

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

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 a cima 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.

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.

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 $\text{Nf}\kappa\beta$ 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.