-IgG	Donkey	GE – <i>Healthcare</i> - RPN2124

4.10 Obtenção da Cultura Primária de Osteoclastos

As linhagens de osteoclastos utilizadas neste experimento foram obtidas a partir de tíbia e fêmur de ratos Wistar de 3 semanas de idade, como procedimento descrito por Holliday e colaboradores (HOLLIDAY, et al., 1995), e cultivadas com meio de cultivo α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1,25-dihidroxitamina D₃ a 10⁻⁸M, sobre discos de osso ou não. A cada três dias o meio de cultivo foi trocado e ao décimo dia, foi realizado o ensaio histoquímica para identificação da TRAP a fim de confirmar o surgimento dos osteoclastos. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.11 Método Histoquímico da Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente

Após cultivo das células, no décimo dia as mesmas foram fixadas com 2% de paraformaldeído sobre placa de gelo. Em seguida, as células foram permeabilizadas

com 1% de triton x 100 por 10 minutos, incubadas com solução de citrato por 15 minutos, neste período foi preparada a solução de coloração (1% solução granada permanente GBC + 1% solução de nitrito de sódio + 1% solução de ácido fosfórico naftol AS-BI + 2% solução de tartaratos + 4% solução de acetato + 91% de água destilada). Após lavagem as células foram incubadas com a solução de coloração por 60 minutos à 37 °C. Após a lavagem da solução de coloração com PBS as células foram mantidas em solução de acetato à 4% em 4 °C até a documentação.

4.12 Tratamento da Cultura Primária com Bisfosfonatos

As linhagens primárias receberam no dia de sua extração meio de cultivo como descrito no item “Obtenção da Cultura Primária de Osteoclastos” acrescido de etidronato sódico ou alendronato sódico, sendo o meio trocado a cada dois dias, as doses foram eleitas após análises de viabilidade celular (SAMANNA, 2007).

4.13 Análise da Viabilidade Celular

As células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $1,0 \times 10^6$ células/cm² e cultivadas por 10 dias, como descrito por Ostrov e colaboradores (OSTROV, et al., 2009). O MTT (Amresco, Solon, EUA) foi adicionado na concentração de 2,5 mg/mL e então incubado por 3 horas. Após este período, o meio foi removido e as células ressuspensas com 200 µl de DMSO e a leitura do sinal foi realizada em espectrofotômetro (Du-800 spectrophotometer, Beckman Coulter) a A₅₉₅. A intensidade de cor produzida foi diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

4.14 Expressão Gênica

4.14.1 Extração de RNA Total da Cultura Primária

RNA total foi extraído das células em cultura primária, tratadas ou não com bisfosfonatos, baseado na técnica desenvolvida por Chomczynski e Sacchi (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987), usando reagente Trizol (Life Technologies).

O mesmo método de quantificação de RNA utilizado no material extraído dos tecidos foi utilizado para quantificar o RNA extraído das células.

4.14.2 Transcrição Reversa

As reações de transcriptase reversa do material extraído da cultura de células foram realizadas da mesma forma que do material extraído dos tecidos.

4.14.3 RT-PCR Quantitativo em Tempo Real

4.14.3.1 Escolha do gene endógeno

Para a escolha do melhor gene endógeno para a cultura de células foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 2, a expressão gênica comparada entre os três grupos de trabalho, controle, alendronato e etidronato. Cada reação de PCR foi realizada em triplicatas, utilizando-se para cada uma 50 ng de cDNA, 10 µl de SYBR®Green PCR Master Mix (Life Technologies™) e *primers* em volume total de 25 µl em equipamento Gene Rotor Gene (Quiagen). O gene endógeno escolhido foi o Gapdh, que apresentou menor variação entre os grupos como mostrado na figura 27.

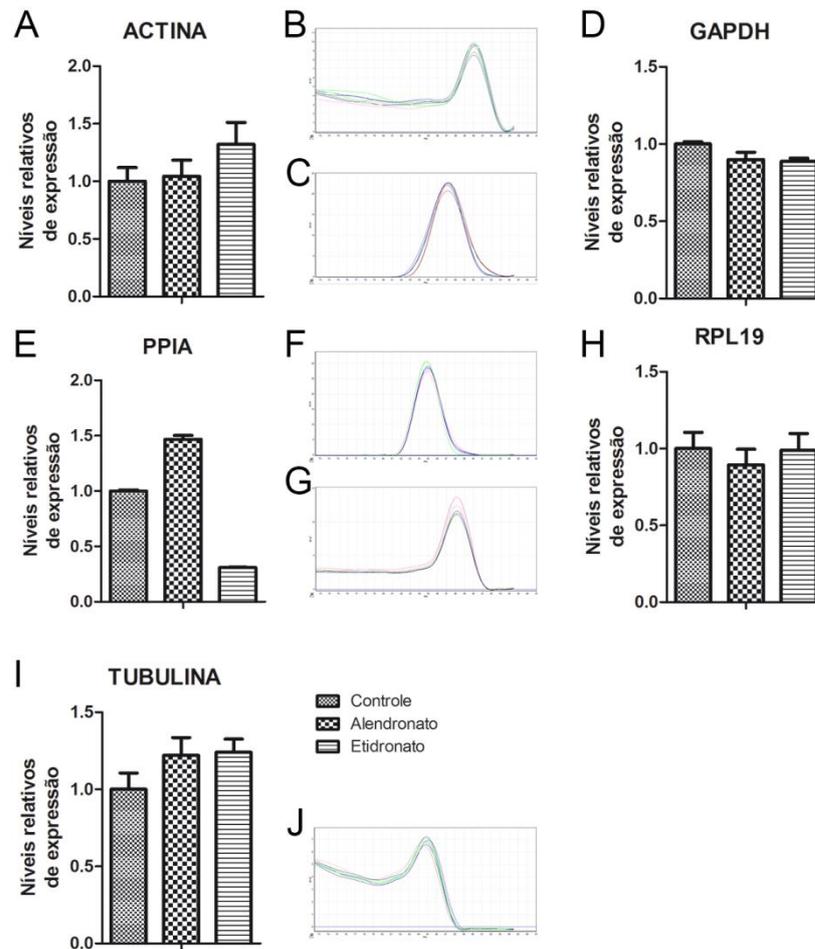


Figura 27. Teste de endógenos para RNA extraído da cultura de células tratadas ou não com bisfosfonatos. Em **A** expressão gênica de α -actina. Em **B** Curva de Melt de α -actina. Em **C** Curva de Melt de Gapdh. Em **D** expressão gênica de Gapdh. Em **E** expressão gênica de Ppia. Em **F** Curva de Melt de Ppia. Em **G** Curva de Melt de Rpl19. Em **H** expressão gênica de Rpl19. Em **I** expressão gênica de β -tubulina. Em **J** Curva de Melt de β -tubulina. Os níveis de expressão dos grupos controles foram normalizados para 1 e a expressão dos grupos tratados foram normalizados pelo grupo controle.

4.14.3.2 Genes de interesse

Para a análise quantitativa da expressão gênica por RT-PCR em tempo real, foram utilizados os mesmos *primers* das Tabelas 3-7. Os procedimentos foram os mesmos realizados para a obtenção dos resultados *in vivo*.

4.15 Expressão Proteica

4.15.1 Extração de Proteínas Totais

Células foram removidas com PBS e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) com auxílio de *scraper*. Após centrifugação o pellet foi eluído em tampão de lise RIPA (20 mM de Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% Sodium Deoxycholate, 1 mM EDTA e 0,1% SDS) e inibidor de protease. O sobrenadante foi coletado após centrifugação e a concentração de proteínas totais será estimada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

As reações de *Western Blotting* do material extraído da cultura de células foram realizadas da mesma forma que do material extraído dos tecidos, utilizando os mesmos anticorpos.

4.16 Análise estatística

Os resultados da pesagem dos animais, contagem de células TRAP, MTT e *Western Blotting* estão apresentados como média e (+/-) desvio padrão e foram submetidos à análise de variância seguida por teste *t de Bonferroni* ou *Student Newman-Keuls* para a comparação dos resultados entre os grupos utilizando o programa graphpad. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 In vivo

5.1.1 Peso dos animais durante o tratamento

Todos os animais usados no presente estudo sobreviveram durante o período de tratamento até o dia estabelecido para a eutanásia. Os animais foram pesados diariamente para a obtenção da dose exata de administração, apesar dos animais pertencentes ao grupo controle não necessitarem de dose calculada. Os animais que receberam solução salina, grupo controle (CTR) e os animais que receberam alendronato sódico, grupo alendronato (ALN) tiveram um ganho de peso similar durante o período de tratamento, e os animais que receberam etidronato sódico, grupo etidronato (ETN) apresentaram uma tendência ao menor ganho de peso em comparação com os outros grupos (Figura 28). Os animais que receberam etidronato tiveram uma diferença significativa no ganho de peso quando comparados com os animais que receberam alendronato somente no período de tratamento entre o 10° e o 15° dia. Entretanto, esta tendência, de apresentar menor ganho de peso, no grupo ETN permaneceu durante todo o tratamento até a eutanásia dos animais.

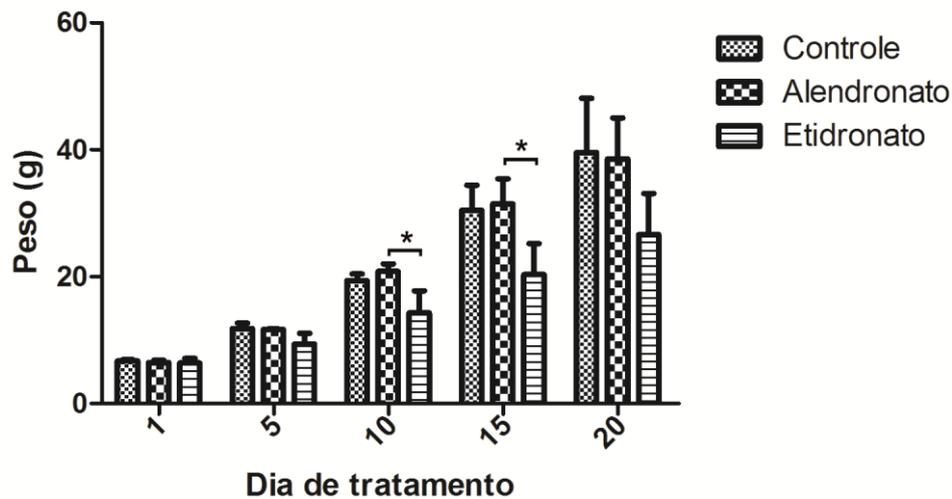


Figura 28. Varição de peso dos animais durante o tratamento com bisfosfonatos. Os dados mostram o peso a cada 5 dias, os animais que receberam solução salina (controle) a alendronato de sódio (Alendronato) apresentam um ganho de peso similar e os animais que receberam etidronato de sódio (Etidronato), estes mostram um ganho de peso inferior durante o período entre 10 e 15 dias de vida quando comparados com o grupo alendronato (*= $p < 0,05$), nos outros períodos avaliados (exceto no primeiro dia) este grupo manteve a tendência ao menor peso em comparação aos outros grupos.

5.1.2 Análise da 6Radiografia

As análises das radiografias das tíbias e fêmures obtidas no dia da eutanásia revelaram que a zona de ossificação dos animais que receberam etidronato foi mais radiolúcida que dos animais que receberam alendronato e dos animais controle. Em contrapartida, os animais que receberam alendronato apresentaram, na mesma área de análise, maior radiopacidade quando comparado com os grupos controle e etidronato. A lamina epifiseal no grupo ALN apareceu mais espessa que nos demais grupos e a mesma estrutura apresentou-se mais fina no grupo ETN (Figura 29).

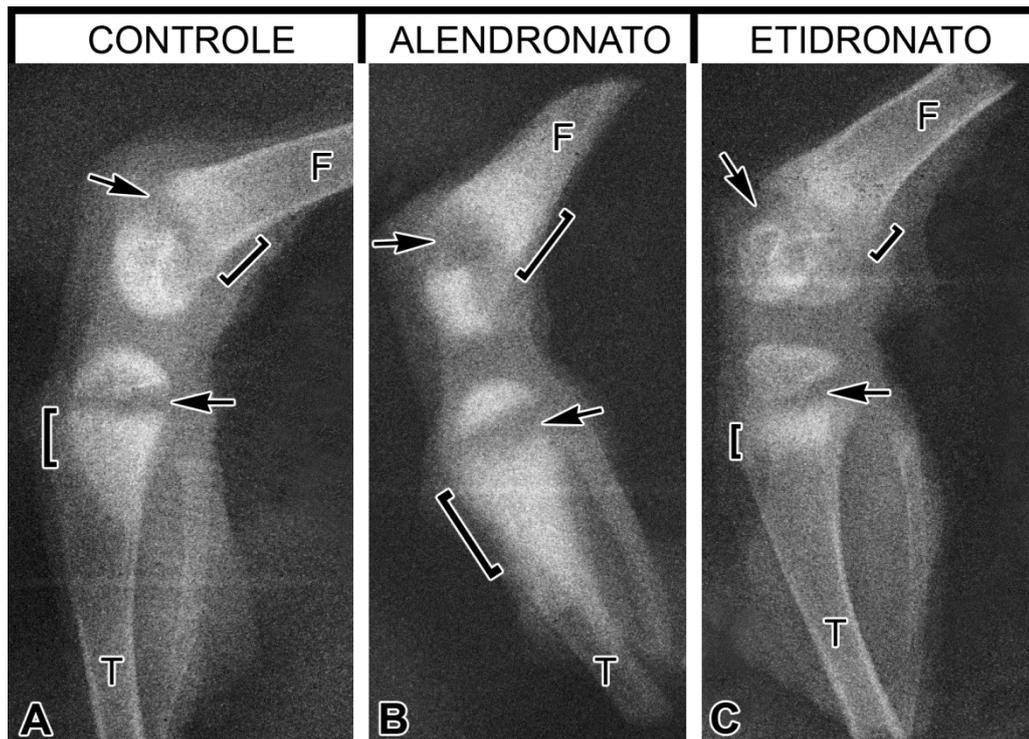


Figura 29. Radiografia do joelho de ratos. Observamos em **A**, a lamina epifiseal (seta) e a zona de ossificação (colchetes) do animal controle. Em **B**, a lamina epifiseal (seta) de um animal tratado com alendronato um pouco maior que a mesma área do animal controle, entretanto a zona de ossificação (colchetes) é maior e mais radiopaca. Em **C**, a lamina epifiseal dos animais tratados com etidronato é pouco aparente (seta), a zona de ossificação (colchetes) apresenta-se mais estreita que a mesma região do grupo controle, mostrando uma extensa área radiolúcida. F, fêmur. T, tibia.

5.1.3 Área de cartilagem calcificada

A lamina epifiseal do grupo controle, assim como a do grupo alendronato apresentaram morfologia típica com zona de repouso bem definida, condrócitos proliferativos, condrócitos hipertróficos e zona de ossificação típicas (Figuras 30A-B). No grupo etidronato a lamina epifiseal aparece mais estreita, com aparência desorganizada. A zona de repouso esteve quase ausente, aparecendo, em seguida, poucos condrócitos proliferativos; alguns condrócitos na zona de ossificação (Figura 30C).

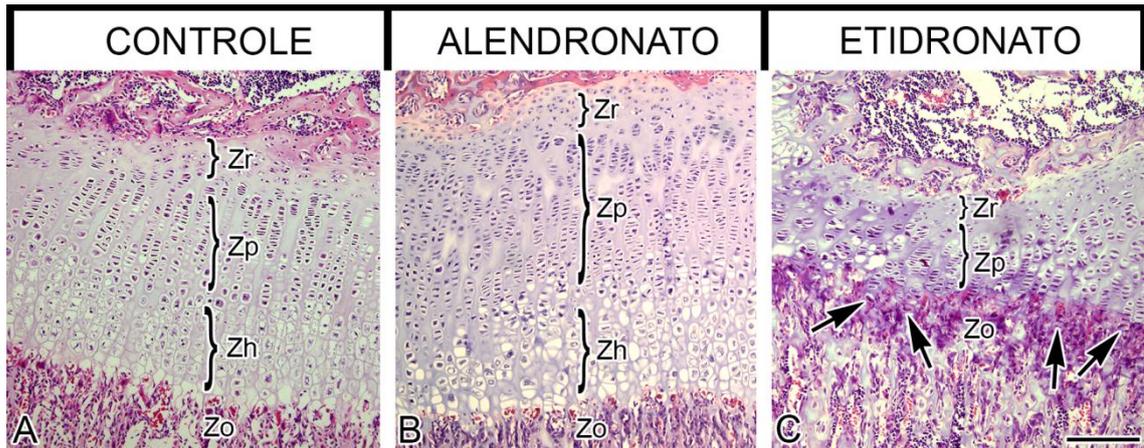


Figura 30. Lamina epifiseal. Microscopia de luz mostrando a lamina epifiseal de um animal controle, em **A**, e de um animal tratado com alendronato, em **B**, onde a zona de repouso (Zr) zona de proliferação (Zp), zona hipertrófica (Zh) e zona de ossificação (Zo) apresentam organização similar. Em **C**, a lamina epifiseal de um animal tratado com etidronato não há formação das três zonas organizadas, como as observadas nos demais grupos, pode-se observar condrócitos (seta) presentes na zona de ossificação (Zo). Coloração por hematoxilina e eosina. Barra = 200 μ m.

5.1.4 Análise morfológica

Foi observado osso trabecular na zona de ossificação em todos os grupos (Figura 31). A presença de cavidades medulares foi mais evidente nos grupos CTR e ETN, enquanto o grupo ALN apresentou trabéculas espessas e, conseqüentemente, suas cavidades medulares eram mais escassas. O grupo CTR apresentou abundante matriz óssea depositada nos tabiques de cartilagem (Figura 31A-B). Os animais do grupo ALN apresentaram uma fina camada de matriz óssea depositada sobre os tabiques de cartilagem (Figura 31C-D), enquanto no grupo ETN a presença de cartilagem foi mais abundante, com pouca matriz óssea depositada (Figura 31E-F). Ambos os grupos tratados apresentaram extensa área de cartilagem calcificada nas trabéculas da região das metáfises, enquanto no controle esta área apresentava osso abundante nas trabéculas.

Figura 31. Histologia da zona de ossificação. Microscopia de luz mostrando em **A**, **C** e **E** visão do menor aumento do osso trabecular na zona de ossificação. **B**, **D** e **F** maior aumento das trabéculas da zona de ossificação. Em **A**, espécime controle, quantidade e espessura esperadas de trabéculas para a região e idade dos animais (setas), em **B** a matriz óssea (MO) aparece bem discriminada, o inserto ilustra a matriz óssea (coloração azul). Em **C**, o grupo tratado com alendronato apresenta uma grande quantidade de trabéculas espessas (setas), em **D**, presença de menos matriz óssea (MO) que os animais controle e uma grande área com matriz de cartilagem calcificada (Cc), o detalhe ilustra a presença de uma fina camada de matriz óssea (coloração azul) sobre a matriz de cartilagem calcificada (coloração rosa). Em **E**, animal tratado com etidronato exibindo trabeculado fino (setas), e em **F** poucas ou ausentes regiões com uma fina camada de matriz óssea e extensa área com matriz de cartilagem calcificada (Cc) presença de osteoblastos (Ob) e o detalhe ilustra uma fina camada de matriz óssea (coloração azul) sobre a matriz de cartilagem calcificada (coloração rosa). Cm, cavidade medular. Oc, osteoclasto. Coloração por hematoxilina e eosina. A, C e E: Barra = 500 μ m; B, C e F: Barra = 50 μ m.

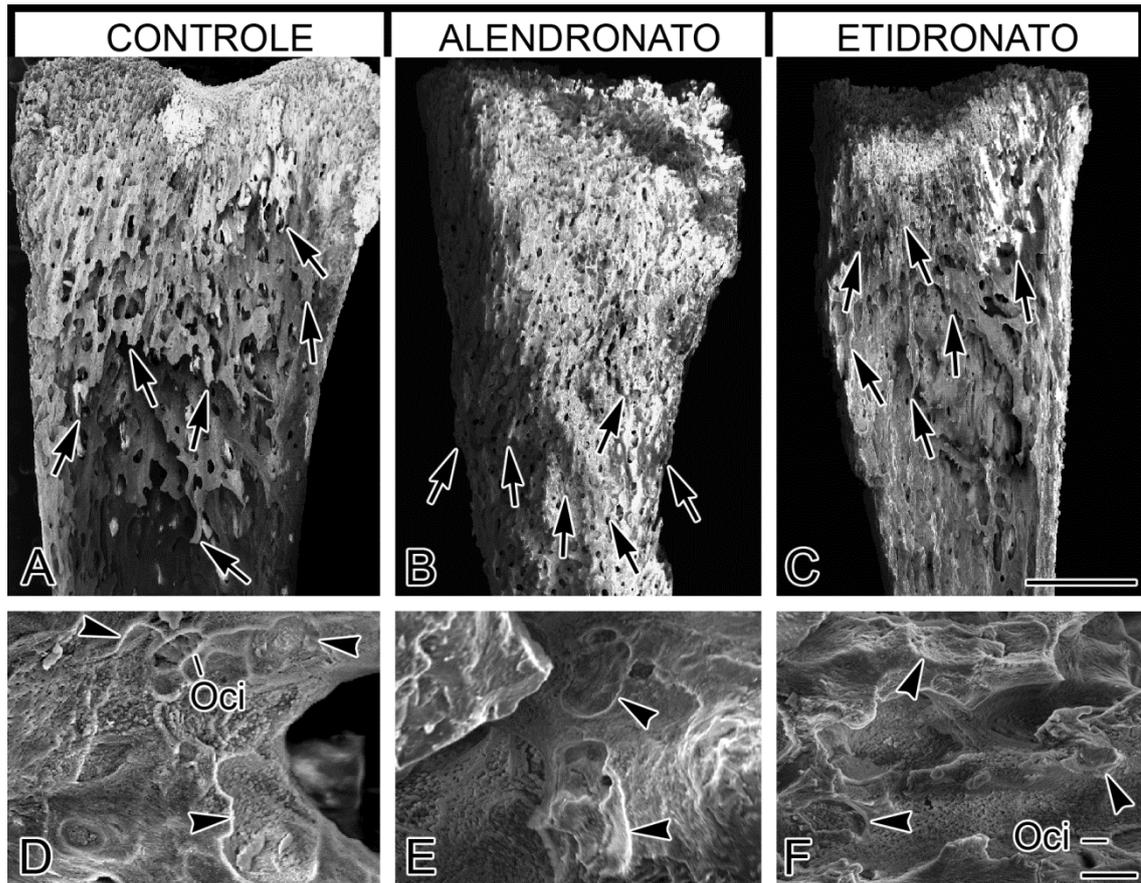


Figura 32. Zona de ossificação mineralizada. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a porção mineralizada do osso trabecular da zona de ossificação de animal controle (A e D), animal tratado com alendronato (B e E) e animal tratado com etidronato (C e F). Em menor aumento (A-C) mostra a presença de trabéculas presentes no espécime controle, enquanto o grupo tratado com alendronato não mostra as mesmas bem definidas trabéculas, algumas aparecem longas e grossas, enquanto no grupo tratado com etidronato as trabéculas são finas e curtas (setas). O maior aumento (D-F) revela em três dimensões em todos os espécimes e são observadas lacunas de osteoclastos (cabeça de seta) e lacunas de osteócitos (Oci). A, B e C: Barra=1mm. D, E e F: Barra = 20µm.

5.1.5 Atividade de reabsorção das células clásticas

As análises de microscopia eletrônica de varredura revelaram que os espécimes do grupo ETN apresentavam trabéculas finas e menos numerosas quando comparados com os espécimes do grupo CTR. Os espécimes do grupo alendronato apresentavam trabéculas espessas com aspecto desorganizado e poucas cavidades medulares entre elas (Figura 32A-C). Por outro lado, ao examinar os espécimes em maior aumento observamos que as trabéculas da área de

ossificação nos três grupos apresentaram lacunas de reabsorção, além de algumas lacunas de osteócitos (Figura 32D-F).

A análise dos espécimes incubados para histoquímica TRAP revelou uma grande quantidade de células multinucleadas TRAP positivas aderidas à matriz na zona de ossificação do grupo controle (Figura 33A-B). O grupo alendronato apresentou muitas células TRAP positivas, porém, a maior parte destas estavam distantes das trabéculas, sem atividade; osteoclastos apoptóticos e “restos” de células também foram identificados (Figura 33C-D). O grupo etidronato apresentou grande quantidade de células TRAP positivas aderidas às trabéculas e escassas células apoptóticas (Figura 33E-F).

A contagem de células revelou que o total de células TRAP positivas nos grupos controle e etidronato não apresentava diferença significativa, entretanto, o número destas células no grupo alendronato foi significativamente menor. Por outro lado, o grupo alendronato exibiu um número significativamente maior de células apoptóticas comparado com os grupos controle e etidronato; o número de células apoptóticas deste grupo foi seis vezes maior que do grupo etidronato (Figura 34B). O grupo alendronato apresentou poucas células TRAP positivas aderidas, a maioria das quais apresentava de dois a cinco núcleos por célula. O número de células aderidas nos grupos controle e etidronato também foi significativamente maior que as do grupo alendronato, o que também foi observado entre as células que continham de dois a cinco núcleos, sem diferença entre a contagem dos grupos controle e etidronato (Figura 34C). Em contraste, o número de células não aderidas observadas no grupo alendronato foi significativamente maior do que o observado nos grupos controle e etidronato, os quais apresentaram quantidade similar de células TRAP positivas não aderidas. A diferença entre o número de células não aderidas no grupo alendronato em relação aos grupos controle e etidronato foi significativamente maior quando comparada a quantidade de células multinucleadas observadas (Figura 34D).

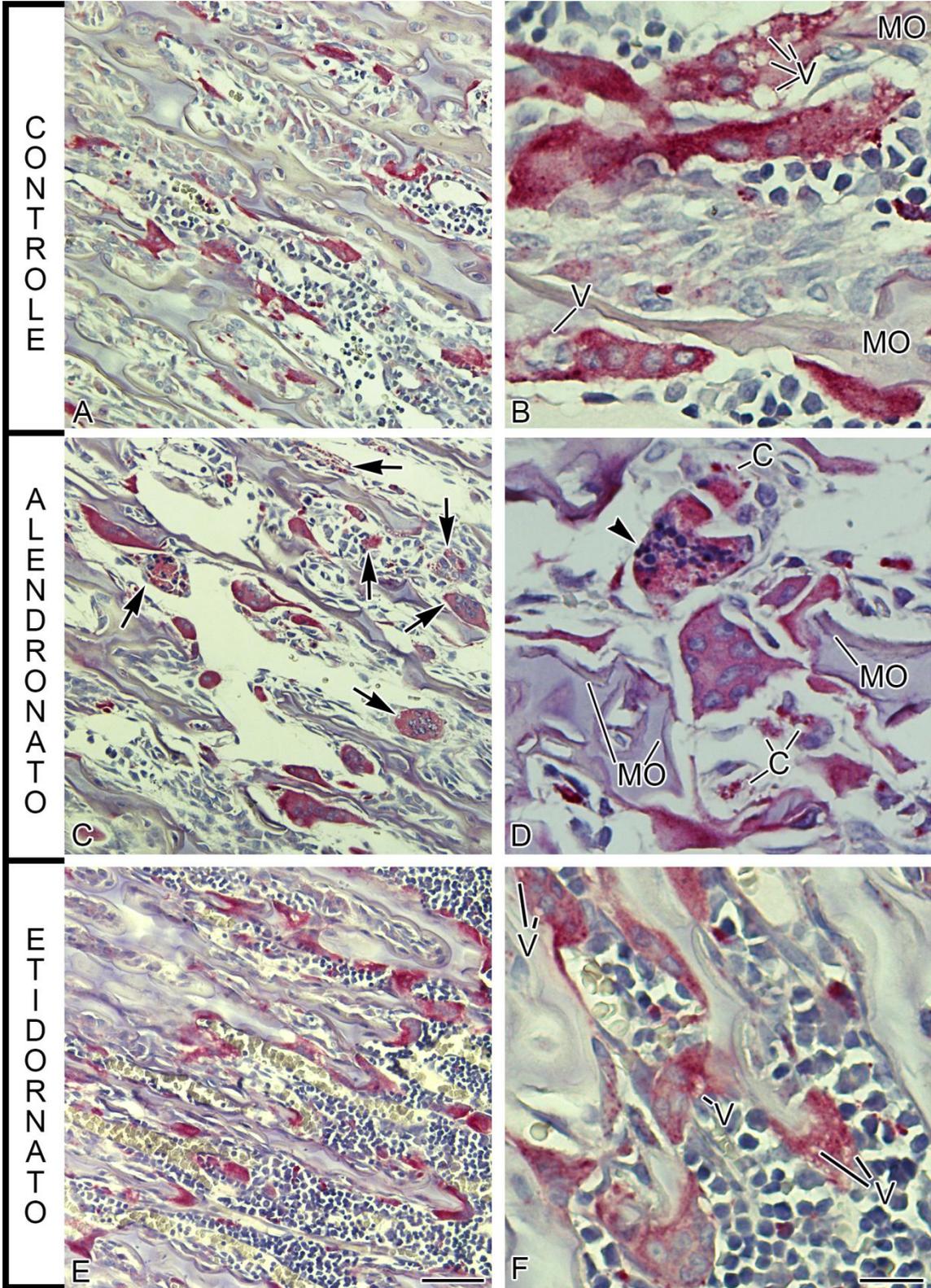


Figura 33. Histoquímica para fosfatase ácido-resistente. Em **A**, **C** e **E** menores aumentos da zona de ossificação evidenciando células clásticas (coloração vermelha). Em **B**, **D** e **F** maior aumento das células clásticas (coloração vermelha). Em **B** as células estão ativas, próximas à matriz óssea (MO), note ainda a presença de vacúolos (V) nestas células. Em **C** note que muitos osteoclastos não estão aderidos à matriz óssea e células em diferentes estágios de apoptose (seta). Em **D** as células não estão aderidas à matriz óssea (MO) há a presença de células apoptóticas (cabeça de seta) e pedaços de citoplasma de células clásticas (C). Em **F** as células clásticas são multinucleadas e aderidas à matriz. **A** e **B** animais controle; **C** e **D** animais tratados com alendronato; **E** e **F** animais tratados com etidronato. Contracoloração por hematoxilina. A, C e E: Barra = 100µm. B, C e F: Barra = 50µm.

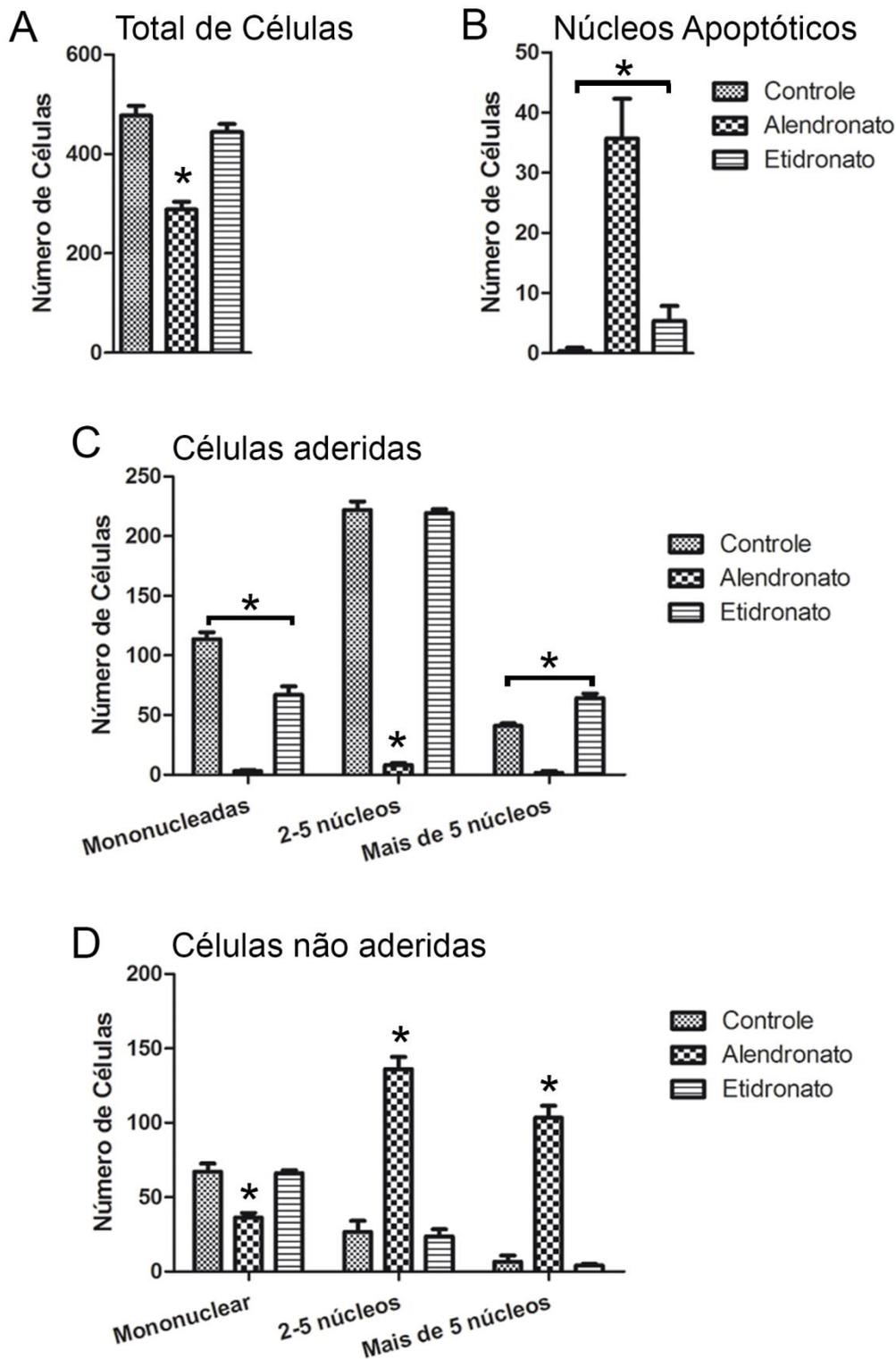
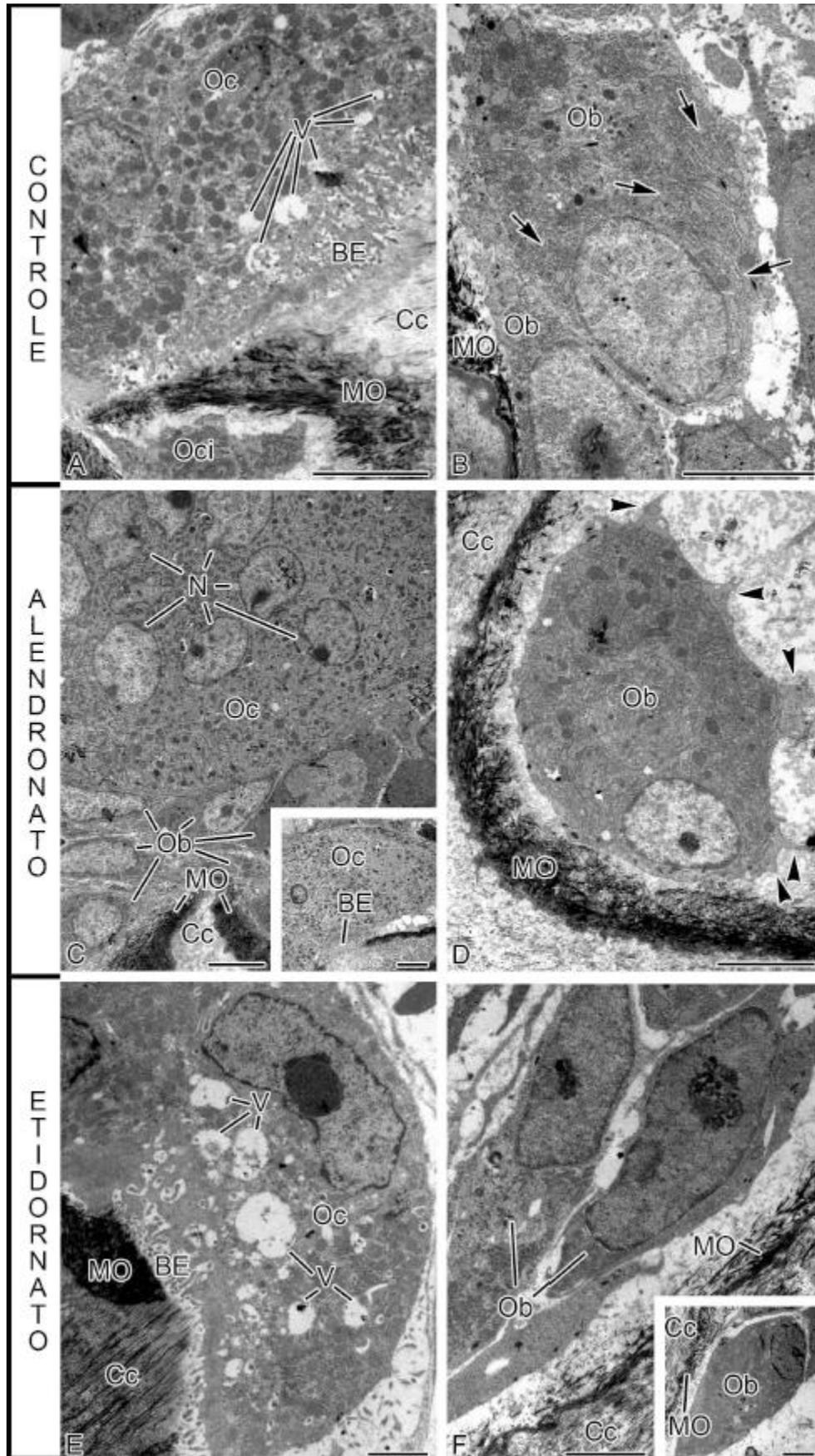


Figura 34. Contagem de células TRAP-positivas. Em **A** os osteoclastos aderidos e não aderidos foram contados e o total de células foi maior nos grupos controle e etidronato do que no grupo alendronato ($*=p<0,05$). Em **B** a contagem das células apoptóticas revelou que o tratamento com alendronato apresentou maior quantidade destas células com esta característica, algumas foram observadas no grupo alendronato e foi encontrada somente uma célula presente no grupo controle ($*=p<0,05$). Em **C** o número de células aderidas com um núcleo foi maior no grupo controle, o grupo etidronato também apresentou células mononucleadas aderidas e poucas células no grupo alendronato.

5.1.6 Análise ultraestrutural

A análise da ultraestrutura dos espécimes controle confirmou a presença de osteoclastos ativos, exercendo sua atividade de reabsorção, aderidos à superfície óssea e com típicas estruturas de reabsorção, como zona clara, extensa borda em escova e uma grande quantidade de vacúolos. As trabéculas apresentaram matriz óssea envolvendo osteócitos e presença de cartilagem calcificada sob as células clásticas (Figura 35A). Os osteoblastos apresentaram exuberante citoplasma com cisternas de retículo endoplasmático bem definidos, evidenciando a intensa atividade de síntese proteica destas células (Figura 35B). Os espécimes que foram tratados com alendronato apresentaram muitos osteoclastos multinucleados distantes das superfícies trabeculares. Algumas células clásticas estavam aderidas à matriz de cartilagem calcificada por pequenos podossomos, porém não apresentava as estruturas típicas de uma célula ativa, elas apresentavam: pequena zona clara, discreta borda em escova e lacuna de reabsorção atípica (Figura 35C). Os osteoblastos deste grupo, assim como os do grupo controle, apresentavam estruturas típicas de intensa atividade de síntese e secreção (Figura 35D). Os espécimes do grupo etidronato apresentaram células clásticas aderidas pelas zonas claras em regiões de matriz óssea e cartilagem calcificada, apresentando exuberante borda em escova e numerosos vacúolos no citoplasma (Figura 35E). Os osteoblastos do grupo ETN apresentaram um fenótipo latente com formato fusiforme, semelhante ao das células de revestimento ósseo enquanto algumas destas células apresentaram características normais de atividade de síntese e secreção (Figura 35F).

Continuação da legenda da figura 34: Os grupos controle e etidronato apresentaram quantidade similar de células que apresentavam de dois a cinco núcleos enquanto pouquíssimas células foram observadas no grupo alendronato. O grupo etidronato apresentou mais células multinucleadas (com mais de cinco núcleos) aderidas que o grupo controle e alendronato, mas este número foi maior no grupo controle do que grupo alendronato (*= $p < 0,05$). Em **D** foi observado um número similar de células mononucleadas não aderidas nos grupos controle e etidronato, quanto o grupo alendronato apresentou um número reduzido destas células. As células não aderidas e multinucleadas foi maior no grupo alendronato do que nos demais grupos, e os grupos controle e etidronato apresentaram quantidade similar de células com dois a cinco núcleos e com mais de cinco núcleos (*= $p < 0,05$). * e colchetes = $p < 0,05$ em todos os grupos.



5.1.7 Expressão gênica

5.1.7.1 Genes envolvidos com apoptose.

Foram avaliados quatro genes relacionados com o evento apoptótico, o gene da Caspase 3, Mdm2, P53 e Myc. Os animais que receberam bisfosfonatos apresentaram baixa expressão destes genes em relação ao grupo que não recebeu a droga. A redução da expressão gênica no grupo tratado com alendronato foi mais acentuada nas análises dos quatro genes (Figuras 36 a 39). Em relação ao gene da Caspase 3 foi observado que o grupo tratado com alendronato é expresso cerca de 90% menos que o grupo controle. Já o grupo que recebeu etidronato apresentou uma expressão 25% menor que o grupo controle indicando que os bisfosfonatos alteram a expressão gênica de Caspase 3 (Figura 36). Na expressão de Mdm2 notou-se que ambos os bisfosfonatos apresentaram expressão menor que a expressão deste gene no grupo controle (Figura 37). Porém, o grupo tratado com alendronato expressou somente cerca de 25% do RNA mensageiro deste gene, enquanto no grupo tratado com etidronato esta expressão foi de cerca de 40% em relação ao grupo controle. A expressão gênica de P53, que atua como E3 ligase de Mdm2, também foi alterada nos animais que receberam tratamento (Figura 38), porém a expressão no grupo que recebeu alendronato foi praticamente nula, enquanto o grupo que recebeu etidronato expressou cerca de 70% do valor obtido com a expressão do grupo controle. A expressão de Myc, assim como os demais genes relacionados com a apoptose, apresentou-se menos expresso no grupo que

Figura 35. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando detalhes ultraestruturais da ossificação endocondral. Em **A** Osteoclasto (Oc) ativo com vacuolos (V) e bem definida borda em escova (BE) reabsorvendo área de cartilagem calcificada (Cc) e matriz óssea (MO), osteócito (Oci) envolto em matriz; e em **B** osteoblastos (Ob) polarizados com muitos retículos endoplasmáticos (seta) no grupo controle. Em **C** osteoclasto (Oc) multinucleados latente não polarizado e separado da matriz por osteoblastos (Ob) o detalhe ilustra a presença de osteoclasto não totalmente aderido com pequena borda em escova (BE); e em **D**, osteoblasto ativo e próximo à matriz, note ainda, que esta célula apresenta prolongamentos curtos (cabeça de seta) nos espécimes tratados com alendronato. Em **E**, osteoclasto (Oc) com borda em escova bem definida (BE) e vacuolos (V); e em **F**, osteoblastos (Ob) fusiformes e uma fina camada de matriz óssea (MO) sobre a matriz de cartilagem calcificada (Cc), o detalhe ilustra osteoblasto pertencente ao grupo etidronato. A, B, C e D: Barra = 5µm. E e F barra = 2,5 µm.

foi tratado com alendronato do que no grupo tratado com etidronato, em relação ao grupo controle (Figura 39).

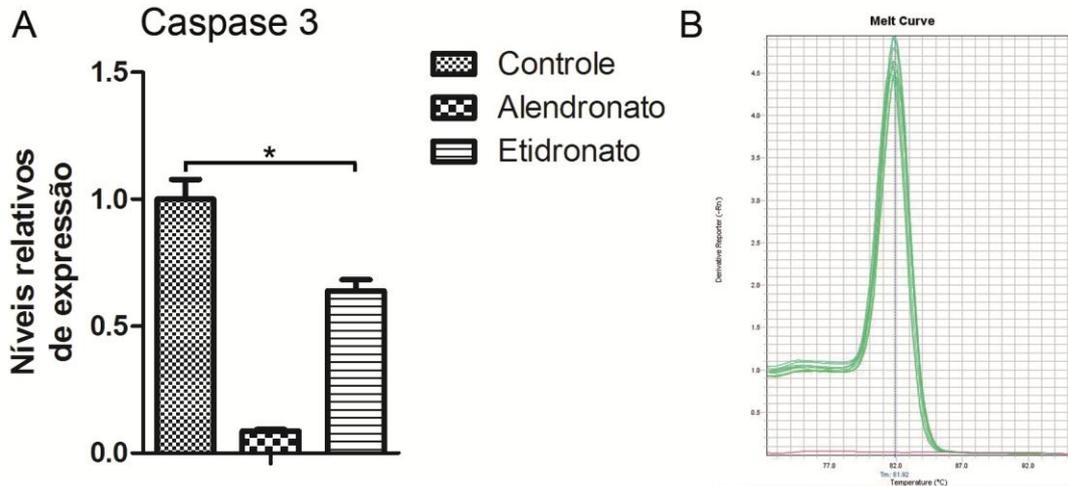


Figura 36. Expressão gênica de Caspase 3 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. O grupo que recebeu alendronato sofreu maior redução da expressão gênica que o grupo que recebeu etidronato. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

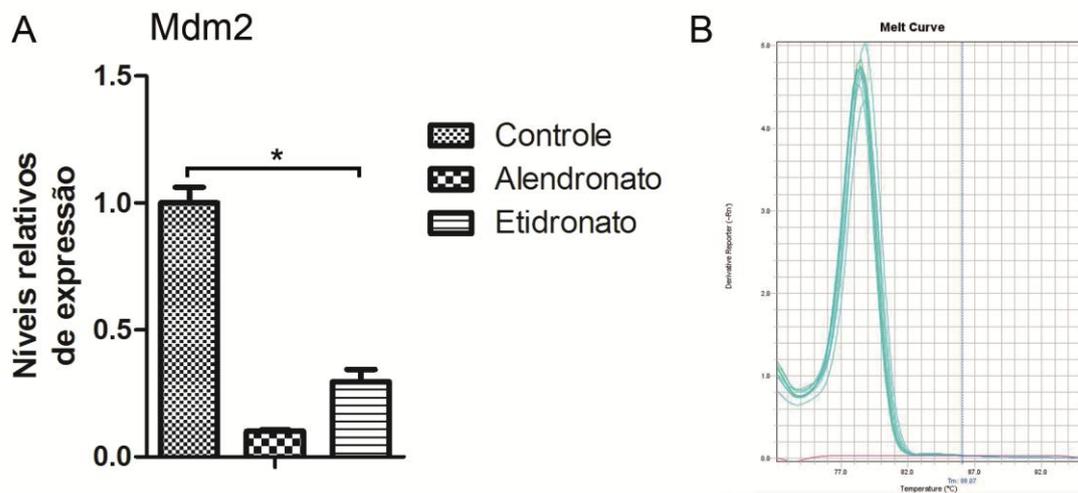


Figura 37. Expressão gênica de Mdm2 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. O grupo que recebeu alendronato sofreu maior redução da expressão gênica que o grupo que recebeu etidronato. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

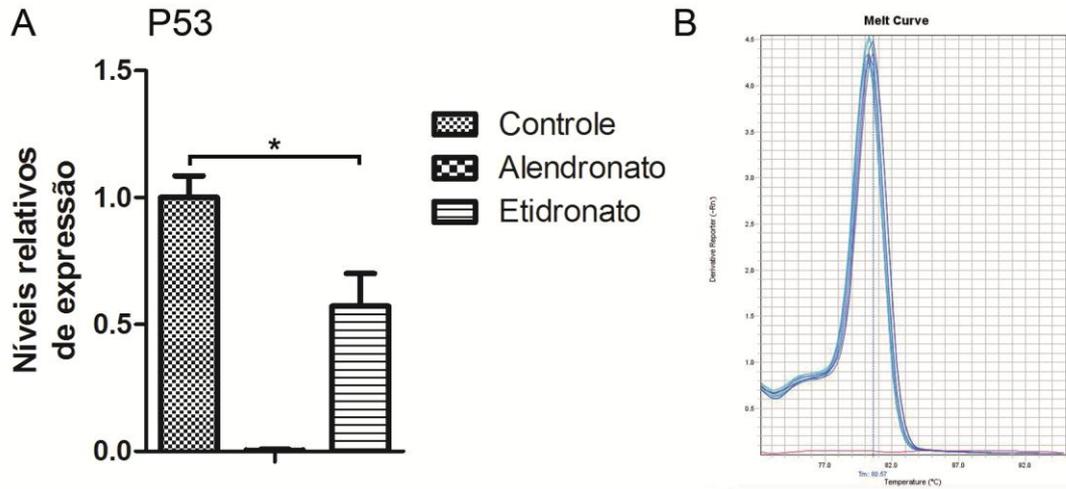


Figura 38. Expressão gênica de P53 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. No grupo que recebeu alendronato a expressão foi quase nula, em relação aos demais grupos, o grupo tratado com etidronato também mostra redução da expressão gênica em comparação ao grupo controle. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

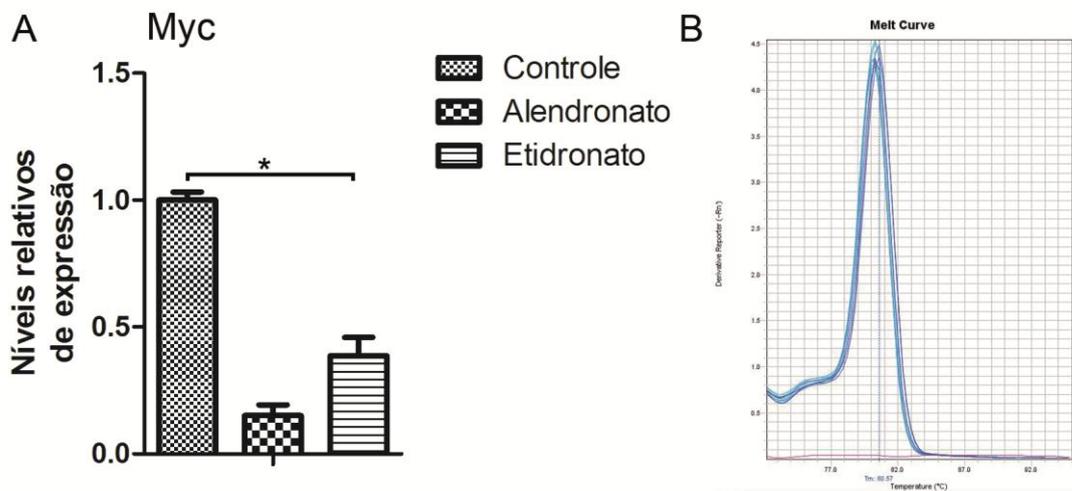


Figura 39. Expressão gênica de Myc *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. O grupo que recebeu alendronato sofreu maior redução da expressão gênica que o grupo que recebeu etidronato. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

5.1.7.2 Genes envolvidos com ciclo celular.

A análise dos genes de Cdk4, Mad211, Mapk3 e Smad3, envolvidos na progressão celular mostrou que os grupos que receberam bisfosfonatos sofreram alteração na expressão destes genes. Foi evidenciado, ainda, que os grupos que receberam tratamento apresentaram uma diminuição mais acentuada na expressão dos genes Cdk4 e Mad211 (Figura 40 e 41). Além disso, a baixa expressão foi mais evidenciada no grupo alendronato, sendo praticamente nula em relação aos demais grupos. No grupo que recebeu etidronato, a expressão de Cdk4 foi cerca de 50% menor que a do grupo controle (Figura 40), enquanto a expressão de Mad211, neste mesmo grupo, foi cerca de 75% menor em comparação ao grupo que recebeu somente solução salina (Figura 41). Em relação à expressão de Mapk3 observou-se menor expressão quando comparado cada grupo tratado com o controle, mas entre os grupos que receberam os bisfosfonatos não houve alteração significativa dos dados (Figura 42). Resultados similares foram encontrados em relação ao Smad3, importante membro da via de sinalização de TGF- β , que também se apresentou menos expresso nos espécimes tratados com bisfosfonatos, em relação ao grupo controle, enquanto os tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si (Figura 43).

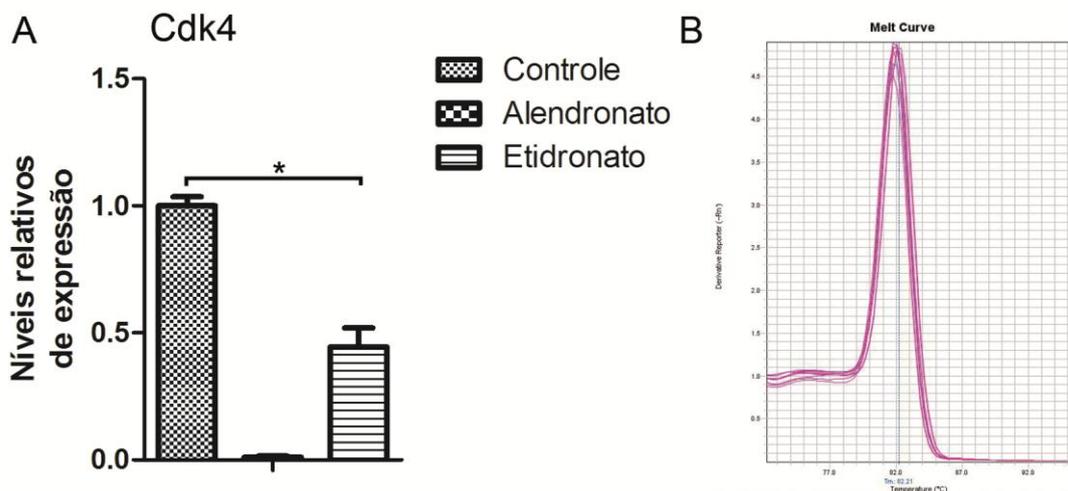


Figura 40. Expressão gênica de Cdk4 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. O grupo que recebeu alendronato sofreu maior redução da expressão gênica que o grupo que recebeu etidronato. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

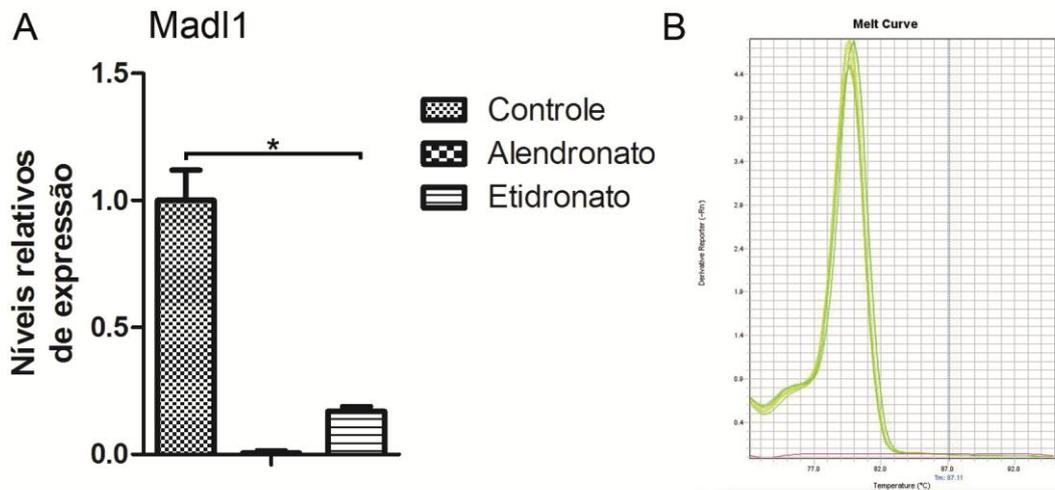


Figura 41. Expressão gênica de Mad211 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. O grupo que recebeu alendronato sofreu uma redução mais significativa da expressão gênica que o grupo que recebeu etidronato. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

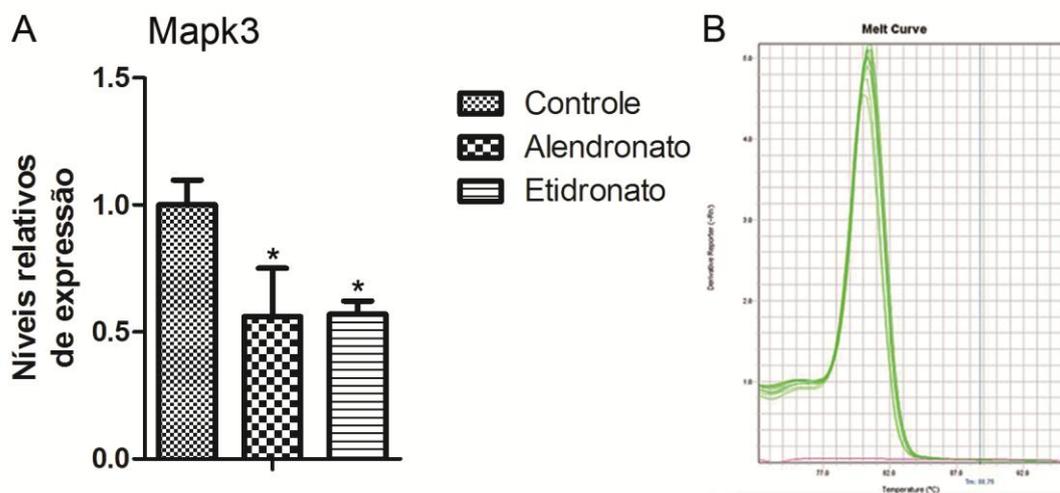


Figura 42. Expressão gênica de Mapk3 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. Não houve diferença entre a expressão gênica dos grupos tratados com alendronato e etidronato, a diminuição foi observada somente em relação ao grupo controle. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

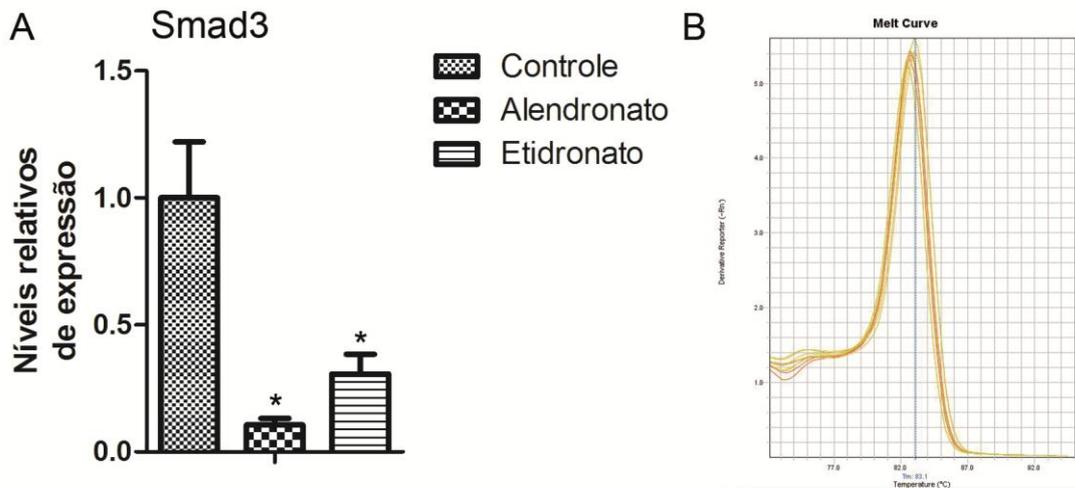


Figura 43. Expressão gênica de Smad3 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. Não houve diferença entre a expressão gênica dos grupos tratados com alendronato e etidronato, foi observada diminuição, somente em relação ao grupo controle. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

5.1.7.3 Genes membros do complexo de NfκB.

A expressão dos genes NfκB1 e NfκB2 que fazem parte do complexo NfκB foram alterados nos animais que receberam bisfosfonatos. A menor expressão foi mais uma vez mais acentuada nos animais que receberam alendronato (Figuras 44 e 45) do que nos que receberam etidronato, apesar da diferença não ser significativa. Entre os grupos tratados com bisfosfonatos, notou-se uma tendência à menor expressão no grupo que recebeu alendronato. Em relação à expressão de NfκB1, o grupo que recebeu alendronato apresentou expressão praticamente nula, sendo a média dos níveis de expressão 0,01 (Figura 44), enquanto o grupo controle apresentou seus valores normalizados para 1, e no grupo etidronato este valor foi 0,1. Apesar da diferença numérica, quando foi levado em conta dados do erro, os resultados entre os grupos que receberam bisfosfonatos não foram significativos. Já a expressão de NfκB2 também apresentou-se diminuída nos grupos tratados com bisfosfonatos (Figura 45); os grupos tratados, porém, apresentaram maior expressão quando comparados com a expressão de NfκB1 (Figura 44); e, mais uma vez,

apesar da tendência da menor expressão no grupo alendronato, esta não foi significativa em relação ao grupo etidronato.

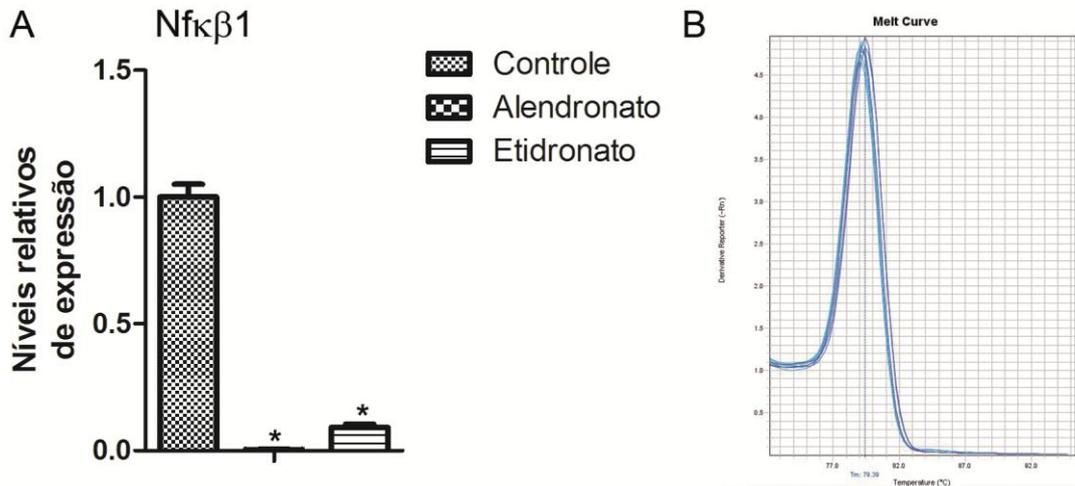


Figura 44. Expressão gênica de NfκB1 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. O grupo que recebeu alendronato sofreu maior redução da expressão gênica que o grupo que recebeu etidronato, em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com bisfosfonatos. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

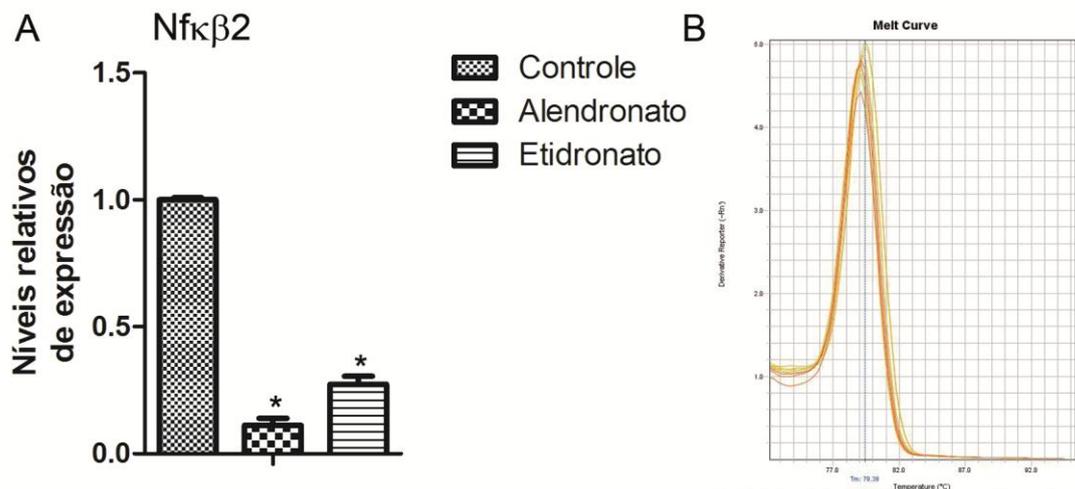


Figura 45. Expressão gênica de NfκB2 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. O grupo que recebeu alendronato sofreu maior redução da expressão gênica que o grupo que recebeu etidronato, em relação ao grupo controle, os grupos que receberam tratamento não apresentaram diferença entre si. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

5.1.7.4 Genes ligados à osteogênese.

Os genes de Runx2 e Spp1 estão diretamente relacionados à osteogênese. Os dois grupos que receberam doses de bisfosfonatos apresentaram expressão menor de ambos os genes, quando comparados ao grupo controle (Figura 46 e 47). Entretanto, diferente do perfil observado até então, a diminuição na expressão de Runx2 foi mais pronunciada no grupo que recebeu etidronato, do que no grupo que recebeu alendronato e solução salina, respectivamente (Figura 46). Já a expressão de Spp1 não apresentou diferenças significativas em relação aos grupos tratados com bisfosfonatos, porém, mais uma vez, ambos foram menos expressos nestes grupos que no grupo controle, sendo esta expressão de 20% a 30% do valor expresso pelo grupo controle (Figura 47).

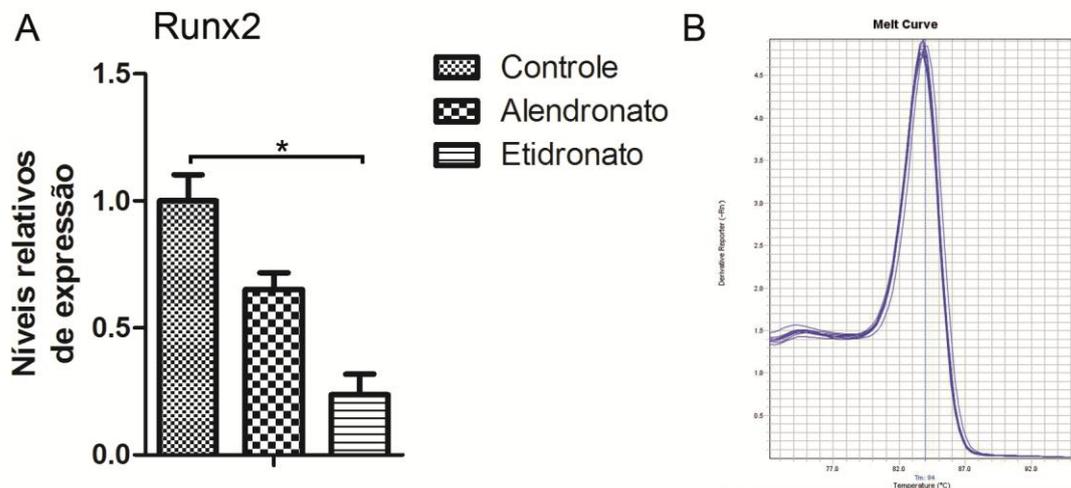


Figura 46. Expressão gênica de Runx2 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. O grupo que recebeu etidronato sofreu maior redução da expressão gênica que o grupo que recebeu alendronato. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

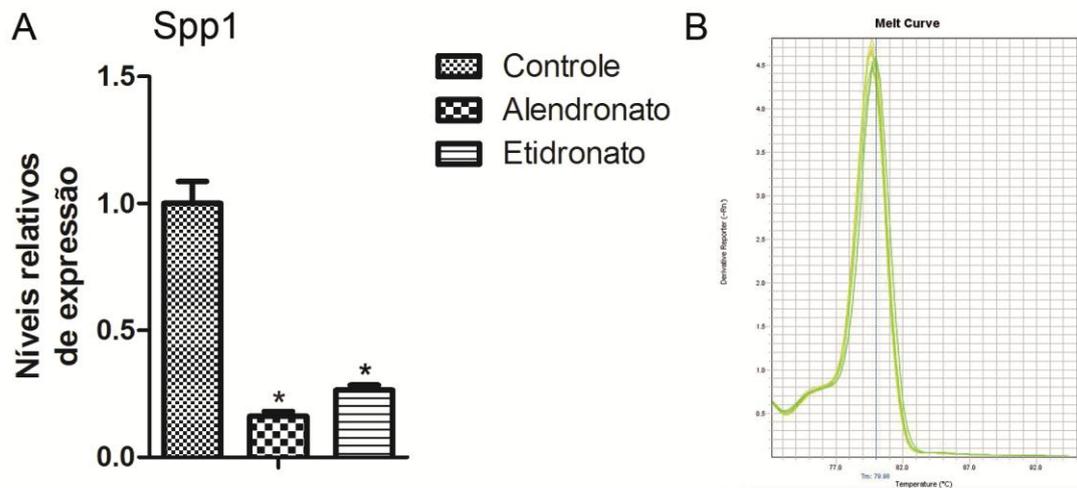


Figura 47. Expressão gênica de Spp1 *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. Não houve diferença entre a expressão gênica dos grupos tratados com alendronato e etidronato, a diminuição foi observada somente em relação ao grupo controle. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

5.1.8 Expressão de moléculas envolvidas na osteoclastogênese.

A análise das proteínas que estão diretamente ligadas a osteoclastogênese, RANK, RANKL e OPG foram diferentemente expressas nos três grupos de estudo. A expressão de Rank apresentou uma tendência a ser mais expressa nos grupos que receberam bisfosfonatos, mas apesar do grande desvio, o grupo que recebeu etidronato mostra este aumento significativo em relação ao grupo controle (Figura 48A). Apesar de apresentarem uma tendência à menor expressão gênica, o grupo ETN não apresentou alterações significativas em relação ao grupo CTR, enquanto o grupo ALN apresentou menor expressão gênica de Rank em relação aos demais grupos (Figura 49). Quanto à expressão da molécula ligante de RANK, RANKL, notou-se uma menor expressão no grupo alendronato que no grupo etidronato, cuja expressão foi similar à do grupo controle (Figura 48B), enquanto a expressão gênica desta molécula foi diferentemente expressa nos grupos tratados, mostrando tendência à maior expressão no grupo alendronato e menor expressão, significativa, no grupo etidronato (Figura 50). Já a OPG, molécula antagonista de RANK, foi mais expressa no grupo etidronato e apresentou os mesmos níveis que entre o grupo

alendronato e o grupo controle (Figura 48C). Porém a expressão gênica deste antagonista, no presente modelo, apresentou-se menos expressa nos grupos ALN e ETN que no grupo CTR (Figura 51), mas sem alterações entre os grupos que receberam bisfosfonatos diariamente.

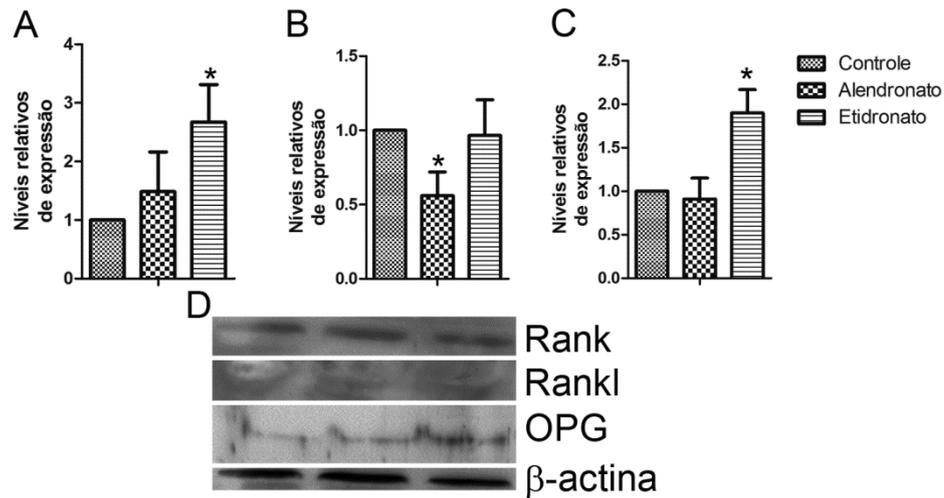


Figura 48. Expressão proteica relativa de proteínas envolvidas na osteoclastogênese *in vivo*. Em **A** expressão relativa de RANK, os animais tratados com alendronato não apresentam alterações significativas na expressão desta proteína, enquanto nos animais tratados com etidronato a expressão é maior que nos demais grupos. Em **B** expressão relativa de RANKL, no grupo que recebeu tratamento com alendronato a expressão desta proteína é menor em relação ao grupo controle, enquanto o grupo que recebeu etidronato não apresenta diferença entre os demais grupos. Em **C** expressão relativa de OPG, o grupo que recebeu alendronato não apresenta alterações na expressão proteica de OPG, enquanto o grupo que recebeu etidronato apresenta esta proteína mais expressa em relação aos demais grupos. Em **D** imagem representativa da revelação da membrana de Western Blotting incubada com anticorpos específicos para RANK, RANKL, OPG e β -actina.

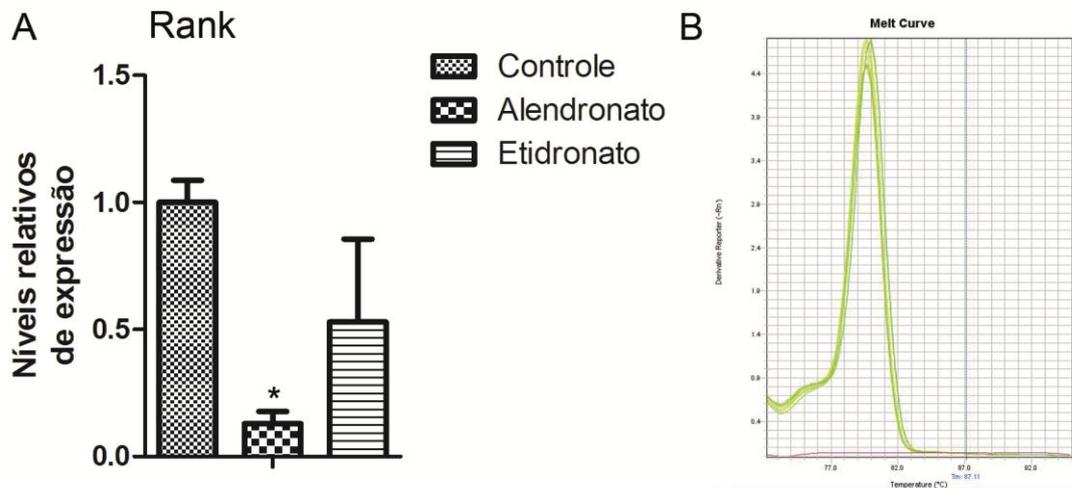


Figura 49. Expressão gênica de Rank *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. Não houve diferença entre a expressão gênica dos grupos tratados com alendronato e etidronato, porém o grupo tratado com alendronato apresentou diminuição significativa em relação ao grupo controle. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

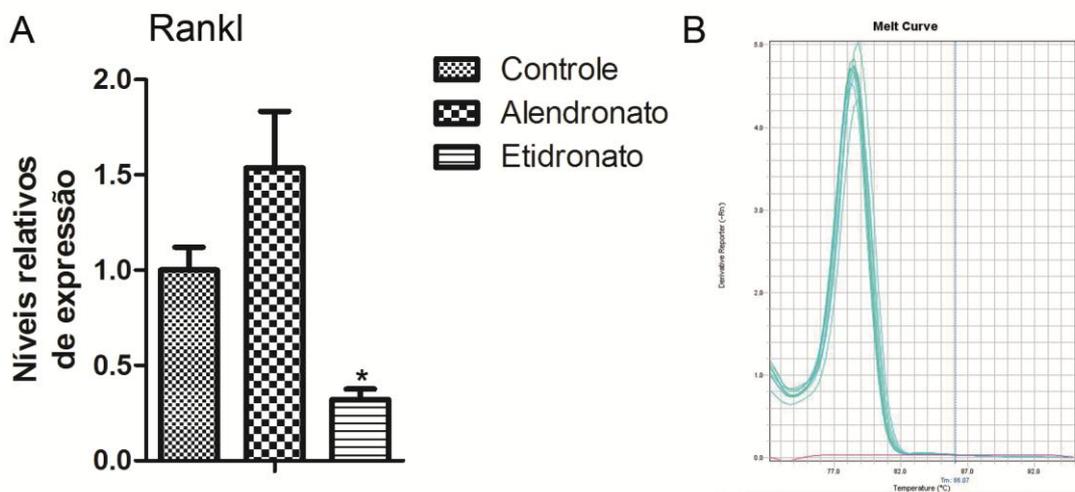


Figura 50. Expressão gênica de Rankl *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com alendronato apresenta uma tendência à maior expressão, porém a diferença em relação ao grupo controle não foi significativa, enquanto a expressão gênica no grupo que recebeu etidronato foi reduzida significativamente em relação aos demais grupos. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

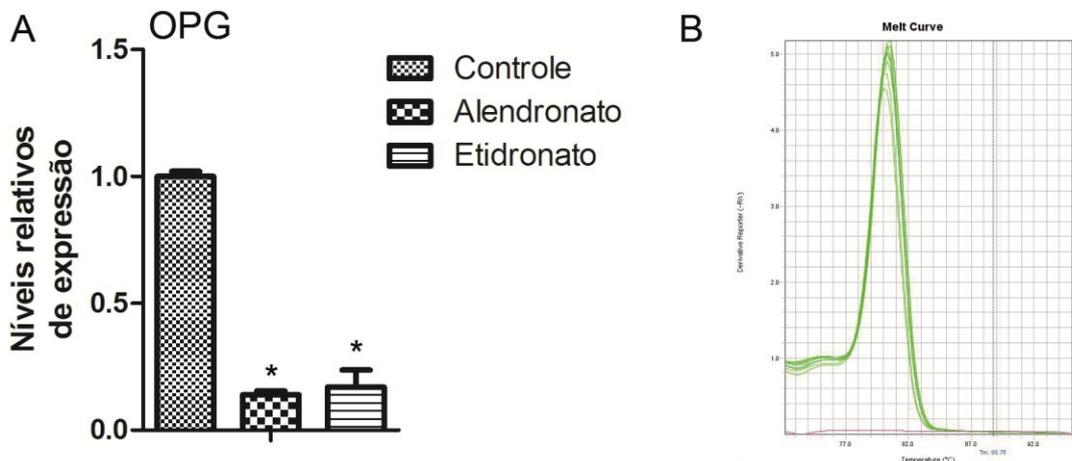
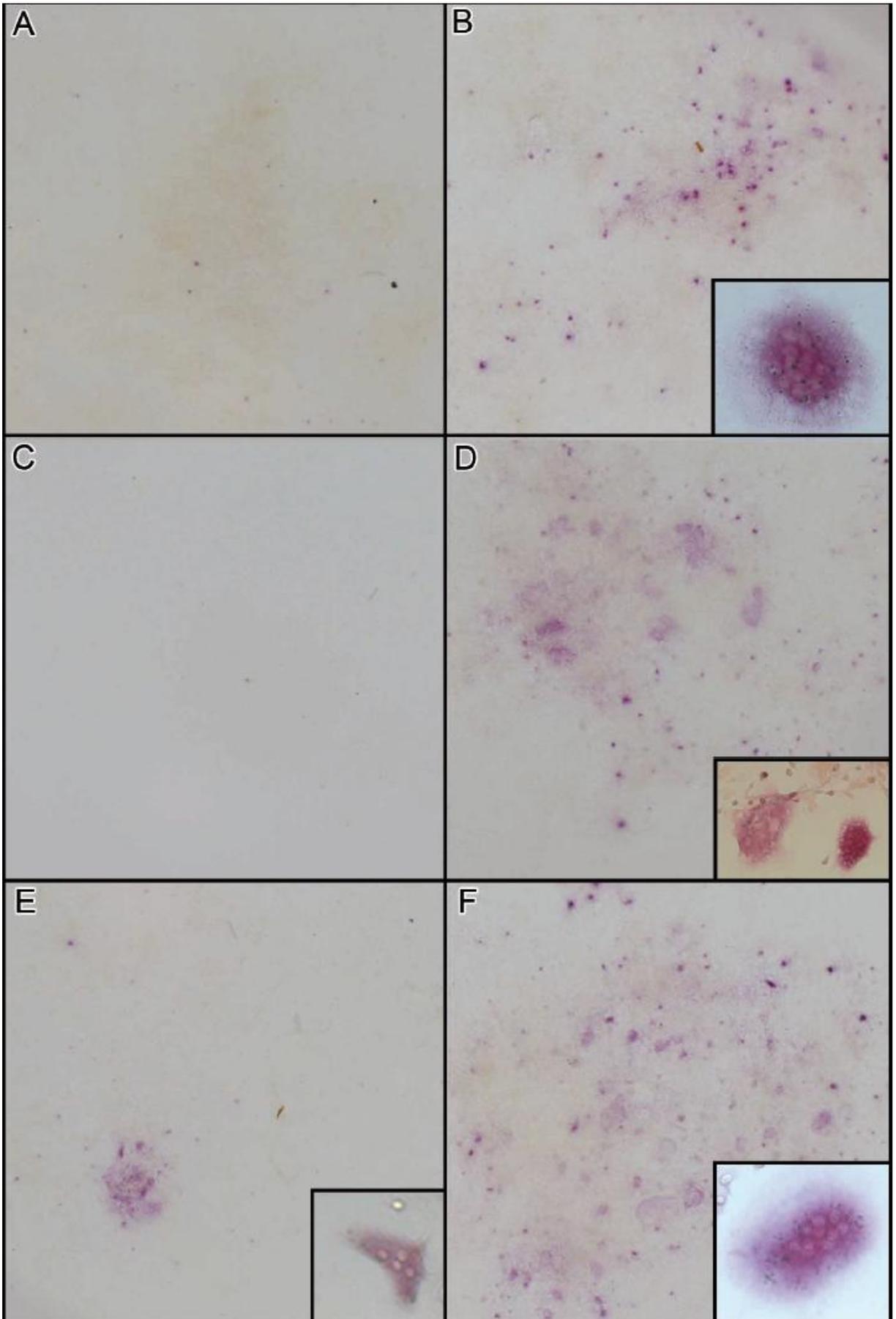


Figura 51. Expressão gênica de OPG *in vivo*. Em **A** expressão gênica dos animais tratados com bisfosfonatos foi reduzida em relação aos animais do grupo controle. Não houve diferença entre a expressão gênica dos grupos tratados com alendronato e etidronato, porém a menor expressão foi significativa em relação ao grupo controle. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

5.2 In Vitro

5.2.1 Padronização da Cultura primária de osteoclastos

A fim de mimetizar os resultados obtidos *in vivo* nas células clásticas, realizou-se a cultura primária destas células. Após o período de diferenciação as culturas foram incubadas para histoquímica TRAP, a fim de confirmar a presença de células clásticas. As células que receberam o meio de cultivo completo, sem vitamina D₃ (grupo controle negativo), não apresentaram células TRAP positivas (Figura 52A); já as células que receberam meio completo acrescido de vitamina D₃ (grupo controle positivo), apresentou células TRAP positivas, confirmando a diferenciação destas células (Figura 52B).



5.2.2 Tratamento da Cultura primária de osteoclastos com Bisfosfonatos

Após a confirmação da obtenção das células clásticas, testou-se diferentes doses de ambos bisfosfonatos, alendronato e etidronato. Para a obtenção da dose de tratamento foi levado em consideração à viabilidade das células com a droga e presença de células TRAP positivas. O teste de viabilidade mostrou que a cultura que recebeu meio completo acrescido de vitamina D₃ e dose de 1X10⁻⁶M de alendronato apresentou uma viabilidade semelhante às células controle positivo (Figura 53A), enquanto no tratamento com as doses mais concentradas de alendronato apresentou viabilidade muito baixa. O tratamento com as doses mais elevadas não apresentaram células TRAP positivas (Figura 52C), enquanto a dose 1X10⁻⁶M apresentou a maior quantidade destas células (Figura 52D). Em relação ao etidronato, as culturas que receberam meio completo acrescido de vitamina D₃ e doses de 5X10⁻⁵M e 1X10⁻⁶M de etidronato apresentaram viabilidade semelhante às células controle positivo (Figura 53B). Porém, a dose 5X10⁻⁵M apresentou poucas células TRAP positivas (Figura 52E), enquanto o grupo que recebeu a dose 1X10⁻⁶M de etidronato apresentou, além de viabilidade semelhante ao grupo controle positivo, uma grande quantidade de células TRAP positivas (Figura 52F).

Figura 52. Cultura primária de Osteoclastos com histoquímica para fosfatase ácido tártaro resistente (TRAP). Em **A**, cultura sem D₃, grupo controle negativo, sem células TRAP positivas. Em **B**, cultura com D₃, grupo controle positivo com grande quantidade de células TRAP positivas, detalhe osteoclasto diferenciado. Em **C**, cultura com D₃ e dose de alendronato 5X10⁻⁶M, ausência de células TRAP positivas. Em **D**, cultura com D₃ e dose de alendronato 1X10⁻⁶M; observar grande quantidade de células TRAP positivas e detalhe de um osteoclasto diferenciado. Em **E**, cultura com D₃ e dose de etidronato 5X10⁻⁶M, com pouca quantidade de células TRAP positivas; detalhe de um osteoclasto diferenciado. Em **F**, cultura com D₃ e dose de etidronato 1X10⁻⁶M mostrando grande quantidade de células TRAP positivas e detalhe de um osteoclasto diferenciado.

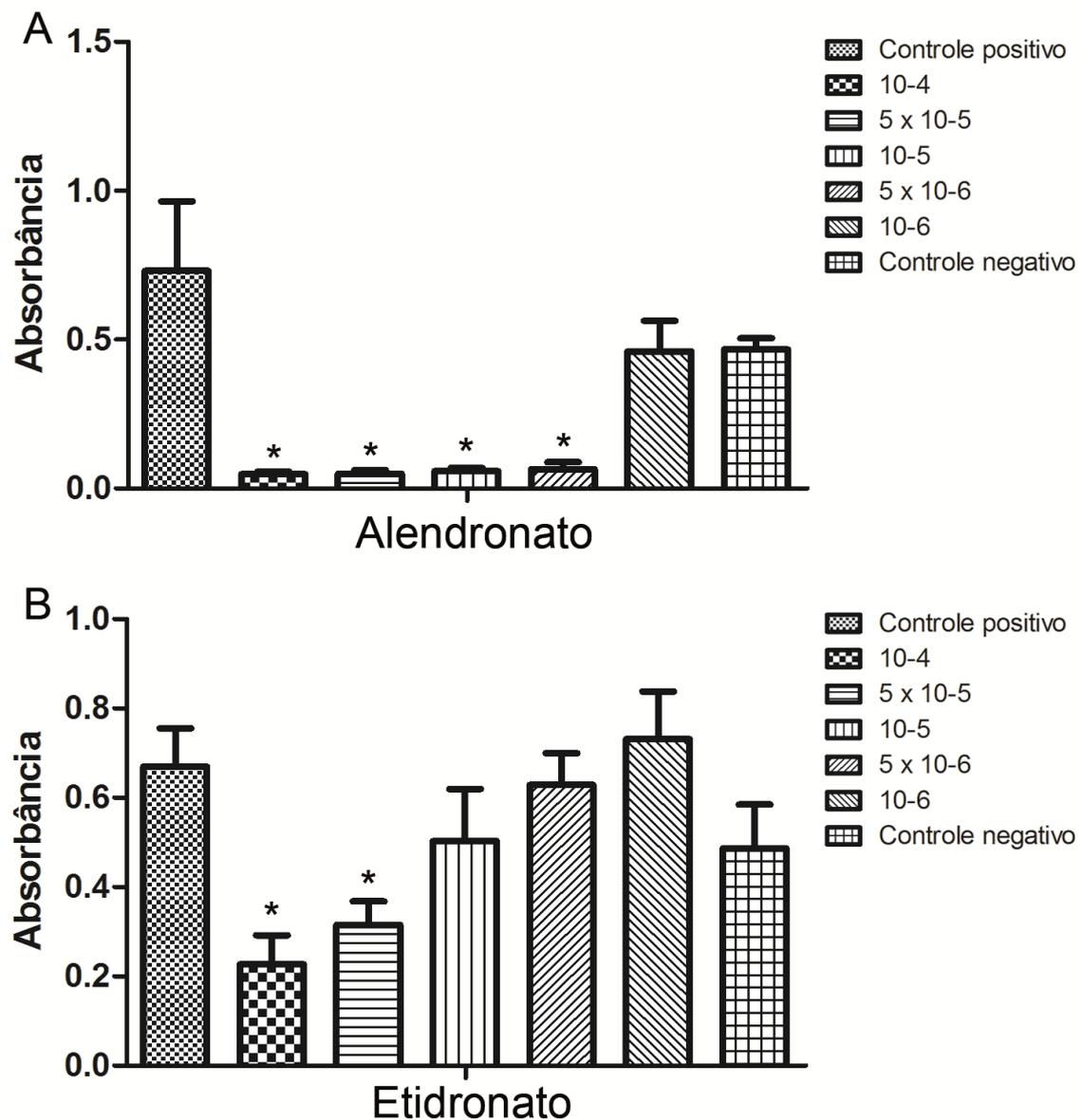


Figura 53. Viabilidade celular. Em **A** Cultura de células tratadas com Alendronato durante 10 dias, a concentração $1 \times 10^{-6} \text{M}$ foi a que apresentou maior viabilidade entre as doses utilizadas. Em **B** Cultura de células tratadas com Etidronato durante 10 dias, as concentrações $1 \times 10^{-5} \text{M}$, $5 \times 10^{-5} \text{M}$ e $1 \times 10^{-6} \text{M}$ foram as que apresentaram maior viabilidade entre as doses utilizadas. (*= $p < 0,05$).

5.2.3 Expressão gênica

5.2.3.1 Genes envolvidos com apoptose.

Foram avaliados quatro genes relacionados com o evento apoptótico, o gene da Caspase 3, Myc, Mdm2 e P53. O aumento da expressão gênica de Caspase 3 no grupo que recebeu alendronato foi mais significativo, em relação aos demais grupos, sendo esta expressão quase o dobro dos níveis expressos pelo grupo controle, enquanto os níveis de expressão do grupo que recebeu etidronato não teve aumento significativo, em relação ao grupo controle (Figura 54). A expressão de Myc segue os mesmos parâmetros observados na expressão de Caspase 3, expressão aumentada em cerca de 100% no grupo alendronato, em relação ao grupo controle e sem alterações significativas da expressão no grupo etidronato em relação ao grupo controle (Figura 55). Quanto à expressão de Mdm2, foi notado que o grupo ALN expressou níveis semelhantes aos observados no grupo controle; já o grupo que recebeu etidronato teve a expressão aumentada, cerca de 100%, em relação aos demais grupos analisados (Figura 56). A expressão gênica de P53, também sofreu alteração nas culturas que receberam tratamento com bisfosfonatos, enquanto o grupo que recebeu alendronato apresentou aumento da expressão deste gene; o grupo que recebeu etidronato mostrou uma diminuição da expressão (Figura 57).

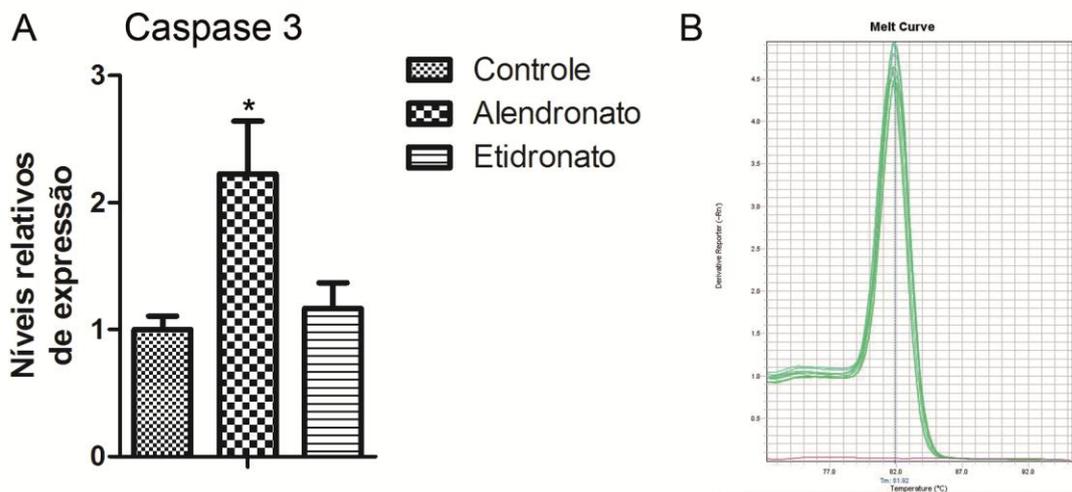


Figura 54. Expressão gênica de Caspase 3 *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato apresenta maior expressão em relação aos demais grupos, enquanto a expressão do grupo tratado com etidronato não apresenta alterações significativas em relação ao grupo controle. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

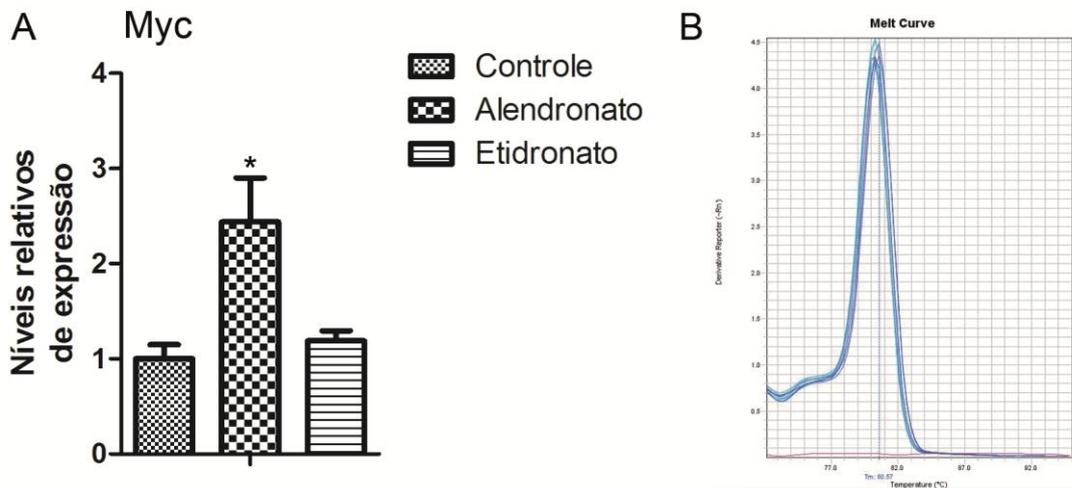


Figura 55. Expressão gênica de Myc *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato foi aumentada em relação aos demais grupos e o grupo que recebeu etidronato não sofreu alteração em relação ao grupo controle. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

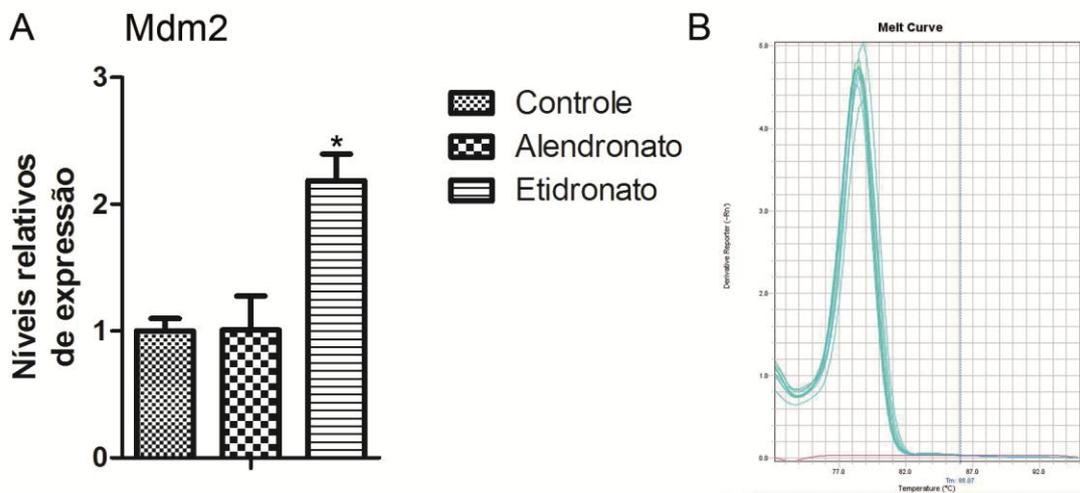


Figura 56. Expressão gênica de Mdm2 *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato não mostra alteração em relação grupo controle, enquanto o grupo que recebeu etidronato apresenta maior expressão em relação aos demais grupos. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

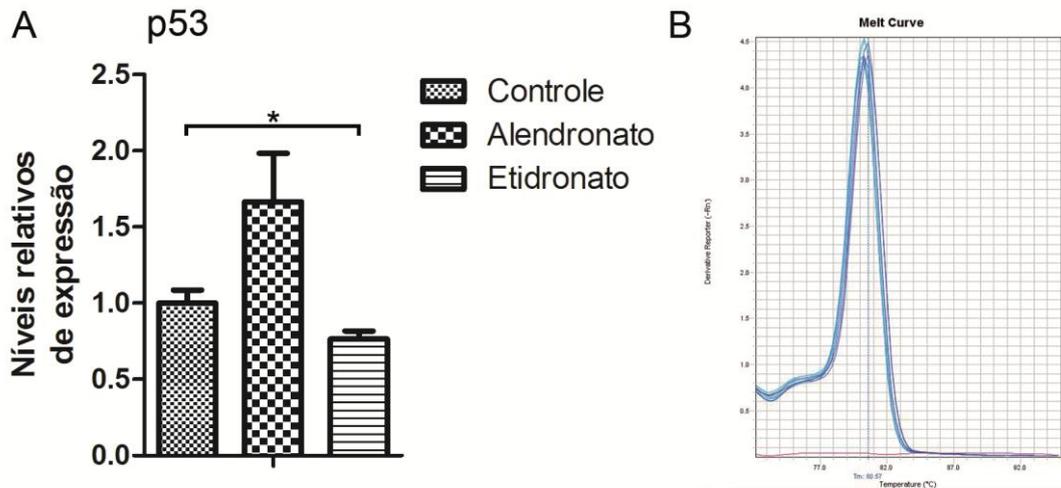


Figura 57. Expressão gênica de p53 *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato apresenta maior expressão em relação ao grupo controle, enquanto o grupo tratado com etidronato apresenta tendência à redução na expressão gênica. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

5.2.3.2 Genes envolvidos com ciclo celular.

A análise dos genes de Cdk4, Mad211, Mapk3 e Smad3, envolvidos na progressão celular mostrou diferentes parâmetros de expressão. A expressão de Cdk4 não sofreu alteração entre os tratamentos e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados (Figura 58). Já em relação à expressão gênica de Mad211, o grupo que recebeu alendronato mostrou maior expressão em relação aos demais grupos, enquanto a expressão do grupo que recebeu etidronato foi cerca de 50% menor que o grupo controle e 75% menor que o grupo alendronato (Figura 59). Em relação à expressão de Mapk3 os dois grupos que receberam bisfosfonatos apresentaram uma tendência à maior expressão, porém este aumento só foi significativo no grupo alendronato quando comparado ao grupo controle. Em relação ao grupo etidronato, este não apresentou alterações significativas, havendo sido observada somente a tendência ao aumento neste grupo (Figura 60). Smad3 também se apresentou mais expresso nos grupos tratados com bisfosfonatos, porém, aqui não foi observado mudanças significativas do grupo alendronato em

relação aos demais grupos; já o grupo etidronato mostrou maior expressão em relação ao grupo controle (Figura 61).

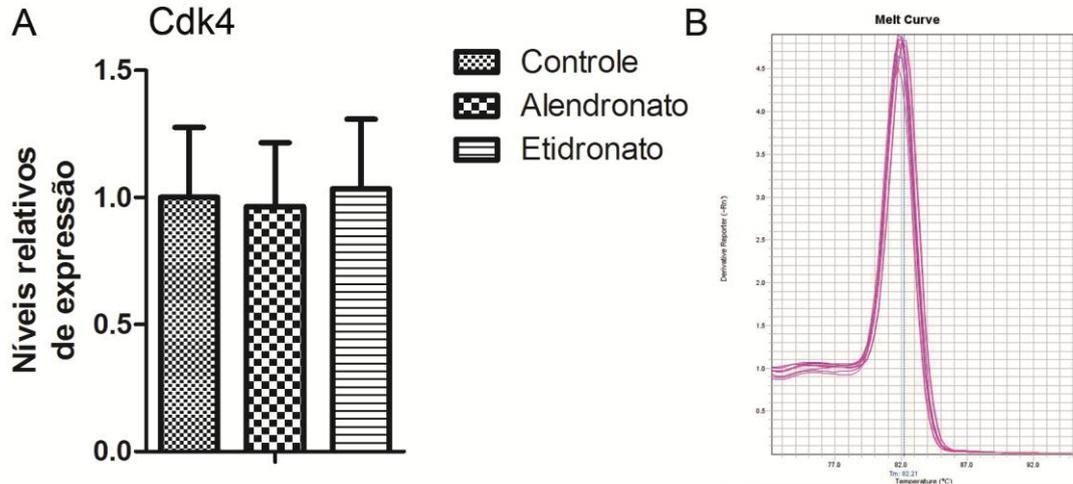


Figura 58. Expressão gênica de Cdk4 *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com bisfosfonatos não apresenta alteração em relação ao grupo controle, nem entre os diferentes bisfosfonatos. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações.

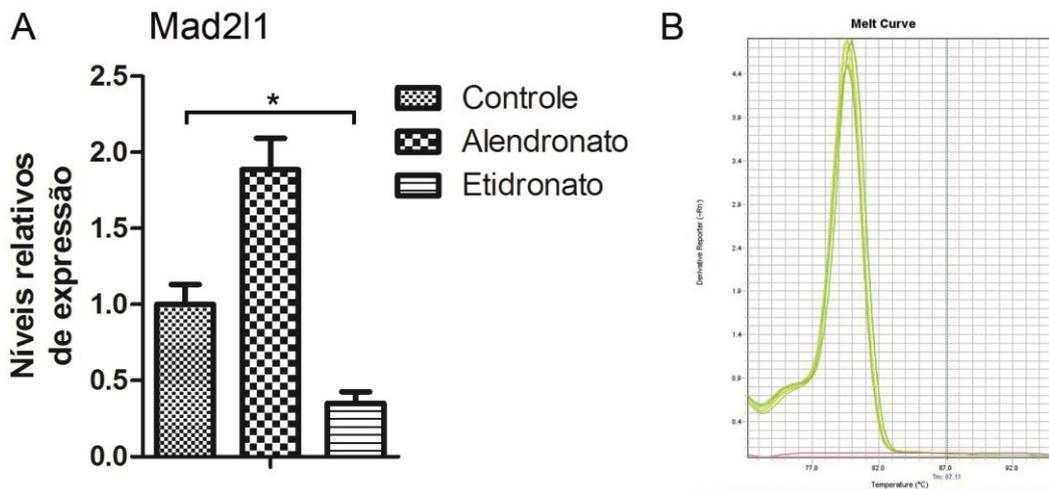


Figura 59. Expressão gênica de Mad21 *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato apresenta maior expressão em relação ao grupo controle, enquanto o grupo tratado com etidronato apresenta expressiva redução na expressão gênica. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

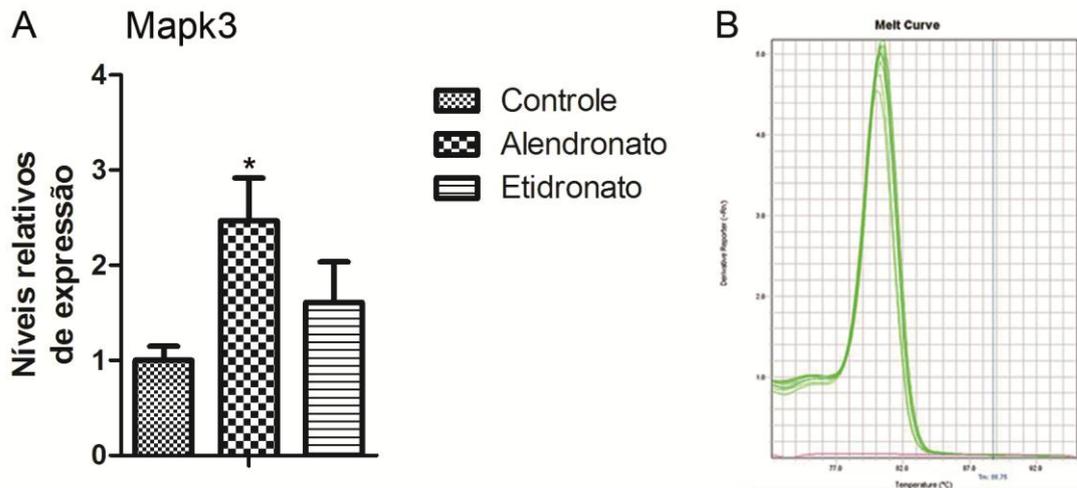


Figura 60. Expressão gênica de Mapk3 *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com bisfosfonatos mostra uma tendência ao aumento da expressão, mas somente no grupo que recebeu alendronato este aumento se mostra significativo. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

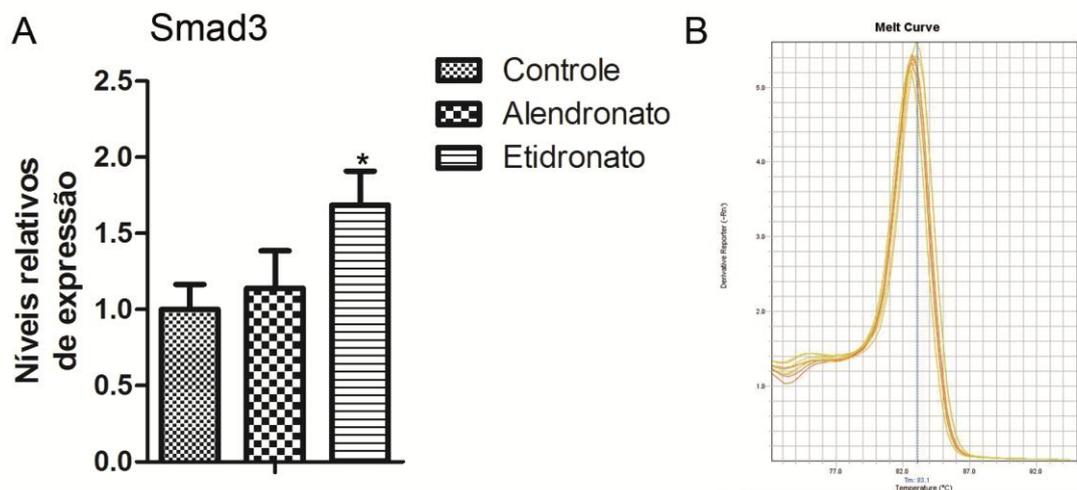


Figura 61. Expressão gênica de Smad3 *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato não apresenta alteração em relação ao grupo controle, entretanto o grupo no grupo tratado com etidronato observas-se um aumento significativo em relação ao grupo controle. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

5.2.3.3 Genes membros do complexo de NfκB.

A expressão do gene de NfκB1 não sofreu alterações significativas entre os diferentes tratamentos. Apesar da tendência à menor expressão no grupo

alendronato, esta não foi expressiva, nem significativa (Figura 62). Entretanto, em relação à expressão de $Nf\kappa B2$, houve aumento significativo de expressão no grupo tratado com alendronato e uma tendência à menor expressão no grupo tratado com etidronato, quando comparados ao grupo controle (Figura 63).

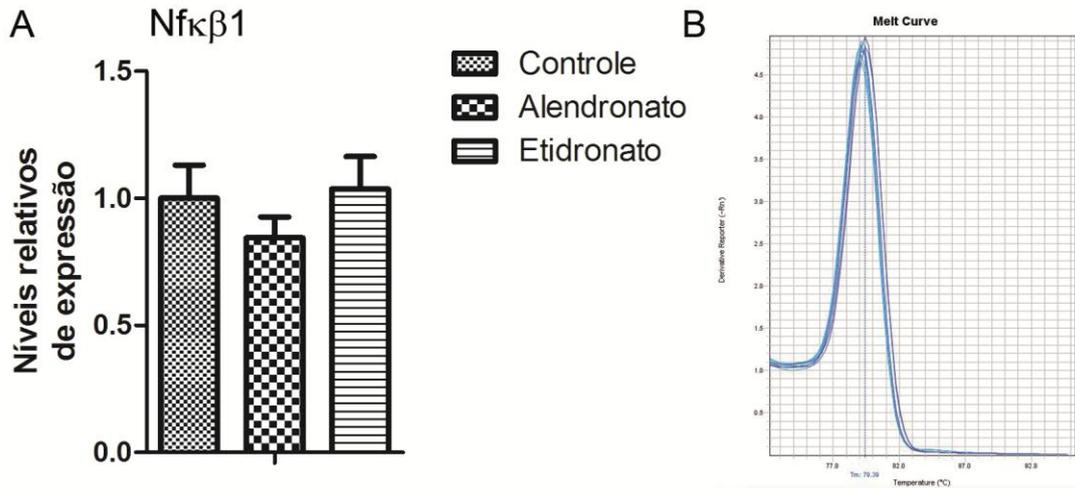


Figura 62. Expressão gênica de $Nf\kappa B1$ *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com bisfosfonatos não apresenta alterações significativas em relação ao grupo controle, nem entre os diferentes tratamentos. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações.

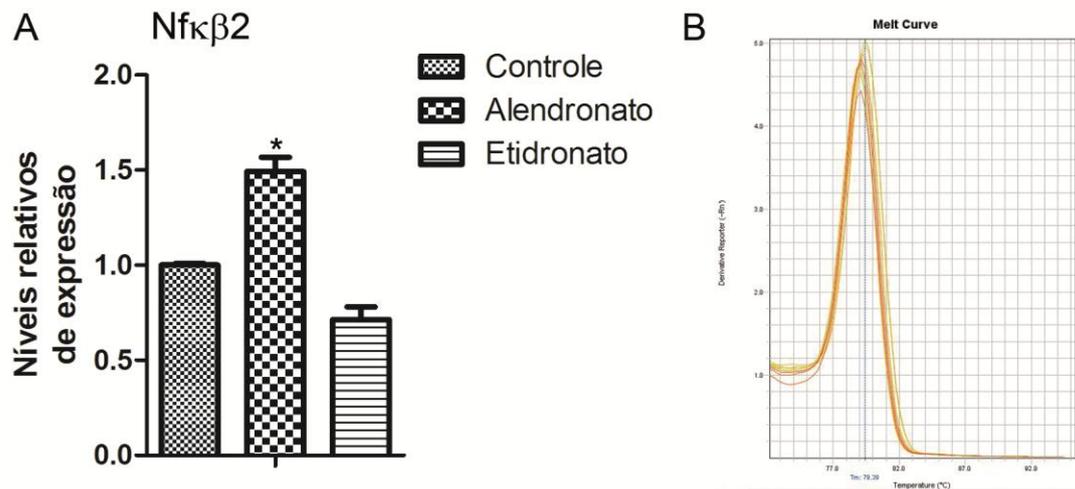


Figura 63. Expressão gênica de $Nf\kappa B2$ *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato mostra um aumento significativo da expressão, enquanto o grupo etidronato, apresenta uma leve tendência a menor expressão. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

5.2.3.4 Genes ligados à osteogênese.

A expressão do gene de Runx2 apresentou-se menos expresso nos grupos tratados com bisfosfonatos; esta expressão não apresentou diferença entre os grupos de bisfosfonatos, mas mostraram-se significativamente menos expressos em relação ao grupo controle (Figura 64). Já a expressão de Spp1 não apresentou diferença significativa entre os grupos alendronato e controle, enquanto o grupo etidronato mostrou-se cerca de 60% menos expresso que os demais grupos (Figura 65).

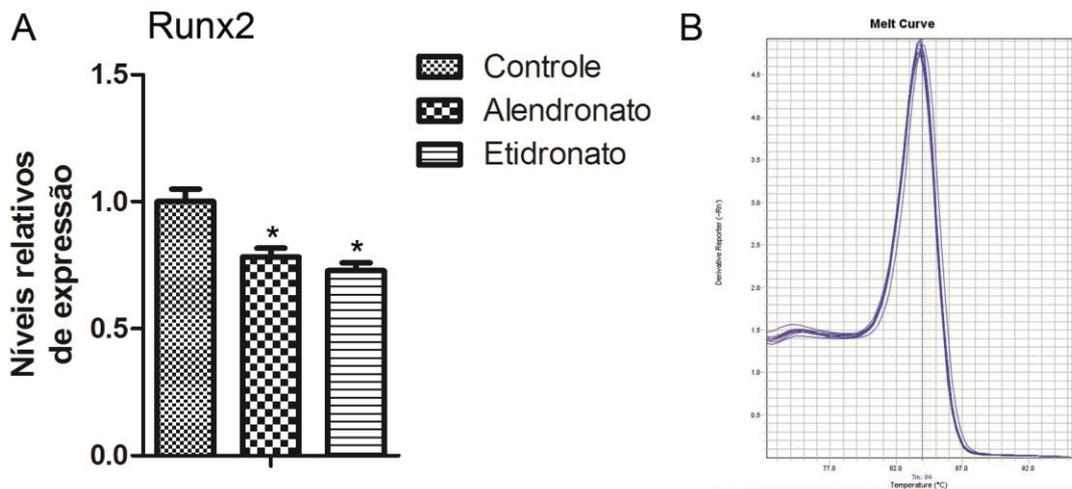


Figura 64. Expressão gênica de Runx2 *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com bisfosfonatos apresenta diminuição da expressão em relação ao grupo controle, enquanto nos dois grupos tratados a expressão é semelhante. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

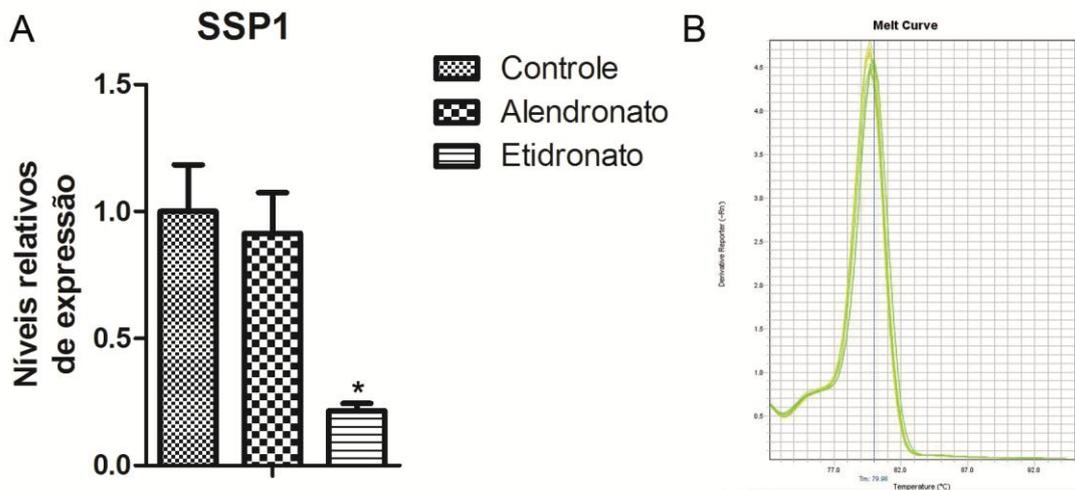


Figura 65. Expressão gênica de Spp1 *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato não apresenta alterações significativas em relação ao grupo controle, o grupo que recebeu etidronato apresenta menor expressão em relação aos demais grupos. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*=p<0,05).

5.2.4 Expressão de moléculas envolvidas na osteoclastogênese.

O grupo tratado com alendronato, não apresentou alteração de expressão nas análises proteica e gênica em relação à Rank, porém, no grupo que recebeu etidronato notou-se que ocorreu menor expressão em relação aos demais grupos onde os dados de expressão proteica e gênica mostraram valores significantes da menor expressão em relação aos demais grupos analisados (Figuras 66A e 67). A expressão da proteína RANKL, mostrou-se mais expressa nos grupos que receberam bisfosfonatos do que no grupo controle e, entre os bisfosfonatos, o grupo tratado com etidronato apresentou maior expressão que o grupo tratado com alendronato (Figura 66B). Em relação à análise da expressão gênica, esta não mostrou diferença entre os grupos controle e alendronato, enquanto a expressão deste gene no grupo etidronato foi diminuída (Figura 68). OPG apresentou maior nível de expressão nos grupos tratados com bisfosfonatos que no grupo controle (Figura 66C), porém este aumento não foi significativo no grupo etidronato. Entretanto, a expressão gênica não apresentou diferença significativa entre os

grupos alendronato e controle, enquanto no grupo etidronato a menor expressão foi significativa somente em relação ao grupo controle (Figura 69).

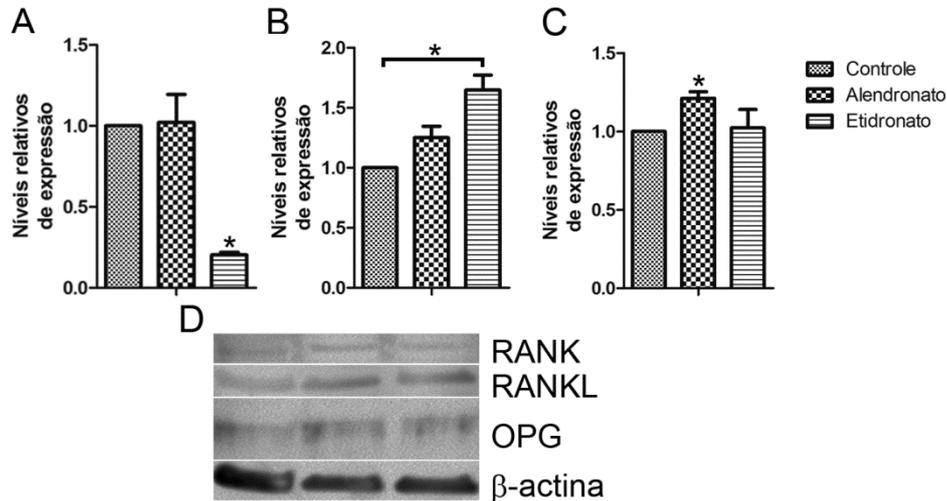


Figura 66. Expressão proteica relativa de proteínas envolvidas na osteoclastogênese em cultura primária de células tratadas ou não com bisfosfonatos. Em **A** expressão relativa de RANK, a cultura que recebeu tratamento com alendronato não apresenta alterações significativas em relação ao grupo controle, enquanto o grupo tratado com etidronato apresenta diminuição significativa em relação aos outros grupos ($*=p<0,05$). Em **B** expressão relativa de RANKL, os grupos tratados com bisfosfonatos apresentam aumento na expressão desta proteína, porém, entre os tratamentos o grupo etidronato que apresenta maior expressão em relação aos demais grupos ($*=p<0,05$). Em **C** expressão relativa de OPG, o grupo que recebeu alendronato apresenta aumento na expressão desta proteína em relação aos demais grupos, enquanto no grupo etidronato não foi observado alterações significativas ($*=p<0,05$). Em **D** imagem representativa da revelação da membrana de Western Blotting incubada com anticorpos específicos para RANK, RANKL, OPG e β -actina.

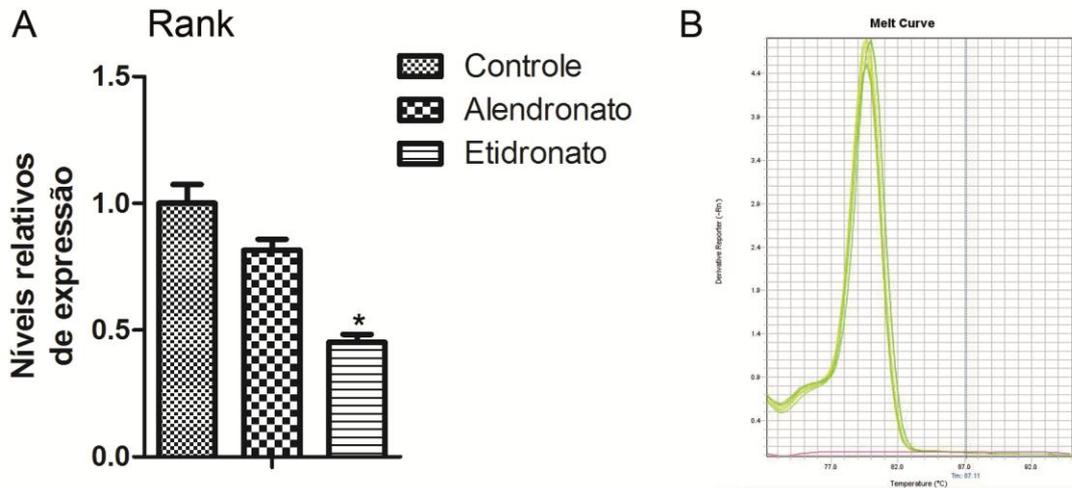


Figura 67. Expressão gênica de Rank *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com bisfosfonatos mostra uma tendência a menor expressão no grupo alendronato, em relação ao grupo controle enquanto no grupo etidronato observamos uma diminuição significativa em comparação com os demais grupos. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

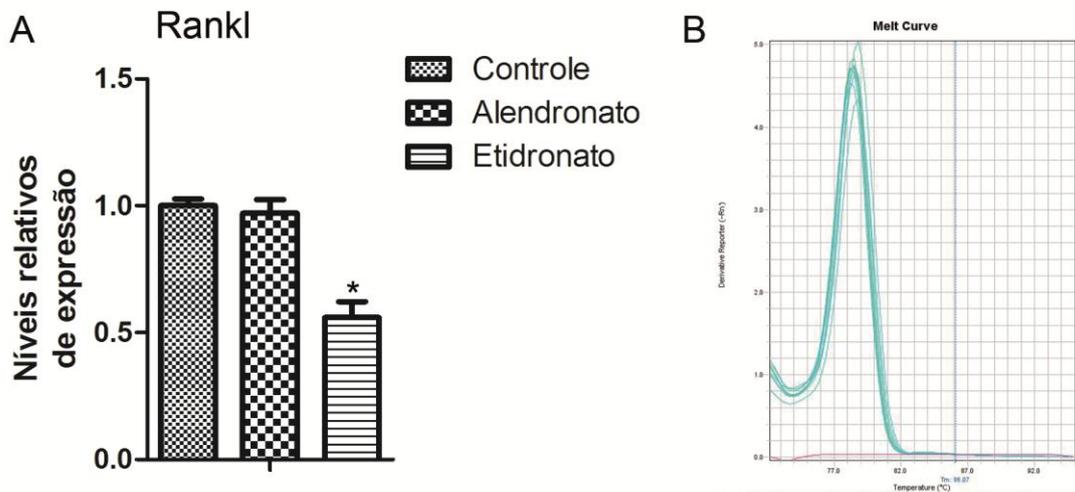


Figura 68. Expressão gênica de Rankl *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato não mostra alterações em relação ao grupo controle, enquanto o grupo etidronato mostra redução significativa em relação aos demais grupos. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

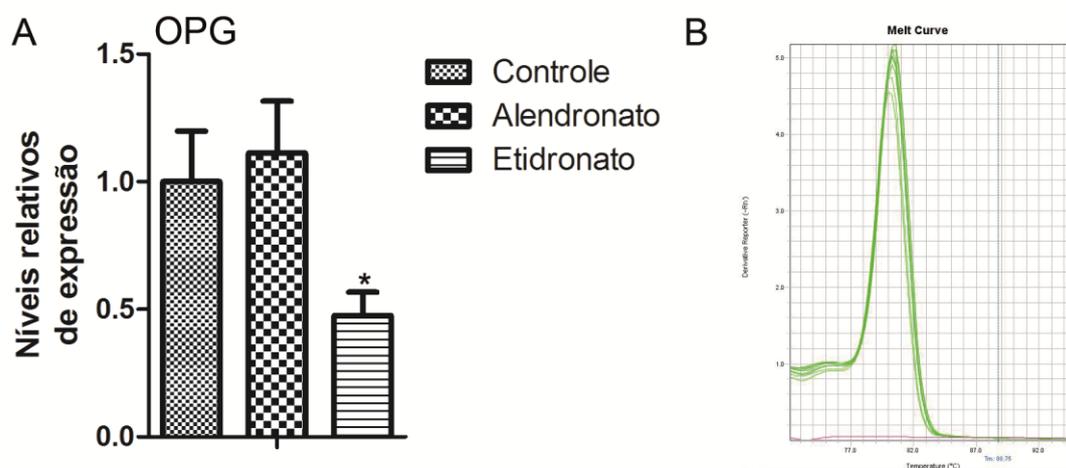


Figura 69. Expressão gênica de OPG *in vitro*. Em **A** expressão gênica da cultura primária tratada com alendronato não apresenta alterações significativas em relação ao grupo controle, enquanto o grupo que recebeu etidronato apresenta menor expressão em relação aos demais grupos. Em **B** gráfico da curva de *melt* de uma das reações (*= $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado em dois modelos distintos: modelo *in vivo* e modelo *in vitro*. No modelo *in vivo* (animais tratados) foi avaliado como os bisfosfonatos atuam no desenvolvimento endocondral, observando alterações morfológicas e moleculares; enquanto no modelo *in vitro* (cultura primária) foi possível analisar como as células de origem hematopoiética respondem ao tratamento com as mesmas drogas. A fim de complementar os achados obtidos pelos dois modelos, foram levados em consideração viabilidade e quantidade de células TRAP positivas, comparáveis às observadas *in vivo*. As análises moleculares do modelo *in vivo* mostraram alterações no conjunto de tecidos presentes na área de ossificação endocondral, enquanto no modelo *in vitro* foram analisadas somente as células de origem hematopoiética para correlacionar os achados morfológicos com os moleculares.

Os resultados *in vivo* mostraram que ambos os bisfosfonatos estudados, alendronato e etidronato, afetaram seriamente a ossificação endocondral do joelho de ratos jovens e a expressão de genes envolvidos com a apoptose, o ciclo celular, alguns genes relacionados à transdução de sinal mediado por $\text{Nf}\kappa\beta$, a osteogênese e a osteoclastogênese. A cartilagem calcificada da lâmina epifiseal dos animais tratados com bisfosfonatos não foi totalmente substituída por matriz óssea na região da zona de ossificação, no final do período de tratamento. O tratamento com alendronato resultou em trabéculas mais espessas com cartilagem calcificada em seu interior na zona de ossificação com numerosas células clásticas multinucleadas e latentes, resultando em um aspecto osteopetrótico nestes espécimes. Contrariamente, o tratamento com etidronato resultou em um aspecto osteoporótico, caracterizado por trabéculas finas, compostas de matriz de cartilagem calcificada, com muitas células clásticas multinucleadas e aderidas à matriz. O efeito anti-reabsortivo, esperado por estas drogas, não foi observado no tratamento com etidronato, porém, ambos os bisfosfonatos alteraram a formação óssea durante o processo de ossificação endocondral no joelho destes animais, o que também pôde ser observado pelas alterações gênicas encontradas neste modelo.

O peso dos animais tratados com etidronato foi menor em relação aos outros grupos. Estes resultados são concomitantes com a avaliação das radiografias, que mostraram que estes animais apresentaram uma área radiopaca menor que a dos animais controle, área correspondente com a zona de ossificação, similar com os resultados expostos por Li e colaboradores (2008), cujos animais receberam a mesma dose de etidronato. Em contraste, o grupo que recebeu alendronato apresentou a mesma região, correspondente à zona de ossificação, mais extensa que os outros grupos. Além disso, estes animais mostraram maior tendência em ganhar peso que os animais dos outros grupos. Além da pequena área de ossificação do grupo que recebeu etidronato, observada na radiografia, a análise dos cortes histológicos por microscopia de luz revelaram severas alterações na lâmina epifiseal destes animais, com desorganização das células na região de cartilagem e condrócitos presentes na área de ossificação, indicando que o etidronato interfere na proliferação de condrócitos, assim como observado em outros estudos (BOZAL et al., 2005). Diferente do etidronato, o tratamento com alendronato não alterou a lâmina epifiseal, como observado nas radiografias e da mesma forma que no grupo controle, não apresentou alterações quando analisados os cortes histológicos por microscopia de luz. Apesar dos efeitos dos bisfosfonatos no crescimento do esqueleto, como um todo, não terem sido alvo principal deste estudo, não foram encontrados relatos na literatura de que a zona de ossificação de ratos jovens tratados com etidronato é constituída por trabéculas tão finas nas metáfises durante o desenvolvimento endocondral; os resultados mostram que este tratamento resulta em animais com ossos menores e finos, o que poderia explicar o baixo peso observado nesse grupo. Além disso, as análises histológicas por microscopia de luz indicam que o alendronato não causa alteração no tecido cartilaginoso; modelos de osteoartrite também têm mostrado que o alendronato previne a reabsorção da cartilagem articular, por inibir a atividade de reabsorção das células clásticas (DING; DANIELSEN; HVID, 2008; SHIRAI et al., 2011).

O grupo etidronato apresentou pouquíssimas áreas de matriz óssea depositadas sobre os septos de cartilagem calcificada na zona de ossificação; nas análises ultra-estruturais foram observados osteoblastos com formato fusiforme e poucas organelas de síntese, sugerindo a diminuição da atividade osteoblástica nestas regiões. Também neste grupo foram encontradas as menores expressões

gênicas de Runx2, um conhecido marcador de osteoblastos. Além disso, as maiores partes dos septos de cartilagem calcificada estavam recobertas por uma fina camada de matriz óssea, que é subsequentemente reabsorvida pelas numerosas células clásticas ativas presentes neste grupo, o que explica a radiolucência na área de ossificação observada nas radiografias. Em contraste, estudos prévios mostraram que ratos tratados com etidronato, por períodos menores que os utilizados no presente estudo, apresentaram o osso trabecular recoberto por uma espessa camada de osteóide, com osteoblastos ativos presentes no perióstio, sugerindo o efeito deste bisfosfonato na mineralização da matriz (LARSSON; LARSSON, 1978; LI et al., 2008). Como a análise do material foi realizada somente ao final dos 21 dias de tratamento, não foi possível a observação da possível alteração de espessura do osteóide, como reportado por Larsson e Larsson (1978) e Li e colaboradores (2008). A inibição da mineralização também foi reportada por outros autores, que empregaram altas doses de etidronato em seus estudos (KATOH et al., 1991; SCHENK et al., 1973). Além disso, o tratamento com etidronato também mostrou interferir na diferenciação e no metabolismo dos osteoblastos (D'AOUST et al., 2000).

O grupo tratado com alendronato mostrou menos matriz óssea depositada sobre os septos de cartilagem na região da ossificação endocondral que o grupo controle. Experimentos *in vitro* demonstraram que o alendronato é responsável por diminuir a apresentação de genes expressos especificamente por osteoblastos, como o gene da sialoproteína óssea, osteonectina, fosfatase alcalina e colágeno (tipo 1 alfa 1) e que alendronato atua também nos precursores de células clásticas que interagem com os precursores de osteoblastos, inibindo, desta forma, a mineralização da matriz (SHIMIZU; TAMASI; PARTRIDGE, 2012). Além da diminuição na expressão gênica de Runx2, foi observada menor expressão do gene da osteopontina, além de outros que estão diretamente relacionados com a formação de osteoblastos como o gene da Caspase 3, Mdm2, p53 e Smad3 (MIURA et al., 2004; KAJI et al., 2006; LIU E LI, 2010; YASUI et al., 2011). Essas alterações na produção de componentes da matriz óssea alteram também o processo normal de remodelação requerido neste tipo de ossificação, assim como ocorre em outros modelos, como foi recentemente observado no reparo do osso alveolar após

extração do molar de ratos tratados com este bisfosfonato (YAMAMOTO-SILVA et al., 2013).

Todos os espécimes que receberam os bisfosfonatos apresentaram muitas células multinucleadas TRAP-positivas na zona de ossificação, porém, o número, tamanho e atividade destas células foram diferentes entre os grupos. Há relatos de que o etidronato aumenta significativamente no número de núcleos dos osteoclastos além de acelerar o recrutamento e diferenciação destas células (MILLER; JEE, 1975; MILLER et al., 1977), dados condizentes com os presentes resultados, uma vez que o número de células TRAP-positivas foi maior no grupo etidronato que no grupo alendronato; no grupo etidronato também foi observada maior expressão proteica e gênica de Rank e gênica de Smad3, responsável por participar da sinalização de TGF- β , necessária para indução da osteoclastogênese (BORTON et al., 2001). Todos os grupos apresentaram células TRAP-positivas na zona de ossificação endocondral; entretanto, nos grupos controle e etidronato foram observadas muitas células aderidas à matriz óssea, enquanto no grupo alendronato um número significativamente menor de células TRAP-positivas estavam aderidas. Em contraste, o número de células TRAP-positivas não aderidas (células clásticas latentes) foi significativamente maior no grupo que recebeu alendronato do que nos grupos que receberam solução salina e etidronato. Além disso, não apresentavam ultraestrutura típica de células reabsortivas, como zona de selamento e borda em escova; algumas células clásticas apresentaram ainda núcleos apoptóticos e, quando avaliada a expressão de genes ligados à apoptose na cultura primária das células clásticas, foi observada alta expressão neste grupo. É sabido que o alendronato é incorporado à superfície óssea por sua afinidade ao mineral, o que pode interferir na aderência das células clásticas (RUSSELL, 2006; TUREK et al., 2012). O alendronato não inibe o recrutamento, diferenciação, nem a fusão dos precursores em células multinucleadas, mas inibe sua ativação (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA; MASSA, 2007; LERNER, 2000; RUSSELL, 2011). Estas informações puderam ser confirmadas, não só pela presença das células TRAP-positivas, mas também pela tendência ao aumento na expressão proteica de Rankl nas culturas. Além disso, foi mostrado que o alendronato inibe a ativação dos osteoclastos durante os estágios de erupção dental em ratos por reduzir a expressão de RANK, assim como aumentar o número de osteoclastos não aderidos

(BRADASCHIA-CORREA et al., 2013). A presença de numerosos osteoclastos latentes confirmam os resultados de estudos prévios no desenvolvimento do osso da cabeça do côndilo da mandíbula, que também se desenvolve por ossificação endocondral e em outras regiões do processo alveolar onde o tratamento com alendronato não impede o recrutamento dos precursores de células clásticas, assim como sua fusão (BRADASCHIA-CORREA, MASSA E ARANA-CHAVEZ, 2007; BRADASCHIA-CORREA et al., 2012; YAMAMOTO-SILVA et al., 2013). Outros estudos têm demonstrado que o alendronato aumenta o número de osteoclastos (FISHER et al., 2013) e que a origem destas células, bem como a região de reabsorção, podem interferir neste fenômeno (DE SOUZA FALONI et al., 2011). Além disso, foi observado aumento na produção proteica de OPG em ambos os modelos estudados, *in vivo* e *in vitro*; outros trabalhos confirmaram que o tratamento com alendronato pode estimular osteoblastos a produzirem fatores inibidores de osteoclastos (NISHIKAWA, et al. 1996; VITTE, et al. 1996).

O crescimento dos ossos longos compreende o aumento em espessura do trabeculado dos ossos esponjosos (PARFITT et al., 2000), necessitando de um balanço positivo da remodelação, onde ocorra mais depósito de matriz óssea do que reabsorção. O presente trabalho demonstra que o tratamento com alendronato ocasiona um balanço positivo da remodelação durante o crescimento ósseo, onde a função secretora dos osteoblastos não é afetada, mas a função reabsortiva dos osteoclastos é diminuída em comparação com o grupo controle. Durante a ossificação endocondral em crianças tratadas com pamidronato, outro bisfosfonato nitrogenado, também se observou atraso na mineralização (RAUCH, et al. 2002). Contrariamente, o tratamento dos espécimes com etidronato resultou em um balanço negativo da remodelação, comparado com o controle, uma vez que neste grupo foram observadas alterações na morfologia, na expressão de genes ligados a osteogênese e a osteoclastogênese, além do aumento observado na expressão de OPG.

A expressão do gene da caspase-3 observada no modelo *in vivo* tratado com alendronato foi menor que o observado no tratamento com etidronato, enquanto no modelo *in vitro* o grupo que recebeu alendronato apresentou aumento da expressão e não ocorreram alterações significativas no grupo que recebeu etidronato. Desta

forma o grupo nitrogenado é mais eficiente em alterar a expressão gênica de caspase-3 que o grupo não nitrogenado, achado que coincide com o número de células apoptóticas encontradas no modelo *in vivo* (STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000). Quando levamos em consideração o resultado *in vitro*, notamos que as células de origem hematopoiéticas que receberam alendronato expressam maiores níveis de caspase-3, cisteína que, além de participar dos eventos apoptóticos, também está relacionada com os processos de diferenciação osteogênica em células tronco da medula óssea e densidade mineral óssea (MIURA et al., 2004). O grupo tratado com alendronato apresenta maior expressão de caspase-3 e coincide com a apresentação de trabéculas mais espessas, indicando que o aumento desta cisteína também pode influenciar nos processos de diferenciação osteogênica em nosso modelo.

No modelo *in vivo*, *myc* é pouco expresso nos tecidos que receberam ambos os bisfosfonatos, indicando que aí as células estão em constante processo de diferenciação, uma vez que está ocorrendo ossificação endocondral (POMPETTI; PILLA; GIANCOLA, 2003). Diferentemente, no modelo *in vitro* ocorreu superexpressão deste oncogene nas células que receberam alendronato, enquanto no grupo tratado com etidronato não houve alteração na expressão. O aumento observado pode estar relacionado com diferentes processos celulares, como indução da apoptose e aumento da proliferação, pois foi visto que o alendronato aumenta o número de células em apoptose e, quando adicionado à cultura, aumenta a viabilidade destas células. O oncogene *myc* apresenta um papel estratégico no controle do ciclo celular, é regulado por estímulos mitogênicos e sua superexpressão aumenta a proliferação celular, bloqueia a diferenciação e induz a apoptose (EVAN et al., 1992; POMPETTI; PILLA; GIANCOLA, 2003; ZHAO et al., 2007).

Ainda em relação aos genes indicados por participarem do processo de apoptose, no modelo *in vivo* o alendronato inibiu a expressão de p53 enquanto Mdm2 foi pouco expresso. No modelo *in vitro*, este bisfosfonato, aumenta a expressão de p53, sem alterar a expressão de Mdm2. Uma vez que o aumento de p53 ocorre nas células de origem hematopoiética, espera-se aumento da apoptose, como foi observado no modelo *in vivo*, onde ocorreu aumento da apoptose nas células clásticas. No tecido, os baixos níveis deste gene indicam que as células

estão em constante processo de diferenciação, uma vez que o processo de ossificação endocondral não estava finalizado nos animais. Foi visto, ainda, que o grupo que recebeu alendronato exibe baixa expressão de Runx2 e Spp1 no modelo *in vivo*; por outro lado, no modelo *in vitro* leve diminuição na expressão de Runx2, enquanto Spp1 é expresso normalmente. Sabe-se que p53 além de um importante promotor da apoptose é responsável por regular a diferenciação de osteoblastos devido à modulação da expressão de Runx2 (HE et al., 2013), além de inibir a expressão de osteopontina e osteocalcina, interferindo, assim, na diferenciação terminal dos osteoblastos (LIU; LI, 2010). Estes dados em conjunto com nossos achados indicam que os precursores de osteoblastos não foram afetados no modelo *in vitro*, o que coincide com as observações morfológicas do grupo que recebeu este bisfosfonato. O etidronato, por sua vez, no modelo *in vivo* também diminui a expressão de p53, Mdm2, Runx2 e Spp1; neste grupo, porém, foram encontradas alterações morfológicas nos osteoblastos e poucas células em apoptose, o que explica os resultados das análises gênicas. Diferentemente, no modelo *in vitro*, o etidronato leva ao aumento da expressão de Mdm2 e à leve diminuição de p53 uma vez que este é alvo de Mdm2; já Runx2 e Spp1 também são pouco expressos sugerindo, mais uma vez, que o etidronato interfere diretamente na diferenciação osteoblástica, que resultaria nas trabéculas finas, como comentado anteriormente.

Membros da superfamília do TGF- β interagem diretamente com as células do tecido ósseo. Smad3 é um importante membro da via clássica de sinalização de TGF- β e está diretamente ligada a proliferação celular (MASSAGUE, 2012; MASSAGUE; XI, 2012). O modelo *in vivo* mostrou baixa expressão de Smad3 em ambos os tratamentos, onde foi também observado maior quantidade de cartilagem calcificada; estudos mostram que a falta de Smad3 na formação óssea causa fenótipo de osteopenia e diminui a formação óssea associada ao aumento da apoptose de osteócitos e osteoblastos (BORTON et al., 2001; KAJI et al., 2006), indicando que a baixa expressão deste gene poderia contribuir para o evento da menor formação óssea observada nos animais tratados com bisfosfonatos. No modelo *in vitro* não houve alteração no grupo que recebeu alendronato, entretanto, no grupo que recebeu etidronato aumentou significativamente em relação ao grupo controle. De fato, o grupo tratado com etidronato apresentou uma quantidade maior de células clásticas que o grupo que recebeu alendronato o que poderia ser

explicado pela ação da Smad3 nos osteoclastos, possivelmente interagindo com TRAF6 na transdução da sinalização de RANK/RANKL, levando ao aumento na formação destas células (YASUI et al., 2011). Entretanto, este grupo apresentou também osteoblastos quiescentes, uma vez que Smad3 interage com Runx2 inibindo sua expressão e impedindo, desta forma, o início da diferenciação dessas células (ALLISTON et al., 2001).

Os demais genes do ciclo celular seguem um padrão semelhante de baixa expressão em ambos os tratamentos no modelo *in vivo*. Diferentemente, quando analisados *in vitro*, foi observado aumento destes genes no grupo que recebeu alendronato, enquanto no grupo tratado com etidronato a diminuição ocorreu apenas com Mad2L1. Além disso, não foram observadas alterações de Cdk4, ciclina que leva à degradação de Runx2 pelo processo de ubiquitina-proteassoma em osteoblastos diferenciados *in vitro* (SHEN et al., 2006). Os osteoclastos, por sua vez, sofrem a ação Mapk3 em conjunto com BMP-9 que aumentam a atividade de reabsorção destas células e as protege dos processos apoptóticos (FONG et al., 2013). Os resultados obtidos *in vivo* sugerem que a diminuição de Mapk3 não foi suficiente para impedir a morte celular programada. No modelo *in vitro*, cuja apresentação deste gene foi maior no grupo tratado com alendronato, foi observado aumento nos genes envolvidos na sinalização mediada por $\text{NF}\kappa\beta$, enquanto sua diminuição em ambos os tratamentos no modelo *in vivo* também coincide com a baixa expressão dos componentes da sinalização mediada por $\text{NF}\kappa\text{B}$. Problemas na apresentação gênica de Mapk3 interferem na via de sinalização p38MAPK em modelos de osteoartrite (WYSK et al., 1999), responsável por regular componentes da sinalização mediada de $\text{NF}\kappa\beta$ (VANDEN BERGHE et al., 1998). A baixa expressão de genes responsáveis por compor o complexo $\text{NF}\kappa\beta$ no presente modelo *in vivo* é um indicio de que os bisfosfonatos não induzem processos inflamatórios. Estudos têm mostrado que $\text{NF}\kappa\text{B}$, além de mediar a resposta inflamatória, seria necessário para a expressão de TNFs (fator de necrose tumoral), como RANKL (SANTINI et al., 2011) que auxilia em processos de proliferação celular, inibição da apoptose e estímulo da angiogênese (LOREA et al., 2012; WATSON et al., 2009).

A correlação entre os aspectos morfológicos observados *in vivo* e os resultados moleculares *in vitro* foram importantes para traçar um perfil dos eventos

observados neste tecido em desenvolvimento, uma vez que a análise molecular exclusivamente das células responsáveis pela formação óssea não seria possível no modelo *in vivo*. Além disso, o presente estudo foi o primeiro a relacionar modelos distintos para elucidar o que vários trabalhos vêm apresentando ao longo dos anos. O entendimento dos eventos moleculares que acometem os estágios iniciais da formação endocondral do tecido ósseo e principalmente as células de origem hematopoiética frente ao tratamento com bisfosfonatos, foram essenciais para esclarecer os eventos morfológicos observados.

Adicionalmente, os achados do presente estudo podem contribuir para o entendimento não só dos eventos que ocorrem durante as terapias empregadas para o tratamento de muitas desordens ósseas, como osteogênese imperfeita, doença de Paget, e tumores ósseos, além de osteoporoses secundárias relacionadas a anorexia nervosa, paralisia cerebral e após transplantes renais em crianças (BACHRACH; WARD, 2009; BISHOP, 2005; KAMOUN-GOLDRAT; GINISTY; LE MERRER, 2008; MAASALU; HAVIKO; MARTSON, 2003; SHAW), onde a ossificação endocondral ainda está acontecendo e pode prejudicar seriamente o desenvolvimento ósseo destes indivíduos, como também contribuir para o entendimento dos eventos moleculares no início da ossificação endocondral. Entretanto, experimentos adicionais são necessários para o melhor entendimento da ação destes bisfosfonatos nos eventos moleculares que regem a dinâmica das células osteogênicas.

7 CONCLUSÃO

Os dois bisfosfonatos estudados levaram a modificações teciduais e moleculares, interferindo na ossificação endocondral.

O alendronato é o mais potente entre os bisfosfonatos estudados em inibir a ação dos osteoclastos durante o processo de ossificação endocondral, no modelo *in vivo*. As doses utilizadas de etidronato, no mesmo modelo, não alteram a ação dos osteoclastos, mas atuam ativamente nos osteoblastos.

Em ambos os modelos, o alendronato altera a expressão de importantes genes relacionados a apoptose, ao ciclo celular, a transdução de sinal mediada por $Nf\kappa\beta$ e a osteogênese, além de alterar a expressão de proteínas essenciais para ativação e formação das células clásticas, enquanto o etidronato diminui a expressão dos genes analisados, porém de maneira mais branda. O etidronato diminui a expressão dos genes *Runx2* e *Rankl*, produzidos por osteoblastos.

No modelo *in vivo*, o etidronato não altera a expressão da maioria dos genes estudados; alterações mais expressivas foram observadas nos genes relacionados à formação de matriz óssea.

REFERÊNCIAS*

AADACHI, J. D.; BENSEN, W. G.; BROWN, J.; HANLEY, D.; HODSMAN, A.; JOSSE, R.; KENDLER, D. L.; LENTLE, B.; OLSZYNSKI, W.; STE-MARIE, L. G.; TENENHOUSE, A.; CHINES, A. A. Intermittent etidronate therapy to prevent corticosteroid-induced osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n. 6, p. 382-387, 1997.

ALLISTON, T.; CHOY, L.; DUCY, P.; KARSENTY, G.; DERYNCK, R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. **Embo. J.**, v. 20, n. 9, p. 2254-2272, 2001.

ARANA-CHAVEZ, V.; BRADACHIA-CORREA, V. **Biologia celular e tecidual para odontologia: moléculas, células e tecidos**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ARANA-CHAVEZ, V. E.; BRADASCHIA-CORREA, V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, p. 446-450, 2009.

ASAGIRI, M.; TAKAYANAGI, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 251-264, 2007.

BACHRACH, L. K.; WARD, L. M. Clinical review 1: Bisphosphonate use in childhood osteoporosis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 94, n. 2, p. 400-409, 2009.

BIANCO, P.; CANCEDDA, F. D.; RIMINUCCI, M.; CANCEDDA, R. Bone formation via cartilage models: the "borderline" chondrocyte. **Matrix Biol.**, v. 17, p. 185-192, 1998.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **J. Bone Miner. Res.**, v. 26, n. 2, p. 229-238, 2011.

BOONEN, S.; LAAN, R. F.; BARTON, I. P.; WATTS, N. B. Effect of osteoporosis treatments on risk of non-vertebral fractures: review and meta-analysis of intention-to-treat studies. **Osteoporos Int.**, v. 16, n. 10, p. 1291-1298, 2005.

BORTON, A. J.; FREDERICK, J. P.; DATTO, M. B.; WANG, X. F.; WEINSTEIN, R. S. The loss of Smad3 results in a lower rate of bone formation and osteopenia through dysregulation of osteoblast differentiation and apoptosis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 16, n. 10, p. 1754-1764, 2001.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOZAL, C. B.; MARTINEZ, A. B.; CABRINI, R. L.; UBIOS, A. M. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP) on endochondral ossification lesions induced by a lethal oral dose of uranyl nitrate. **Arch. Toxicol.**, v. 79, n. 8, p. 475-481, 2005.

BOYCE, B. F.; YAO, Z.; XING, L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 19, p. 171-180, 2009.

BRADASCHIA-CORREA, V.; BARRENCE, F. A.; FERREIRA, L. B.; MASSA, L. F.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Effect of alendronate on endochondral ossification in mandibular condyles of growing rats. **Eur. J. Histochem.**, v. 56, p. 24, 2012.

BRADASCHIA-CORREA, V.; MASSA, L. F.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. **Cell Tissue Res.**, v. 330, n. 3, p. 475-485, 2007.

BRADASCHIA-CORREA, V.; MOREIRA, M. M.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Reduced RANKL expression impedes osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats. **Cell Tissue Res.**, v. 353, p. 79-86, 2013.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bind. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

COXON, F. P.; TAYLOR, A. Vesicular trafficking in osteoclasts. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 19, n. 5, p. 424-433, 2008.

D'AOUST, P.; MCCULLOCH, C. A.; TENENBAUM, H. C.; LEKIC, P. C. Etidronate (HEBP) promotes osteoblast differentiation and wound closure in rat calvaria. **Cell Tissue Res.**, v. 302, n. 3, p. 353-363, 2000.

DAROSZEWSKA, A.; RALSTON, S. H. Genetics of Paget's disease of bone. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 109, n. 3, p. 257-263, 2005.

DE SOUZA FALONI, A. P.; SCHOENMAKER, T.; AZARI, A.; KATCHBURIAN, E.; CERRI, P. S.; DE VRIES, T. J. Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. **Calcif. Tissue Int.**, v. 88, n. 1, p. 63-74, 2011.

DING, M.; DANIELSEN, C. C.; HVID, I. The effects of bone remodeling inhibition by alendronate on three-dimensional microarchitecture of subchondral bone tissues in guinea pig primary osteoarthritis. **Calcif. Tissue Int.**, v. 82, n. 1, p. 77-86, 2008.

EVAN, G. I.; WYLLIE, A. H.; GILBERT, C. S.; LITTLEWOOD, T. D.; LAND, H.; BROOKS, M.; WATERS, C. M.; PENN, L. Z.; HANCOCK, D. C. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. **Cell**, v. 69, n. 1, p. 119-128, 1992.

ELSEGOOD, C. L.; ZHUO, Y.; WESOLOWSKI, G. A.; HAMILTON, J. A.; RODAN, G. A.; DUONG LE, T. M-CSF induces the stable interaction of cFms with alphaVbeta3 integrin in osteoclasts. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 38, n. 9, p. 1518-1529, 2006.

FISHER, J. E.; ROSENBERG, E.; SANTORA, A. C.; RESZKA, A. A. In Vitro and In Vivo Responses to High and Low Doses of Nitrogen-Containing Bisphosphonates Suggest Engagement of Different Mechanisms for Inhibition of Osteoclastic Bone Resorption. **Calcif. Tissue Int.**, v. 92, p. 531-538, 2013.

FONG, D.; BISSON, M.; LABERGE, G.; MCMANUS, S.; GRENIER, G.; FAUCHEUX, N.; ROUX, S. Bone morphogenetic protein-9 activates Smad and ERK pathways and supports human osteoclast function and survival in vitro. **Cell Signal.**, v. 25, n. 4, p. 717-728, 2013.

FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K.; WITTEN, P. E. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. **Dev. Dyn.**, v. 235, n. 1, p. 176-190, 2006.

FROST, H. M. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. **Anat. Rec.**, v. 226, n. 4, p. 414-422, 1990.

GUISE, T. A.; MUNDY, G. R. Cancer and bone. **Endocr. Rev.**, v. 19, n. 1, p. 18-54, 1998.

GUNTUR, A. R.; ROSEN, C. J. The skeleton: a multi-functional complex organ: new insights into osteoblasts and their role in bone formation: the central role of PI3Kinase. **J. Endocrinol.**, v. 211, n. 2, p. 123-130, 2011.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1092, p. 385-396, 2006.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 509-514, 1998.

HAUSMANN, E.; BISAZ, S.; RUSSEL, R. G.; FLEISCH, H. The concentration of inorganic pyrophosphate in human saliva and dental calculus. **Arch. Oral Biol.**, v. 15, n. 12, p. 1389-1392, 1970.

HE, Y.; LIAN, G.; LIN, S.; YE, Z.; LI, Q. MDM2 Inhibits Axin-Induced p53 Activation Independently of its E3 Ligase. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. 67529, 2013.

HOLLIDAY, L. S. ; DEAN, A. D. ; GREENWALD, J. E. ; GLUCKS, S. L. C-type natriuretic peptide increases bone resorption in 1,25-dihydroxyvitamin D₃-stimulates mouse bone marrow culture. **J. Biol. Chem.**, v. 32, n. 7, p. 18983-18989, 1995.

HSU, H.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; SOLOVYEV, I.; COLOMBERO, A.; TIMMS, E.; TAN, H. L.; ELLIOTT, G.; KELLEY, M. J.; SAROSI, I.; WANG, L.; XIA, X. Z.; ELLIOTT, R.; CHIU, L.; BLACK, T.; SCULLY, S.; CAPPARELLI, C.; MORONY, S.; SHIMAMOTO, G.; BASS, M. B.; BOYLE, W. J. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 7, p. 3540-3545, 1999.

ILVESARO, J. M.; LAKKAKORPI, P. T.; VAANANEN, H. K. Inhibition of bone resorption in vitro by a peptide containing the cadherin cell adhesion recognition sequence HAV is due to prevention of sealing zone formation. **Exp. Cell. Res.**, v. 242, n. 1, p. 75-83, 1998.

JEE, W. S.; NOLAN, P. D. ORIGIN Of Osteoclasts From The Fusion Of Phagocytes. **Nature**, v. 200, p. 225-226, 1963.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica. 11^o edição.**Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KAJI, H.; NAITO, J.; SOWA, H.; SUGIMOTO, T.; CHIHARA, K. Serum soluble factors induce the proliferation, alkaline phosphatase activity and transforming growth factor-beta signal in osteoblastic cells in the patient with hepatitis C-associated osteosclerosis. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 114, n. 10, p. 599-604, 2006.

KAMOUN-GOLDRAT, A.; GINISTY, D.; LE MERRER, M. Effects of bisphosphonates on tooth eruption in children with osteogenesis. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 116, n. 3, p. 195-198, 2008.

KATOH, Y.; TSUJI, H.; MATSUI, H.; MARUTA, K.; MORITA, Y. Effects of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate on cell differentiation, and proteoglycan and calcium metabolism, in the proximal tibia of young rats. **Bone**, v. 12, n. 2, p. 59-65, 1991.

LANDESBURG, R.; EISIG, S.; FENNOY, I.; SIRIS, E. Alternative indications for bisphosphonate therapy. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 67, p. 27-34, 2009.

LARSSON, A. The effects of ethylene-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate on the developing mandibular condyle - a light microscopic study. **Acta. Odontol. Scand.**, v. 35, n. 4, p. 217-223, 1977.

LARSSON, A.; LARSSON, S. E. The effects of ethylene-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate on cellular transformation and organic matrix of the epiphyseal growth plate of the rat--a light microscopic and ultrastructural study. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand. A.**, v. 86, n. 3, p. 211-223, 1978.

LERNER, U. H. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biol.**, v. 19, p. 107- 20, 2000.

LI, Z.; KONG, K.; QI, W. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 343, p. 345-350, 2006.

LI, Y.; NAKAYAMA, H.; NOTANI, T.; AHMAD, M.; TABATA, M. J.; TAKANO, Y. Phosphatase actions at the site of appositional mineralization in bisphosphonate-affected bones of the rat. **J. Med. Dent. Sci.**, v. 55, n. 3-4, p. 255-265, 2008.

LIU, H.; LI, B. p53 control of bone remodeling. **J. Cell Biochem.**, v. 111, n. 3, p. 529-534, 2010.

LONG, F.; ORNITZ, D. M. Development of the endochondral skeleton. **Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.**, v. 5, n. 1, p. 8334, 2013.

LOREA, C. F.; MORENO, D. A.; BORGES, K. S.; MARTINELLI, C. E., JR.; ANTONINI, S. R.; DE CASTRO, M.; TUCCI, S., JR.; NEDER, L.; RAMALHO, L. N.; CARDINALLI, I.; SEIDINGER, A. L.; MASTELLARO, M. J.; YUNES, J. A.; BRANDALISE, S. R.; TONE, L. G.; SCRIDELI, C. A. Expression profile of apoptosis-related genes in childhood adrenocortical tumors: low level of expression of BCL2 and TNF genes suggests a poor prognosis. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 167, n. 2, p. 199-208, 2012.

MAASALU, K.; HAVIKO, T.; MARTSON, A. Treatment of children with Osteogenesis imperfecta in Estonia. **Acta. Paediatr.**, v. 92, n. 4, p. 452-455, 2003.

MACKIE, E. J.; TATARCZUCH, L.; MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. **J. Endocrinol.**, v. 211, p. 109-121, 2011.

MASSAGUE, J. TGFbeta signalling in context. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 13, n. 10, p. 616-630, 2012.

MASSAGUE, J.; XI, Q. TGF-beta control of stem cell differentiation genes. **FEBS Lett.**, v. 586, n. 14, p. 1953-1958, 2012.

MASSA, L. F.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 108, p. 74-77, 2000.

MASSA, L. F.; BRADASCHIA-CORREA, V.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Immunocytochemical study of amelogenin deposition during the early odontogenesis of molars in alendronate-treated newborn rats **J. Histochem. Cytochem.** v. 54, p. 713-725, 2006.

MILLER, S. C.; JEE, W. S. Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP). Effects on growth and modeling of the rat tibia. **Calcif. Tissue Res.**, v. 18, n. 3, p. 215-231, 1975.

MILLER, S. C.; JEE, W. S.; KIMMEL, D. B.; WOODBURY, L. Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) effects on incorporation and accumulation of osteoclast nuclei. **Calcif. Tissue Res.**, v. 22, n. 3, p. 243-252, 1977.

MIURA, M.; CHEN, X. D.; ALLEN, M. R.; BI, Y.; GRONTHOS, S.; SEO, B. M.; LAKHANI, S.; FLAVELL, R. A.; FENG, X. H.; ROBEY, P. G.; YOUNG, M.; SHI, A. The crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 12, p. 1704-1713, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colocrimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** v. 65, p. 55-63, 1983.

MUNDY, G. R. Myeloma bone disease. **Eur. J. Cancer**, v. 34, n. 2, p. 246-251, 1998.

MUNDY, G. R.; YONEDA, T. Bisphosphonates as anticancer drugs. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n. 6, p. 398-400, 1998.

NISHIKAWA, M.; AKATSU, T.; KATAYAMA, Y.; YASUTOMO, Y.; KADO, S.; KUGAL, N.; YAMAMOTO, M.; NAGATA, N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures **Bone** v. 18, p. 9-14, 1996.

ORY, S.; BRAZIER, H.; PAWLAK, G.; BLANGY, A. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 87, n. 8-9, p. 469-477, 2008.

OSTROV, D. A.; MAGIS, A. T.; WRONSKI, T. J.; CHAN, E. K.; TORO, E. J.; DONATELLI, R. E.; SAJEK, K.; HAROUN, I. N.; NAGIB, M. I.; PIEDRAHITA, A.; HARRIS, A.; HOLLIDAY, L. S. Identification of enoxacin as an inhibitor of osteoclast formation and bone. **J. Med. Chem.** v. 52, p. 5144-5151, 2009.

PARFITT, A. M.; TRAVERS, R.; RAUCH, F.; GLORIEUX, F. H. S. Structural and cellular changes during bone growth in healthy children. **Bone**, v. 27, p. 487-94, 2000.

PARFITT, A. M. Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. **J. Musculoskelet Neuronal. Interact.**, v. 2, n. 6, p. 499-500, 2002.

POMPETTI, F.; PILLA, D.; GIANCOLA, R. Cancer therapy: switching off oncogenes. **Bioessays**, v. 25, n. 2, p. 104-107, 2003.

QIU, S.; RAO, D. S.; PALNITKAR, S.; PARFITT, A. M. Relationships between osteocyte density and bone formation rate in human cancellous bone. **Bone**, v. 31, n. 6, p. 709-711, 2002.

RAUCH, F.; TRAVERS, R.; PLOTKIN, H.; GLORIEUX, F. H. The effects of intravenous pamidronate on the bone tissue of children and adolescents with osteogenesis imperfecta **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 1293-1299, 2002.

REIS, E. M.; OJOPI, E. P.; ALBERTO, F. L.; RAHAL, P.; TSUKUMO, F.; MANCINI, U. M.; GUIMARAES, G. S.; THOMPSON, G. M.; CAMACHO, C.; MIRACCA, E.; CARVALHO, A. L.; MACHADO, A. A.; PAQUOLA, A. C.; CERUTTI, J. M.; DA SILVA, A. M.; PEREIRA, G. G.; VALENTINI, S. R.; NAGAI, M. A.; KOWALSKI, L. P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; TAJARA, E. H.; DIAS-NETO, E.; BENGTSON, M. H.; CANEVARI, R. A.; CARAZZOLLE, M. F.; COLIN, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C.; ESTECIO, M. R.; ESTEVES, L. I.; FEDERICO, M. H.; GUIMARAES, P. E.; HACKEL, C.; KIMURA, E. T.; LEONI, S. G.; MACIEL, R. M.; MAISTRO, S.; MANGONE, F. R.; MASSIRER, K. B.; MATSUO, S. E.; NOBREGA, F. G.; NOBREGA, M. P.; NUNES, D. N.; NUNES, F.; PANDOLFI, J. R.; PARDINI, M. I.; PASINI, F. S.; PERES, T.; RAINHO, C. A.; DOS REIS, P. P.; RODRIGUS-LISONI, F. C.; ROGATTO, S. R.; DOS SANTOS, A.; DOS SANTOS, P. C.; SOGAYAR, M. C.; ZANELLI, C. F. Large-scale transcriptome analyses reveal new genetic marker candidate of head, neck and thyroid cancer. **Cancer Res.**, v. 65, p. 1693-1699, 2005.

RIMINUCCI, M.; BRADBEER, J. N.; CORSI, A.; GENTILI, C.; DESCALZI, F.; CANCEDDA, R.; BIANCO, P. Vis-a-vis cells and the priming of bone formation. **J Bone Miner. Res.**, v. 13, n. 12, p. 1852-1861, 1998.

ROODMAN, G. D. Regulation of osteoclast differentiation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1068, p. 100-109, 2006.

ROSENFELD, J. L.; KNOLL, B. J.; MOORE, R. H. Regulation of G-protein-coupled receptor activity by rab GTPases. **Receptors Channels**, v. 8, n. 2, p. 87-97, 2002.

RUSSELL, R. G. Bisphosphonates: from bench to bedside. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1068, p. 367-401, 2006.

RUSSELL, R. G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone**, v. 49, p. 2-19, 2011.

RUSSELL, R. G.; WATTS, N. B.; EBETINO, F. H.; ROGERS, M. J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. **Osteoporos Int.**, v. 19, n. 6, p. 733-759, 2008.

SAAG, K. G.; EMKEY, R.; SCHNITZER, T. J.; BROWN, J. P.; HAWKINS, F.; GOEMAERE, S.; THAMSBORG, G.; LIBERMAN, U. A.; DELMAS, P. D.; MALICE, M. P.; CZACHUR, M.; DAIFOTIS, A. G. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, n. 5, p. 292-299, 1998.

SAMANNA, V.; MA, T.; MAK, T. W.; ROGERS, M.; CHELLAIAH, M. A. Actin polymerization modules CD44 surface expression, MMP-9 activation, and osteoclast function. **J. Cell Physiol.**, v. 213, p. 710-720, 2007.

SANTINI, D.; SCHIAVON, G.; VINCENZI, B.; GAETA, L.; PANTANO, F.; RUSSO, A.; ORTEGA, C.; PORTA, C.; GALLUZZO, S.; ARMENTO, G.; LA VERDE, N.; CAROTI, C.; TREILLEUX, I.; RUGGIERO, A.; PERRONE, G.; ADDEO, R.; CLEZARDIN, P.; MUDA, A. O.; TONINI, G. Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. 19234, 2011.

Shaw, N. J.; Bishop, N. J. Bisphosphonate treatment of bone disease. **Arch Dis Child**. England, v.90, p.494-9. 2005.

SCHENK, R.; EGGLI, P.; FLEISCH, H.; ROSINI, S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. **Calcif Tissue Int.**, v. 38, n. 6, p. 342-349, 1986.

SCHENK, R.; MERZ, W. A.; MUHLBAUER, R.; RUSSELL, R. G.; FLEISCH, H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) and dichloromethylene diphosphonate (Cl 2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. **Calcif. Tissue Res.**, v. 11, n. 3, p. 196-214, 1973.

SHEN, R.; WANG, X.; DRISSI, H.; LIU, F.; O'KEEFE, R. J.; CHEN, D. Cyclin D1-cdk4 induce runx2 ubiquitination and degradation. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 24, p. 16347-16353, 2006.

SHIMIZU, E.; TAMASI, J.; PARTRIDGE, N. C. Alendronate affects osteoblast functions by crosstalk through EphrinB1-EphB. **J. Dent. Res.**, v. 91, p. 268-274, 2012.

SHIRAI, T.; KOBAYASHI, M.; NISHITANI, K.; SATAKE, T.; KUROKI, H.; NAKAGAWA, Y.; NAKAMURA, T. Chondroprotective effect of alendronate in a rabbit model of osteoarthritis. **J. Orthop. Res.**, v. 29, n. 10, p. 1572-1557, 2011.

SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; KELLEY, M.; CHANG, M. S.; LUTHY, R.; NGUYEN, H. Q.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DEROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; TAN, H. L.; TRAIL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T. M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 309-319, 1997.

SPARIDANS, R. W.; TWISS, I. M.; TALBOT, S. Bisphosphonates in bone diseases. **Pharm. World Sci.**, v. 20, n. 5, p. 206-213, 1998.

STENBECK, G.; HORTON, M. A. A new specialized cell-matrix interaction in actively resorbing osteoclasts. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 1577-1587, 2000.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 217-245, 2000.

TABUCHI, M.; MIYAZAWA, K.; KIMURA, M.; MAEDA, H.; KAWAI, T.; KAMEYAMA, Y.; GOTO, S. Enhancement of crude bone morphogenetic protein-induced new bone formation and. **Calcif. Tissue Int.**, v. 77, n. 4, p. 239-249, 2005.

TAKANO, Y.; SAKAI, H.; BABA, O.; SAKAMOTO, Y.; TERASHIMA, T.; OHYA, K.; KUROSAKI, N. Demonstration of putative Ca-binding domains in dentin matrix of rat incisors after daily injections of 1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate (HEBP). **Eur. J. Oral Sci.**, v. 106, p. 274-281, 1998.

TAYLOR, A.; MULES, E. H.; SEABRA, M. C.; HELFRICH, M. H.; ROGERS, M. J.; COXON, F. P. Impaired prenylation of Rab GTPases in the gunmetal mouse causes defects in bone cell function. **Small GTPases**, v. 2, n. 3, p. 131-142, 2011.

TUREK, J.; EBETINO, F. H.; LUNDY, M. W.; SUN, S.; KASHEMIROV, B. A.; MCKENNA, C. E.; GALLANT, M. A.; PLOTKIN, L. I.; BELLIDO, T.; DUAN, X.; TRIFFITT, J. T.; RUSSELL, R. G.; BURR, D. B.; ALLEN, M. R. Bisphosphonate binding affinity affects drug distribution in both intracortical and trabecular bone of rabbits. **Calcif. Tissue Int.**, v. 90, n. 3, p. 202-210, 2012.

UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; AKATSU, T.; TANAKA, H.; SASAKI, T.; NISHIHARA, T.; KOGA, T.; MARTIN, T. J.; SUDA, T. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 18, p. 7260-7264, 1990.

VAANANEN, H. K.; ZHAO, H.; MULARI, M.; HALLEEN, J. M. The cell biology of osteoclast function. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 377-381, 2000.

VANDEN BERGHE, W.; PLAISANCE, S.; BOONE, E.; DE BOSSCHER, K.; SCHMITZ, M. L.; FIERS, W.; HAEGEMAN, G. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 6, p. 3285-3290, 1998.

VITTE, C.; FLEISCH, H.; GUENTHER, H. L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete inhibitor of osteoclast-mediated resorption. **Endocrinology**, v. 137, p. 2324-2333, 1966.

WANG, Y.; INGER, M.; JIANG, H.; TENENBAUM, H.; GLOGAUER, M. CD109 plays a role in osteoclastogenesis. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. 61213, 2013.

WARSHAWSKY, H.; MOORE, G. A technique for the fixation and decalcification of rats incisors for electron microscopy. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 15, p. 542-549, 1967.

WATSON, C.; MILLER, D. A.; CHIN-SINEX, H.; LOSCH, A.; HUGHES, W.; SWEENEY, C.; MENDONCA, M. S. Suppression of NF-kappaB activity by parthenolide induces X-ray sensitivity through inhibition of split-dose repair in TP53 null prostate cancer cells. **Radiat. Res.**, v. 171, n. 4, p. 389-396, 2009.

WYSK, M.; YANG, D. D.; LU, H. T.; FLAVELL, R. A.; DAVIS, R. J. Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, n. 7, p. 3763-3768, 1999.

XING, L.; XIU, Y.; BOYCE, B. F. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. **World J. Orthop.**, v. 3, n. 12, p. 212-222, 2012.

YAMAMOTO-SILVA, F. P.; BRADASCHIA-CORREA, V.; LIMA, L. A.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Ultrastructural and immunohistochemical study of early repair of alveolar sockets after the extraction of molars from alendronate-treated rats. **Microsc. Res. Tech.**, v. 76, n. 6, p. 633-640, 2013.

YASUI, T.; KADONO, Y.; NAKAMURA, M.; OSHIMA, Y.; MATSUMOTO, T.; MASUDA, H.; HIROSE, J.; OMATA, Y.; YASUDA, H.; IMAMURA, T.; NAKAMURA, K.; TANAKA, S. Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF-beta through molecular interaction between Smad3 and Traf6. **J. Bone Miner. Res.**, v. 26, n. 7, p. 1447-1456, 2011.

ZHAO, Q.; SHAO, J.; CHEN, W.; LI, Y. P. Osteoclast differentiation and gene regulation. **Front. Biosci.**, v. 12, p. 2519-2529, 2007.