

Ana Paula de Souza Faloni

**MORTE CELULAR DE OSTEOCLASTOS DO OSSO ALVEOLAR
DE RATAS TRATADAS COM ESTRÓGENO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Mestre em Ciências

**São Paulo
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Prof. Assistente Doutor da Disciplina de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - *Campus Araraquara* - UNESP

Co-orientador:

Prof. Dr. Eduardo Katchburian

Prof. Titular da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina - UNIFESP/EPM

Ana Paula de Souza Faloni

**MORTE CELULAR DE OSTEOCLASTOS DO OSSO ALVEOLAR
DE RATAS TRATADAS COM ESTRÓGENO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Katchburian

São Paulo
2006

Faloni, Ana Paula de Souza

Morte celular de osteoclastos do osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno/Ana Paula de Souza Faloni.-- São Paulo, 2006.

xiv, 82f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Morfologia.

Título em inglês: Programmed cell death of alveolar bone osteoclasts in estrogen treated rats.

1. Osso alveolar. 2. Osteoclastos. 3. Estrógeno. 4. Apoptose.

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Marília de Arruda Cardoso Smith
Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith

Dedicatória

Dedico este trabalho:

aos meus pais, **Hercílio** e **Edna**, os quais me apóiam, com amor incondicional, em todos os momentos de minha vida;

aos meus irmãos:

Luís Henrique e **Paulo Vítor** que muito me incentivam e sempre estimulam-me a pensar a respeito da vida;

ao meu namorado **Henderson** que sempre acredita em mim e participa de minha vida, encorajando-me em todas as circunstâncias.

Agradecimentos

Agradeço, de maneira especial,

meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, responsável por minha iniciação na vida científica, exemplo de dedicação e competência. Meu sincero agradecimento pela criteriosa orientação, pelo incentivo constante e por tantos ensinamentos;

meu co-orientador, **Prof. Dr. Eduardo Katchburian**, exemplo de seriedade e maturidade científica. Meu sincero agradecimento pela confiança, pelo apoio e por todos os conhecimentos transmitidos.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ricardo L. Smith, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Morfologia da UNIFESP/EPM, pela confiança dedicada,

A Profa. Estela Sasso-Cerri pelas valiosas sugestões e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, em especial pela criteriosa orientação na execução da análise morfométrica,

Aos docentes do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela atenção dispensada e por permitirem o desenvolvimento deste trabalho,

A Luís Antônio Potenza e Pedro Sérgio Simões, técnicos do laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pela colaboração nas atividades laboratoriais,

Ao Prof. João Aristeu da Rosa do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP por permitir a utilização do analisador de imagens,

Ao Prof. José Sílvio Govone do Departamento de Estatística, Matemática Aplicada e Computacional do Instituto de Geociências e Ciências Exatas de Rio Claro - UNESP pelo auxílio na análise estatística,

Aos docentes e funcionários da Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural da UNIFESP/EPM,

Às secretárias Sílvia Borragini Abuchaim, Maria de Fátima da Silveira Deamo, Kelen Raquel Martins e Ilça Bessa pela atenção dispensada,

À amiga Gisela Sasso pela atenção e pelos conselhos,

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Morfologia pela amizade e pelos momentos de descontração,

Aos meus avós João Batista de Souza, Maria Bueno de Souza e Francisca Maria Faloni, a todos os meus tios e primos que sempre acreditaram em mim e muito me incentivaram nesta etapa de minha vida,

Às amigas Ana Carolina e Ana Luiza Bermudes Massone por me receberem com carinho durante os períodos de permanência em São Paulo,

A todos os amigos que compartilharam deste momento de minha vida,

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro,

meu muito obrigada.

“O valor de praticar a ciência não está propriamente em seus resultados, pois, eles sempre serão uma gota ínfima, ante o mar de coisas dignas a saber. Praticar a ciência produz o aumento da energia, da capacidade dedutiva, da tenacidade, aprende-se a alcançar um fim de modo pertinente. Neste sentido e em vista de tudo o que se fará depois, é valioso ser homem de ciência.”

Friedrich Wilhelm Nietzsche

Prefácio

Esta tese está sendo apresentada na forma de artigo enviado para publicação em revista internacional indexada. O artigo com o título "**Apoptosis may be responsible for the decreased number of alveolar bone osteoclasts in estrogen treated rats**" foi enviado para a revista "Journal of Periodontal Research".

Assim, a revisão de literatura tem como objetivo abordar os aspectos gerais relacionados ao osso alveolar e às células ósseas, bem como a ação de fatores sistêmicos e locais sobre estas células e, conseqüentemente, sobre a homeostase do tecido ósseo. Atenção especial será dispensada à ação do estrógeno sobre os osteoclastos, a qual foi o principal objetivo deste estudo. Serão também abordados o mecanismo de morte celular programada (apoptose) e seu papel no tecido ósseo, tanto em condições fisiológicas, como mediante alteração nos níveis de fatores sistêmicos, locais e ambientais.

Os capítulos referentes a resultados e discussão foram traduzidos do artigo enviado para publicação. A íntegra do artigo em inglês encontra-se no capítulo de anexos.

Sumário

Dedicatória	vi
Agradecimentos	viii
Prefácio	xi
Resumo	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Osso Alveolar	2
2.1.1 Matriz Óssea	3
2.1.2 Células ósseas	4
2.1.2.1 Osteoblastos	4
2.1.2.2 Osteócitos	7
2.1.2.3 Osteoclastos.....	8
2.2 Fatores que influenciam a homeostase do tecido ósseo.....	17
2.2.1 Estrógeno	18
2.3 Apoptose	23
2.3.1 Apoptose no tecido ósseo	27
2.3.1.1 Apoptose em osteoclastos	28
3 OBJETIVOS	30
4 MÉTODOS	31
4.1 Animais.....	31
4.2 Microscopia de Luz	32
4.2.1 Método do TUNEL.....	32
4.2.2 Método do TRAP	33
4.3 Número de osteoclastos da superfície do osso alveolar	34
4.4 Análise Estatística	34
4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	34
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	45

7 CONCLUSÃO.....	49
8 REFERÊNCIAS.....	50
9 ANEXOS	65
9.1 Artigo enviado para publicação	65
9.2 Parecer do Comitê de Ética.....	87
Abstract	
Bibliografia consultada	

Resumo

Introdução: O osso é um tecido mineralizado que está sob a influência de diversos fatores sistêmicos, locais e ambientais. Dentre os fatores sistêmicos, o estrógeno é um hormônio bem conhecido por exercer uma função inibitória sobre a reabsorção óssea. Devido ao fato do osso alveolar de ratas jovens sofrer contínua e intensa remodelação para acomodar os dentes em formação e erupção, ele constitui um adequado modelo *in vivo* para estudar a possível ação do estrógeno sobre os osteoclastos. **Objetivo:** Na tentativa de investigar a possibilidade do estrógeno induzir a morte de osteoclastos, foi examinado o osso alveolar de ratas jovens tratadas com estrógeno. **Métodos:** Quinze ratas de 22 dias foram divididas em grupos: Estrógeno (GE), Sham (GS) e Controle (GC). Os animais do GE receberam, durante 7 dias, injeção intramuscular diária de 0,125mg/100g de estrógeno (Benzoginoestril-ap[®]) diluído em óleo de milho. Os animais do GS receberam o óleo utilizado como veículo de diluição. Após 8 dias, fragmentos contendo osso alveolar foram removidos e processados para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os cortes foram corados em hematoxilina/eosina (HE) e o método do TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) foi utilizado como marcador de osteoclastos. Foi realizada a análise quantitativa do número de osteoclastos TRAP-positivos/mm de superfície óssea. Para detecção de apoptose, cortes foram submetidos ao método do TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling); os métodos TUNEL/TRAP combinados foram também utilizados. **Resultados:** O número de osteoclastos TRAP-positivos/mm de superfície óssea foi significativamente reduzido no GE comparado ao GC e ao GS. No GE, foram observados osteoclastos TRAP-positivos exibindo núcleos TUNEL-positivos. Além disso, imagens ultraestruturais revelaram osteoclastos encolhidos exibindo núcleos com massas conspícuas e tortuosas de cromatina condensada, típicos de apoptose. **Conclusões:** Os resultados reforçam a idéia que o estrógeno inibe a reabsorção óssea promovendo a redução no número de osteoclastos, indicando, portanto, que esta redução pode ser, pelo menos em parte, uma consequência da apoptose de osteoclastos.

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido mineralizado que sofre contínua remodelação pela ação combinada de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (Steeve et al, 2004). Estas células estão sob a influência de diversos fatores sistêmicos, locais e ambientais (Raisz, Rodan, 1998), os quais regulam sua proliferação, diferenciação, função e sobrevivência (Manolagas, 2000). Dentre os fatores sistêmicos, o estrógeno é um hormônio bem conhecido por exercer uma função inibitória sobre a reabsorção óssea (Bernick, Ershoff, 1963; Tapp, 1966; Liu, Howard, 1991). Recentemente, tem sido mostrado que a depleção estrogênica promove a atividade reabsortiva no osso alveolar de ratas (Tanaka et al, 2002; Duarte et al, 2004). Na tíbia de ratas tratadas com estrógeno, uma diminuição do número de osteoclastos foi observada e, a desintegração (Liu, Howard, 1991) e a morte (Hughes et al, 1996) dos osteoclastos foram sugeridas. Porém, o mecanismo de ação do estrógeno nos tecidos esqueléticos permanece distante do entendimento (Rogers et al, 2002).

Alguns fatores sistêmicos e locais são capazes de desencadear a cascata de eventos moleculares que ocasiona a morte celular programada (apoptose) de células ósseas (Hill et al, 1997; Tomkinson et al, 1997; 1998; Xing, Boyce, 2005). Assim, a apoptose pode contribuir para a regulação da homeostase óssea (Hughes, Boyce, 1997).

A apoptose é um evento extremamente rápido, portanto, as chances de observarem-se imagens de células sofrendo apoptose são pequenas; a apoptose de osteoclastos ainda não foi observada *in vivo*, *i.e.* em condições fisiológicas (Jilka et al, 1998; Boabaid et al, 2001). Devido ao fato do osso alveolar de ratas jovens sofrer contínua e intensa remodelação para acomodar os dentes em formação e erupção (Marks, Schroeder, 1996), ele constitui um adequado modelo *in vivo* para estudar a possível ação do estrógeno sobre estas células.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osso Alveolar

O osso alveolar é a porção da maxila e da mandíbula que constitui as paredes do alvéolo dentário. Este osso, exibindo espessura entre 0,1 e 0,4 mm (Schroeder, 1991), origina-se a partir do folículo dentário, um tecido ectomesenquimal que está presente ao redor do germe dentário. Sob estímulos específicos, células ectomesenquimais da porção externa do folículo dentário diferenciam-se em osteoblastos, os quais iniciam a formação do osso alveolar (Ten Cate, Mills, 1971). Este tecido ósseo é depositado sobre o processo alveolar, osso esponjoso pré-existente que constitui as paredes laterais da cripta que abriga o germe dentário. A formação do osso alveolar tem início simultaneamente à formação do cemento e do ligamento periodontal (Ten Cate et al, 1970). Em associação com estes tecidos, o osso alveolar irá constituir o periodonto de sustentação, sistema de ancoragem do dente no alvéolo. Este sistema origina-se após o início da dentinogênese radicular (Katchburian, Arana, 2004). Assim, o osso alveolar está sujeito a contínuas e rápidas formação e remodelação associadas ao crescimento radicular e à erupção dental e, posteriormente, às demandas funcionais da mastigação (Sodek, McKee, 2000; Garant, 2003).

Em geral, a estrutura básica do osso alveolar é semelhante a do tecido ósseo de outras regiões do organismo (Helder et al, 1993). Em sua porção mais profunda, que se apresenta em continuidade com o processo alveolar, existem alguns sistemas de Havers. Porém, em sua maior parte, a qual está voltada para o ligamento periodontal, o osso alveolar é constituído por lamelas paralelas resultantes da periódica deposição de tecido ósseo. A característica principal do osso alveolar reside nos inúmeros feixes de fibras colágenas nele inseridos. Estes feixes extrínsecos, denominados fibras de Sharpey, estão orientados perpendicularmente a fibras intrínsecas. Além destas fibras, o osso alveolar também contém numerosas aberturas que permitem a comunicação entre a medula óssea do osso esponjoso e o ligamento periodontal (Katchburian, Arana, 2004). Por estas aberturas, numerosos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e fibras nervosas cruzam essa região (Birn, 1966).

O tecido ósseo, um tecido conjuntivo especializado, é constituído por diferentes tipos celulares e por um complexo de matriz extracelular mineralizada (Sodek, McKee, 2000). A figura 1 representa um esquema ilustrando as células ósseas, as interações entre as mesmas, bem como algumas das interações que acontecem entre estas células e a matriz óssea.

2.1.1 Matriz Óssea

A porção orgânica da matriz extracelular óssea corresponde a 33% do peso do osso e é composta por grande quantidade de colágeno do tipo I, além de moléculas não-colágenas (Ten Cate, 2001). O colágeno do tipo I exibe grande número de ligações intermoleculares características (“cross-links”) entre as lisinas altamente hidroxiladas (Bornstein, Sage, 1980) e, apesar de constituir a principal proteína colágena do tecido ósseo, os colágenos dos tipos III, V, X e XI também estão presentes (Marks, Popoff, 1988; Raisz, Rodan, 1998). Em relação às moléculas não-colágenas, na matriz óssea podem ser encontradas: osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea (BSP), decorina, biglicana, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fosfoproteínas, proteínas séricas e alguns lipídios (Katchburian, Cerri, 2002). Além de desempenharem um papel estrutural, os componentes da matriz orgânica exercem diferentes e importantes funções. Alguns destes componentes atuam tanto na proliferação, diferenciação e adesão celular, como também nos processos de mineralização e remodelação óssea (Garant, 2003). Assim, a osteocalcina, uma Gla-proteína (proteína gama carboxilato), é expressa pelos osteoblastos maduros (Katchburian, Cerri, 2002) e também parece estar envolvida no recrutamento e atividade de osteoclastos e seus precursores (Lian et al, 1984). Além disto, esta Gla-proteína está presente na matriz extracelular, onde se liga à hidroxiapatita (Katchburian, Cerri, 2002). A osteonectina, uma glicoproteína acídica, é a proteína não-colágena mais abundante do tecido ósseo. Apresenta grande afinidade pelo colágeno e pela hidroxiapatita, permitindo assim, a ligação entre a porção mineral e a porção orgânica da matriz óssea (Termine et al, 1981). A osteopontina, além de ligar-se fortemente à hidroxiapatita, também apresenta sítios de ligação para integrinas presentes nas superfícies dos osteoblastos e osteoclastos, promovendo assim, a adesão destas células à superfície

óssea (Oldberg et al, 1986). Ainda dentre as moléculas não-colágenas, a BSP é uma proteína à qual tem sido atribuída a capacidade de estimular a proliferação, migração e atividade das células ósseas (Raynal et al, 1996; Garant, 2003). Esta proteína possui sítios de ligação para integrinas de osteoblastos e osteócitos (Raisz, Rodan, 1998) e *in vitro* estimula a reabsorção óssea (Raynal et al, 1996). Em relação à família das BMPs, uma importante função na formação óssea tem sido estabelecida (Wozney, 1992). Dentre estas proteínas, a BMP-2 está associada à expressão de Cbfa-1 (“core-binding factor $\alpha 1$ ”) e osterix nas células osteoprogenitoras. A ativação da expressão destes genes promove a diferenciação de osteoblastos, estimulando, conseqüentemente, a neoformação óssea (Ducy et al, 1997; Zhang et al, 2002).

Sobre a matriz orgânica do tecido ósseo é depositado o componente inorgânico. A porção inorgânica constitui 67% do peso do osso e está representada, principalmente, pelos íons cálcio e fosfato que se encontram sob a forma de cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (Katchburian, Cerri, 2002). A apatita biológica tem a forma de um prisma tronco-rômbico; múltiplas unidades amontoadas destes prismas formam o arranjo do cristal de hidroxiapatita (Ten Cate, 2001). Associados a estes cristais, porém, em menor quantidade, os íons bicarbonato, potássio, sódio, citrato, cloreto, flúor, magnésio, entre outros também fazem parte da porção inorgânica (Katchburian, Cerri, 2002). Deste modo, a matriz extracelular óssea calcificada exerce a função de proteção e também representa um reservatório iônico, ajudando a manter a homeostase de diversos íons no sangue (Garant, 2003).

2.1.2 Células ósseas

2.1.2.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são as células responsáveis pela produção da matriz orgânica do tecido ósseo, tanto do colágeno, quanto das proteínas não-colágenas (Marks, Popoff, 1988). Encontram-se dispostos em camada contínua, na superfície da matriz óssea não mineralizada, também denominada osteóide (Raina, 1972), como pode ser observado na fig. 1. Quando ativos, os osteoblastos apresentam-se como células polarizadas, com forma cuboidal e dimensões variadas, exibindo

núcleo esférico e citoplasma basófilo. Ultraestruturalmente apresentam características de células produtoras de proteínas: abundante retículo endoplasmático rugoso, proeminente complexo de Golgi e vesículas de secreção (Marks, Popoff, 1988). Além dos componentes da matriz óssea, estas células também produzem diversas citocinas (Damoulis, Hauschka, 1997).

Os osteoblastos do osso alveolar originam-se a partir de células ectomesenquimais do folículo dentário, sob a ação de fatores específicos (Ten Cate, Mills, 1971). Fatores de transcrição como Cbfa-1 (também denominado Osf-2, fator-2 específico de osteoblasto) (Ducy et al, 1997) e osterix (Karsenty, 1999; Yamaguchi et al, 2000; Komori, 2003) parecem influenciar tanto a diferenciação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras, quanto a diferenciação de células osteoprogenitoras em pré-osteoblastos (Ducy et al, 1997; Karsenty, 1999; Yamaguchi et al, 2000; Komori, 2003). Os pré-osteoblastos, precursores imediatos dos osteoblastos, sob a ação de fatores como: fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento de transformação- β (TGF- β), BMPs e leptina se transformam em osteoblastos (Phan et al, 2004). Alguns fatores sistêmicos e locais como: hormônio da paratireóide (PTH), estrógeno, 1,25-dihidroxi-vitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃], BMPs, fator de crescimento de transformação (TGF), e interleucinas (ILs), além de influenciar o recrutamento das células osteoprogenitoras, também influenciam a atividade e a sobrevivência dos osteoblastos (Raisz, Rodan, 1998). Dentre os marcadores de osteoblastos maduros e pré-osteoblastos pode ser citada a fosfatase alcalina (Yamaguchi et al, 2000).

Quando os osteoblastos apresentam-se inativos e aparentemente sem função de síntese são chamados de células de revestimento ósseo (“bone lining cells”). Assim, estas células apresentam forma alongada, núcleo proeminente ocupando grande parte do citoplasma e organelas escassas que estão representadas por algumas mitocôndrias, ribossomos livres e retículo endoplasmático rugoso, além de microfilamentos (Miller, Jee, 1987). As células de revestimento ósseo possivelmente monitoram a manutenção óssea controlando o fluxo iônico no tecido ósseo; acredita-se que este controle seja realizado por meio da secreção de fosfoproteínas e glicoproteínas (Ten Cate, 2001). Sob estímulos específicos, como por exemplo, do

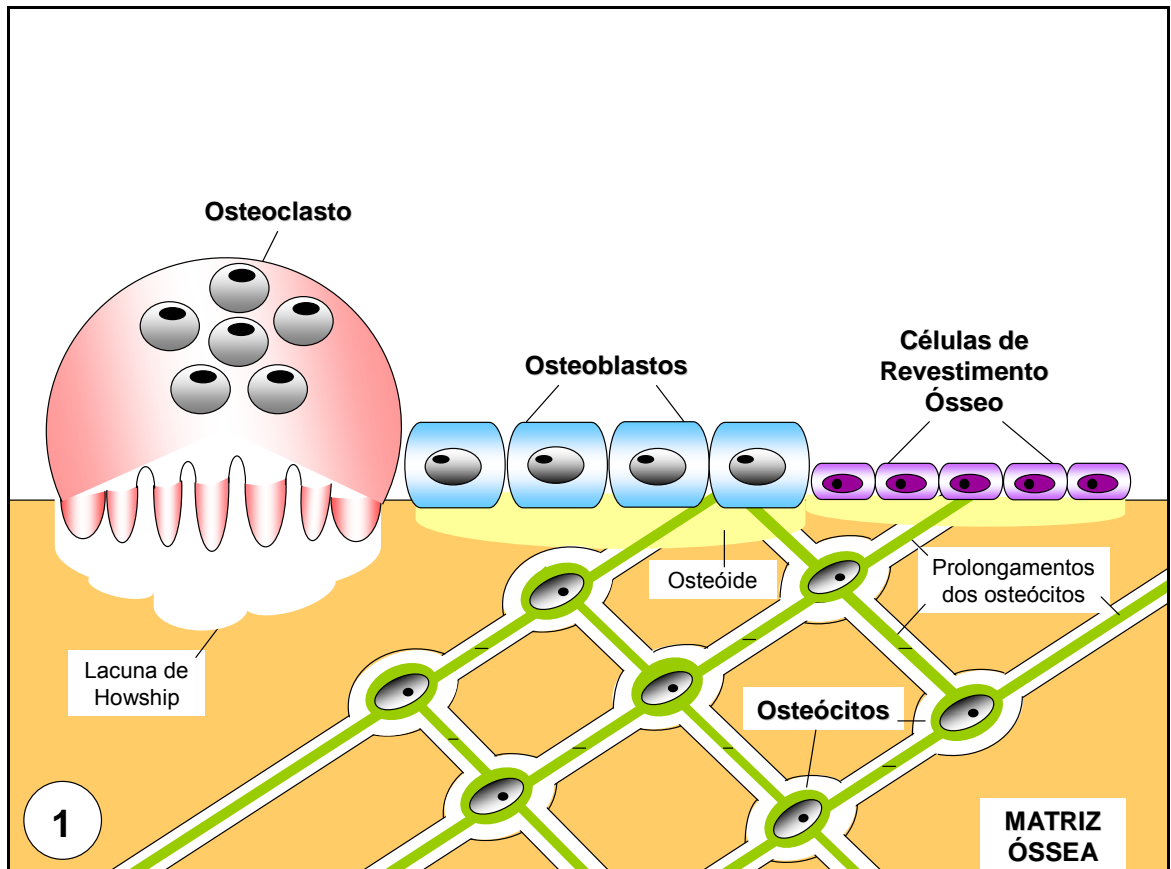


Figura 1 – Esquema ilustrando as células ósseas. Os osteoblastos e a sua forma inativa, as células de revestimento ósseo, encontram-se dispostos em camada contínua, na superfície óssea não mineralizada (osteoide). No interior da matriz óssea, estão presentes os osteócitos. Os prolongamentos destas células apresentam-se em íntima relação com osteócitos vizinhos, osteoblastos e células de revestimento ósseo, constituindo uma rede de células ósseas interconectadas e garantindo a interação entre a matriz óssea e o meio extra-ósseo. Justaposto à uma depressão da superfície óssea (Lacuna de Howship), observa-se um osteoclasto multinucleado em atividade reabsortiva.

estrógeno (Bowman, Miller, 1986) ou do PTH (Leaffer et al, 1995), estas células se diferenciam em osteoblastos capazes de produzir matriz óssea (Bowman, Miller, 1986; Leaffer et al, 1995). Dentro da linhagem de células osteoblásticas, além da célula de revestimento ósseo, também está presente o osteócito (Nefussi et al, 1991).

2.1.2.2 Osteócitos

À medida que a matriz óssea é formada, alguns osteoblastos são aprisionados no interior da mesma, sendo então denominados osteócitos. Assim, os osteócitos residem em lacunas, rodeados por matriz mineralizada (Nefussi et al, 1991) e constituem o tipo celular mais abundante do tecido ósseo (Manolagas, 2000). Durante a formação óssea, os osteoblastos recém incorporados à matriz não-mineralizada ou osteóide apresentam características morfológicas semelhantes as de osteoblastos em atividade, sendo denominados osteócitos jovens (Nefussi et al, 1991). À medida que a matriz óssea sofre mineralização, estes osteócitos tornam-se elipsóides, com citoplasma reduzido e quase inteiramente ocupado pelo núcleo. Além destas modificações, a presença de prolongamentos citoplasmáticos confere uma morfologia estrelada aos osteócitos. Estes prolongamentos localizam-se no interior de canalículos da matriz óssea e estabelecem junções comunicantes com as células vizinhas constituindo, desta forma, uma rede de células ósseas interconectadas (osteócitos-osteócitos e osteócitos-osteoblastos/células de revestimento ósseo), conforme ilustrado na fig. 1. Além disto, a presença de fluído canalicular garante a difusão de nutrientes para o interior do osso e o intercâmbio de diversas moléculas neste tecido (Aarden et al, 1994).

Apesar de pouco se conhecer a respeito da função dos osteócitos, a presença de receptores para estrógeno (Kousteni et al, 2001) e para PTH (Bringhurst, 2002) nestas células reforça a idéia de que estes hormônios exercem importantes papéis na sua função e sobrevivência (Dempster et al, 1993; Tomkinson et al 1997; 1998). Tem sido sugerido que os osteócitos exercem funções mecanosensoriais, sendo capazes de sinalizar modificações decorrentes da presença de forças mecânicas, por meio da transmissão de sinais para superfície óssea. Estes sinais determinam a

ocorrência de uma remodelação óssea ordenada (Aarden et al, 1994; Jilka et al, 1998). De fato, os prolongamentos dos osteócitos permitem uma intercomunicação entre regiões mais profundas e superficiais da matriz óssea, e a rede de canalículos garante a interação entre o fluido ósseo e o meio extra-ósseo (Fig. 1).

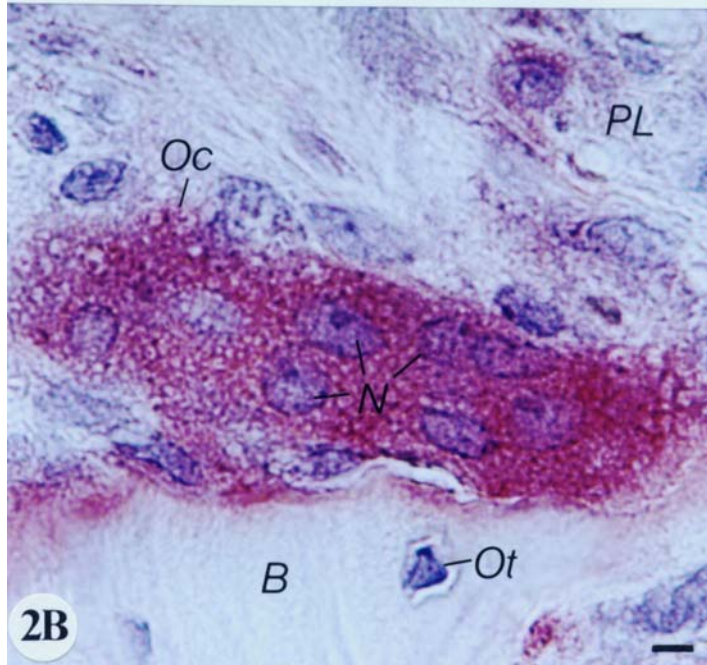
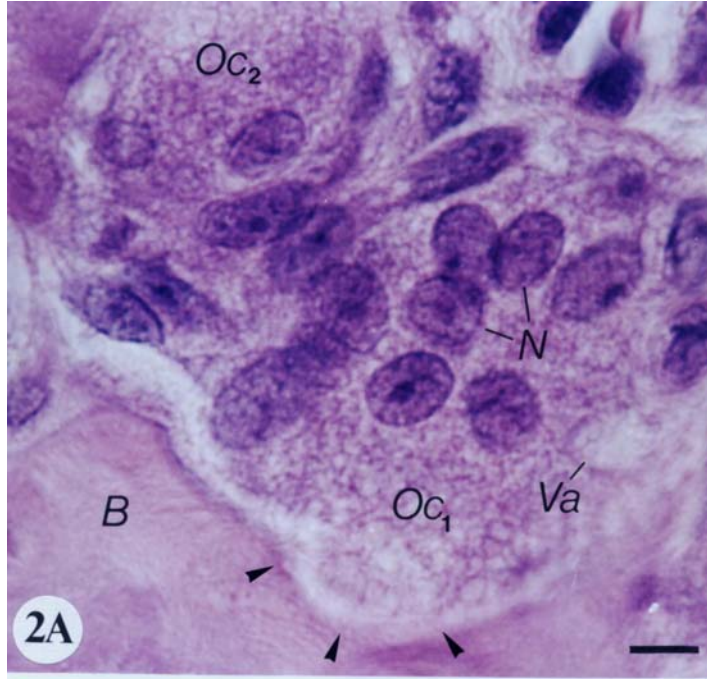
Embora as características ultraestruturais destas células aparentemente reflitam uma pobre atividade metabólica, a presença dos osteócitos é indispensável para a manutenção da homeostase óssea (Katchburian, Cerri, 2002), parecendo existir uma ligação entre a apoptose destas células e o recrutamento de osteoclastos para a remodelação óssea (Noble et al, 1997; Boabaid et al, 2001, Gu et al, 2005). Assim, o processo de remodelação óssea envolve a atividade coordenada de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Steeve et al, 2004).

2.1.2.3 Osteoclastos

Foi Kölliker (1873) quem propôs que as células gigantes presentes na superfície óssea seriam “agentes de reabsorção óssea”, denominando-as osteoclastos.

Os osteoclastos são as células que degradam a matriz óssea mineralizada. Estas células gigantes polarizadas apresentam tamanho variando entre 50 a 100 μm (Manolagas, 2000) e são multinucleadas, exibindo em média 5 à 8 núcleos das mais variadas formas e tamanhos (Väänänen, 2005). Estão localizados em cavidades de reabsorção da superfície óssea, denominadas lacunas de Howship (Figs. 1 e 2A). Quando estão ativos, seu citoplasma aparece acidófilo; a região mais íntima à superfície da matriz óssea apresenta uma porção densamente corada na periferia da célula e outra área fracamente corada, com numerosos vacúolos e com aparência estriada, a qual é denominada borda em escova (Göthlin, Ericsson, 1976).

Os osteoclastos distinguem-se dos macrófagos pela presença da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) no seu citoplasma (Minkin, 1982). Esta isoenzima tipo V da fosfatase ácida (Li et al, 1970) apresenta intensa atividade nos osteoclastos (Fig. 2B), sendo considerada um marcador específico desta célula (Minkin, 1982; Phan et al, 2004).



Figuras 2A e 2B – Fotomicrografias mostrando osteoclastos do osso alveolar.

Fig. 2A - Observa-se dois osteoclastos (OC_1 e OC_2) justapostos localizados em uma depressão da superfície óssea (cabeças de seta). O OC_1 , com núcleos (N) e nucléolos evidentes, exibe vacúolos (Va) no citoplasma adjacente à matriz óssea (B). HE. Barra: 6 μ m.

Fig. 2B - Adjacente à superfície do osso alveolar (B), observa-se um osteoclasto (Oc) com diversos núcleos (N) exibindo marcação positiva para a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), corado em vermelho. Ot, osteócito; PL, ligamento periodontal. Método do TRAP contrastado com Hematoxilina. Barra: 5 μ m.

Os osteoclastos apresentam organelas típicas de uma célula produtora de proteínas. Cisternas do complexo de Golgi são encontradas na região perinuclear envolvendo cada um dos núcleos do osteoclasto. Inúmeros lisossomos e um sistema de vesículas e vacúolos envolvidos no processo de degradação lisossomal estão presentes, principalmente, na porção do citoplasma próxima à borda em escova. Além destas organelas, ribossomos livres e numerosas mitocôndrias, dispersos no citoplasma do osteoclasto, indicam o alto índice metabólico desta célula (Göthlin, Ericsson, 1976).

Além da polarização celular que ocorre durante a reabsorção óssea, morfologicamente distinguem-se algumas porções de membrana do osteoclasto (Salo et al, 1996). Em íntimo contato com a superfície óssea observa-se uma estrutura em forma de anel que separa os outros dois domínios de membrana do osteoclasto (Nesbit, Horton, 1997) e caracteriza-se pela presença de filamentos de actina e miosina, além de talina e vinculina (Lakkakorpi et al, 1989; Aubin, 1992). Denominada zona clara, esta estrutura parece ser a responsável pela adesão do osteoclasto à superfície óssea, promovendo o selamento do local onde está acontecendo a reabsorção óssea. Delineada pela zona clara em uma área de aproximadamente $500\mu\text{m}^2$ e em íntimo contato com a superfície óssea, está presente a borda em escova (Raisz, Rodan, 1998). A borda em escova consiste em numerosas e profundas reentrâncias e prolongamentos da membrana plasmática (Göthlin, Ericsson, 1976). Na membrana plasmática da borda em escova está presente uma bomba de prótons, a qual parece favorecer o transporte de íons hidrogênio (H^+) para a lacuna de Howship (Okahashi et al, 1997). Os íons H^+ e bicarbonato (HCO_3^-) são oriundos da conversão de gás carbônico (CO_2) e água (H_2O) pela enzima anidrase carbônica. Na lacuna de reabsorção óssea, os íons H^+ contribuem para a obtenção de um pH em torno de 5 (Blair et al, 1989). Deste modo, a degradação óssea ocorre num compartimento acidificado da matriz extracelular, sendo constituída por dois grandes eventos: a dissolução do componente mineral do tecido ósseo e a hidrólise das proteínas da matriz (Raisz, Rodan, 1998). A fig. 3 ilustra algumas características ultraestruturais do osteoclasto e alguns mecanismos relacionados à degradação óssea.

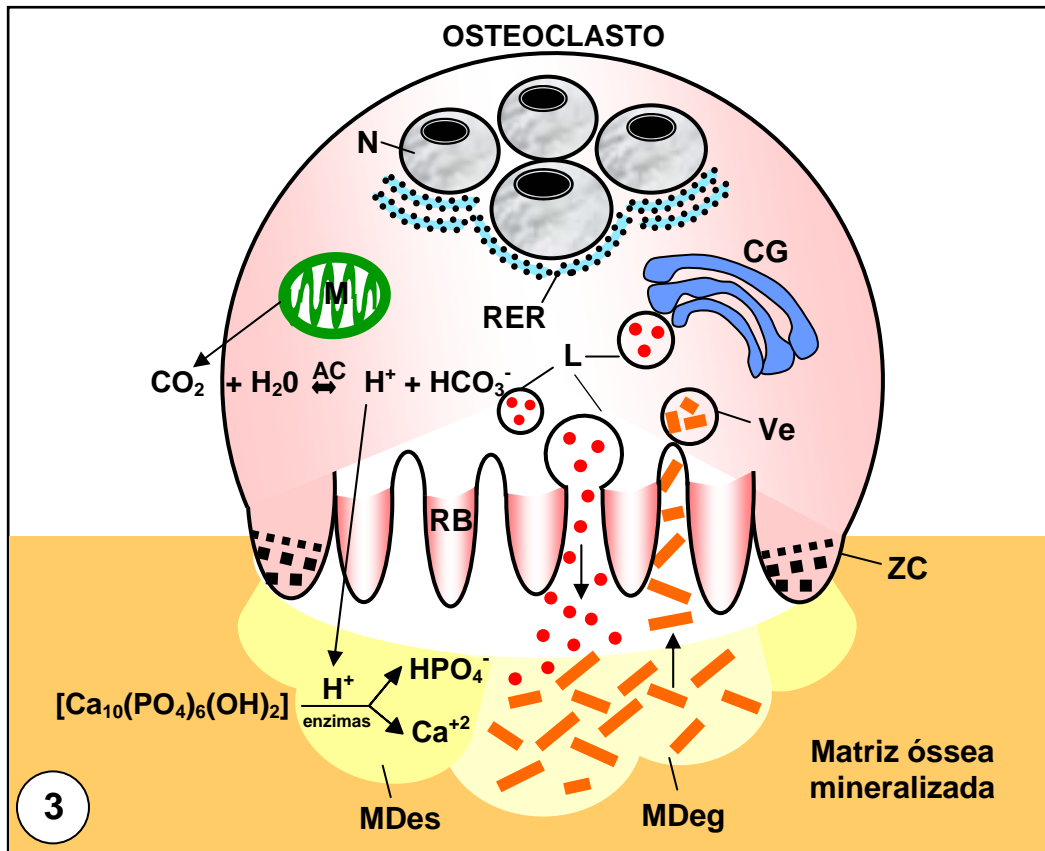


Figura 3 – Esquema ilustrando as características ultraestruturais do osteoclasto e alguns mecanismos envolvidos na reabsorção do tecido ósseo.

Figura 3 – Um osteoclasto, aderido à matriz óssea pela zona clara (ZC), apresenta-se em atividade reabsortiva. A superfície óssea imediatamente subjacente à borda em escova (RB) é o local onde está ocorrendo a reabsorção óssea. No interior do osteoclasto, a anidrase carbônica (AC) promove a conversão de gás carbônico (CO_2) e água (H_2O) em íons hidrogênio (H^+) e bicarbonato (HCO_3^-). A bomba de prótons, localizada na membrana da RB, promove a liberação dos íons H^+ para o microambiente onde está ocorrendo a reabsorção óssea. A acidificação, promovida pelos íons H^+ , contribui para a desmineralização da matriz óssea e também favorece a atividade de enzimas associadas a este evento. Na desmineralização ocorre a quebra dos cristais de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], havendo conseqüente liberação de cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (HPO_4^-). Segue-se então a liberação de enzimas lisossomais pelo osteoclasto. Estas enzimas participam da degradação da matriz óssea, promovendo a degradação de proteínas colágenas e não-colágenas do osso. Os produtos da degradação da matriz orgânica são internalizados na RB, por meio de vesículas (Ve) são transportados para o interior do osteoclasto e, posteriormente, para o meio extracelular. N, núcleos; M, mitocôndria; L, lisossomos; RER, retículo endoplasmático rugoso; CG, complexo de Golgi; MDes, matriz óssea desmineralizada; MDeg, matriz óssea parcialmente degradada.

A dissolução do componente mineral do osso é um pré-requisito para a degradação da matriz (Sodek, McKee, 2000) e está relacionada não apenas à acidificação promovida pela liberação dos íons H^+ no interior da lacuna de Howship, mas, também à presença de enzimas associadas à borda em escova, como por exemplo, a fosfatase ácida resistente ao tartarato de sódio (Andersson, Ek-Rylander, 1995).

A hidrólise das proteínas da matriz é promovida pelas proteinases cisteínas, catepsinas, metaloproteinases e colagenases. Dentre as catepsinas, a Catepsina K está ligada à clivagem do colágeno tipo I (Phan et al, 2004). Dentre as metaloproteinases, a Gelatinase B (MMP-9), presente nos osteoclastos, degrada fragmentos de colágeno, previamente desnaturados por outras metaloproteinases. Os produtos de degradação são internalizados na borda em escova e por meio de vesículas, as moléculas residuais (degradadas e não reutilizadas) são transportadas para o espaço extracelular pela superfície basolateral do osteoclasto (Katchburian, Cerri, 2002).

Para reabsorver o tecido ósseo, o osteoclasto deve estar aderido à superfície óssea (Chambers et al, 1986). Um receptor para adesão, exclusivo de pré-osteoclastos e osteoclastos maduros foi caracterizado bioquimicamente por Davies et al (1989). Denominado receptor vitronectina-integrina $\alpha_v\beta_3$, este receptor é constituído por duas cadeias: uma cadeia α , compatível com a cadeia α do receptor vitronectina, e uma cadeia β , compatível com a integrina β_3 . De acordo com Sakai et al (2000), a adesão do osteoclasto à superfície óssea por meio de receptores, desencadeia mecanismos intracelulares indispensáveis à sobrevivência destas células. Porém, de acordo com Kanehisa, Heersche (1988), os osteoclastos podem migrar de um local para outro no tecido ósseo, sendo então denominados osteoclastos inativos ou em estado de repouso (Fukushima et al, 1991).

A origem dos osteoclastos foi amplamente discutida com o passar dos anos. Inicialmente, acreditava-se que osteoblastos e osteoclastos fossem originados a partir de um mesmo precursor (Bloom et al, 1941; Heller et al, 1950; Kember, 1960; Young, 1963). Foi Scott (1967), que em estudo com radioisótopos e microscopia eletrônica de transmissão, propôs que osteoclastos e

osteoblastos/osteócitos são células originadas a partir de diferentes progenitores. Em 1975, Walker ao observar que o transplante de células hematopoiéticas para camundongos osteopetróticos restabelecia a atividade reabsortiva no tecido ósseo, concluiu que as células responsáveis pelo processo de reabsorção óssea originam-se de um precursor de linhagem hematopoiética.

Atualmente, acredita-se que os osteoclastos sejam formados a partir de um precursor celular hematopoiético, o qual sobre a influência do gene PU.1 (Boyce et al, 1999) e do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (Yoshida et al, 1990), gera o progenitor do osteoclasto. A formação do osteoclasto a partir deste progenitor mielóide requer o gene funcional c-Fos (Boyce et al, 1999) e envolve também um sistema receptor/ligante, constituído pelo receptor ativador de fator nuclear $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$ - também chamado RANK) da superfamília de receptores TNF (fator de necrose tumoral) e seu respectivo ligante (RANKL). O RANKL, também conhecido como osteoprotegerina-ligante (OPGL), é produzido pelas células mesenquimais osteoprogenitoras e liga-se aos RANKs presentes nos precursores de osteoclastos promovendo sua diferenciação em pré-osteoclastos (Sodek, McKee, 2000). A forma RANK que não se encontra ligada à superfície celular dos precursores de osteoclastos recebe o nome de osteoprotegerina (OPG) (Simonet et al, 1997) e pode ligar-se ao RANKL bloqueando assim, a diferenciação celular. Os pré-osteoclastos, quando em contato com a superfície óssea, transformam-se em osteoclastos ativos (Sodek, McKee, 2000).

Além da via RANK/RANKL, Yang et al (2004) demonstraram que um outro receptor da família TNF, o “Decoy Receptor 3” (DcR3), induz a síntese de TNF- α (fator- α de necrose tumoral) em monócitos/macrófagos, havendo, conseqüentemente, um aumento da formação de osteoclastos.

Acreditava-se que com exceção do hormônio calcitonina, que atua diretamente em receptores presentes na membrana basolateral dos osteoclastos (Chambers, 1985), os demais fatores atuassem sobre os osteoblastos, interferindo indiretamente na atividade reabsortiva dos osteoclastos, por meio de uma interação parácrina (Pacifci, 1996; Greenfield et al, 1999). Porém, foi demonstrada a existência de receptores de estrógeno em osteoclastos (Hainey et al, 2000; Bonnelye et al, 2002).

Roodman (1999) classificou os diversos fatores que atuam sobre os osteoclastos em fatores estimuladores e fatores inibidores de osteoclastos. Dentre os fatores relacionados ao aumento da atividade reabsortiva estão: citocinas como IL-1, IL-6 e IL-11, M-CSF, fator de transformação de crescimento- α (TGF- α), fatores- α e β de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β). Dentre os fatores inibidores: esteróides sexuais, interferon γ (INF- γ), IL-4 e IL-18, fator de transformação de crescimento- β (TGF- β), OPG (Roodman 1999), além de bifosfanatos (Ito et al, 1999; 2001).

Considerando-se que os osteoclastos são células que exibem diferenciação terminal, alguns autores sugerem que quando cessa sua atividade, estas células morrem por apoptose (Väänänen et al, 2000). No entanto, osteoclastos afastados da superfície do osso alveolar, exibindo forma alongada e numerosas projeções, foram observados *in vivo*, frente à uma pressão ortodôntica contínua (Bonafe-Oliveira et al, 2003), sugerindo que os osteoclastos inativos não obrigatoriamente sofrem apoptose. De acordo com Fukushima et al (1991), após a reabsorção óssea, os osteoclastos tornam-se inativos e desprendem-se da superfície óssea, entrando num estágio de repouso. Neste estágio, a ultraestrutura do osteoclasto é similar a dos osteoclastos ativos, diferenciando-se apenas em relação às ausências de borda em escova e zona clara. A presença de marcadores específicos da borda em escova pode ser observada no interior de pequenas vesículas do citoplasma. Desta forma, acredita-se que os osteoclastos possam permanecer inativos e que durante este período de repouso, a membrana da borda em escova é armazenada no interior de vesículas citoplasmáticas. Frente a estímulos de agentes mediadores da reabsorção óssea, estes osteoclastos migram para a superfície óssea, a borda em escova e a zona clara formam-se novamente e, assim, reinicia-se a reabsorção óssea.

2.2 Fatores que influenciam a homeostase do tecido ósseo

O osso é um tecido dinâmico que apresenta intensa e contínua remodelação. No caso do osso alveolar, a habilidade de rápida remodelação (Vignery, Baron, 1980) facilita a acomodação dos germes dentários durante sua formação e erupção. Além disto, os movimentos dentários pós-eruptivos (Marks, Schroeder, 1996) e os movimentos ortodônticos são possíveis devido à esta alta plasticidade do osso alveolar (Vavidovitch, 1979).

O controle não só da atividade, mas também da proliferação e diferenciação das células ósseas está sob a ação de diversos fatores sistêmicos, locais e ambientais, cuja ação combinada e freqüentemente simultânea é indispensável para a manutenção da homeostase do tecido ósseo (Raisz, Rodan, 1998).

A regulação da formação e função das células ósseas está sob a influência de fatores autócrinos e parácrinos secretados pelas células e fatores da matriz óssea liberados durante a reabsorção do osso. Fatores de crescimento, citocinas, e prostaglandinas representam classes de fatores locais que atuam sobre as células ósseas (Manolagas, 2000).

Dentre os fatores sistêmicos associados à homeostase do tecido ósseo: PTH (Leaffer et al, 1995), calcitonina (Chambers, Magnus, 1982; Chambers, 1985), 1,25-dihidroxi-vitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃] (Miao, Scutt, 2002), glicocorticóides (Silvestrini et al, 1998; Hofbauer et al, 1999) e estrógeno (Liu, Howard, 1991) são os fatores mais importantes para a regulação do metabolismo ósseo. Alguns autores acreditam que com exceção da calcitonina (Chambers et al, 1986), os demais fatores sistêmicos atuem sobre osteoblastos, que possivelmente interferem na formação, atividade e sobrevivência de osteoclastos, por meio da liberação de fatores locais (Pacifici, 1996).

Dentre os fatores sistêmicos, o estrógeno parece representar um fator de grande importância para o tecido ósseo, visto que a queda nas taxas deste hormônio está relacionada à ocorrência de osteoporose (Riggs, 2000).

2.2.1 Estrógeno

O estrógeno é um hormônio esteróide que promove a inibição da reabsorção óssea (Bernick, Ershoff, 1963; Tapp, 1966; Weinstein, Manolagas, 2000). Porém, os mecanismos celulares e moleculares de ação do estrógeno sobre o tecido ósseo não estão completamente esclarecidos (Rogers et al, 2002).

De acordo com Manolagas (2000), mediante a deficiência estrogênica, a perda de massa óssea é decorrente de um aumento da remodelação óssea que acontece de maneira desarmônica, havendo uma maior reabsorção em relação à neoformação óssea. Em estudos *in vivo* da influência do estrógeno sobre o osso alveolar, observou-se perda de massa óssea no septo alveolar inter-radicular de molares de ratas ovariectomizadas (Tanaka et al, 2002; Duarte et al, 2004).

Liu, Howard (1991) sugeriram que a administração de 17β -benzoato de estradiol inibe a formação e a atividade dos osteoclastos e, possivelmente, estimula a sua desintegração. Se estas possibilidades são verdadeiras, seria possível explicar, pelo menos em parte, a significativa redução do número de osteoclastos após a administração de estrógeno em ratas ovariectomizadas (Liu, Howard, 1991; Hughes et al, 1996). Além desta redução, mediante a administração de estrógeno, Hughes et al (1996) também observaram osteoclastos exibindo cromatina condensada, característica morfológica sugestiva de morte celular.

O estrógeno parece inibir a reabsorção óssea por meio de alterações nos níveis de diversos fatores estrógeno-dependentes (Riggs, 2000). A fig. 4 ilustra algumas das possíveis vias de ação do estrógeno sobre a reabsorção óssea.

Evidências sugerem que o estrógeno atua sobre os monócitos promovendo redução dos níveis de IL-1 (Pacifci et al, 1989) e TNF- α (Pacifci et al, 1990). IL-1 e TNF- α estimulam a produção de outras citocinas, como IL-6 e M-CSF, que regulam a fusão e a diferenciação de células precursoras de osteoclastos. Assim, mediante a presença de estrógeno, ocorre diminuição da formação de osteoclastos (Pacifci, 1996).

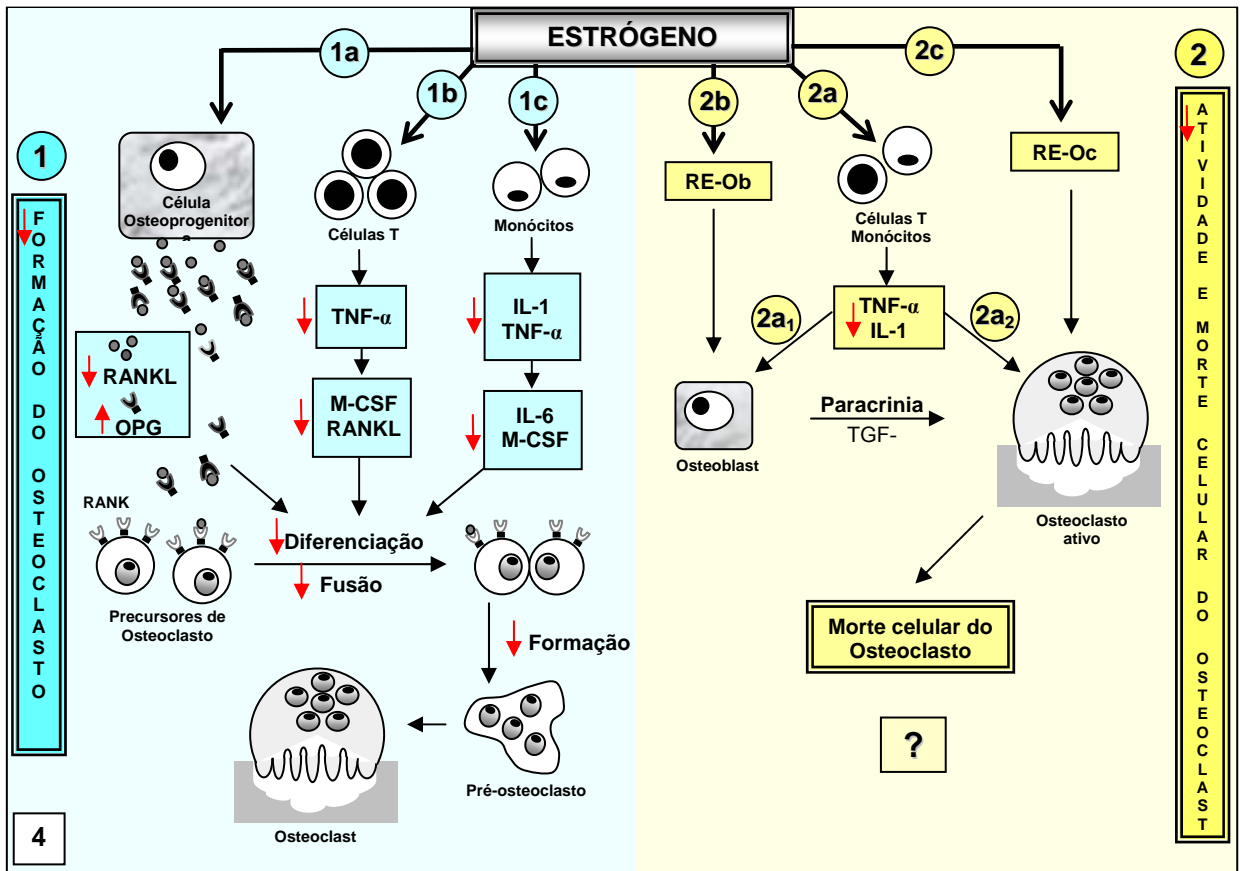


Figura 4 – Possíveis vias de ação do estrógeno sobre a reabsorção óssea.

1) Ação do estrógeno sobre a formação do osteoclasto:

1a – O estrógeno atua sobre as células osteoprogenitoras levando à diminuição dos níveis de RANKL e aumento dos níveis de OPG. A OPG liga-se ao RANKL que apresenta taxas reduzidas e impede sua ligação com o RANK (receptor presente em precursores de osteoclastos), inibindo, desta forma, a diferenciação e fusão dos precursores de osteoclastos e, conseqüentemente, a formação de pré-osteoclastos e osteoclastos;

1b – O estrógeno atua sobre as células T promovendo diminuição dos níveis de TNF- α , o que ocasiona conseqüente redução dos níveis de M-CSF e RANKL. Assim, a diferenciação e fusão dos precursores de osteoclastos, e a formação de pré-osteoclastos e osteoclastos também é diminuída;

1c – O estrógeno atua sobre os monócitos promovendo redução dos níveis de IL-1 e TNF- α . Como ambas as citocinas induzem a produção de IL-6 e M-CSF, a diferenciação e fusão dos precursores de osteoclastos e, conseqüentemente, a formação de pré-osteoclastos e osteoclastos é reduzida;

2) Ação do estrógeno sobre a atividade e morte celular do osteoclasto:

2a – O estrógeno atua sobre células T e monócitos promovendo redução dos níveis de TNF- α e IL-1 e inibindo a atividade dos osteoclastos:

2a₁ – indiretamente – via efeito primário em osteoblastos;

2a₂ – diretamente – via efeito primário em osteoclastos;

2b – O estrógeno liga-se a receptores de estrógeno presentes em osteoblastos (RE-Ob) ocorrendo a liberação de TGF- β que atua sobre o osteoclasto, inibindo sua atividade e, estimulando sua morte celular. Estes eventos caracterizam a ação parácrina do osteoblasto sobre o osteoclasto, mediante a presença de estrógeno;

2c – O estrógeno atua diretamente sobre o osteoclasto ligando-se a receptores de estrógeno presentes nesta célula (RE-Oc), inibindo sua atividade e promovendo sua morte celular.

Cenci et al (2000) observaram que o estrógeno também atua sobre as células T, visto que, após ovariectomia ocorre um aumento da produção de TNF- α por estas células. O TNF- α , ao ligar-se ao receptor p55-TNF- α , induz um aumento dos níveis de M-CSF e RANK-L, promovendo desta maneira, a fusão dos progenitores de osteoclastos. De acordo com Srivastava et al (2001), o estrógeno promove a diminuição dos níveis de fatores de transcrição fundamentais para a formação de osteoclastos.

A redução dos níveis de TNF- α e IL-1, que ocorre frente à ação do estrógeno sobre células T e monócitos, também inibe a atividade dos osteoclastos (Riggs et al, 2000). Esta inibição pode ocorrer indiretamente, via ação primária em osteoblastos e/ou diretamente, por meio de efeito primário em osteoclastos (Pacifci, 1996). De acordo com Parikka et al (2001), *in vitro*, a inibição da atividade do osteoclasto pelo estrógeno está relacionada, pelo menos em parte, à inibição de proteinases relacionadas à degradação óssea.

A atividade dos osteoclastos também parece estar relacionada à existência de uma interação entre osteócitos e osteoclastos. Como a morte dos osteócitos parece estimular os osteoclastos (Gu et al, 2005), talvez a deficiência estrogênica, que promove a apoptose dos osteócitos (Tomkinson et al, 1997; 1998), leve ao aumento do recrutamento e da atividade de osteoclastos, células que possivelmente removem os osteócitos em apoptose. Esta idéia é reforçada por um estudo em que se observou osteoclastos internalizando osteócitos em apoptose (Boabaid et al, 2001).

Além destes mecanismos, o estrógeno também parece inibir a reabsorção óssea ao atuar sobre a via RANK/RANKL/OPG, relacionada à formação de osteoclastos (Väänänen, 2005; Kanzaki et al, 2006). Ao agir sobre células mesenquimais osteoprogenitoras/osteoblastos, o estrógeno promove uma redução dos níveis de RANKL – ligante de RANK – e aumento da produção de OPG – competidor de RANK – (Bord et al, 2003). Assim, a OPG, que apresenta níveis aumentados (Rogers et al, 2002), liga-se ao RANKL e impede sua interação com o RANK (presente em precursores de osteoclastos), inibindo conseqüentemente a diferenciação e fusão dos precursores de osteoclastos (Kawamoto et al, 2002).

A presença de receptores para estrógeno tem sido demonstrada em osteoblastos (Bonnelye et al, 2001; Bord et al, 2003). Além de atuar sobre os osteoblastos induzindo a síntese de matriz óssea (Liu, Howard, 1991; Chow et al, 1992), o estrógeno também promove a liberação de fatores, como TGF- β , que atuam paracrinamente sobre os osteoclastos (Ousler et al, 1991), inibindo a reabsorção óssea e estimulando a morte dos osteoclastos (Hughes et al, 1996). Apesar da paracrinia entre osteoblastos e osteoclastos ser considerada principal responsável pela diminuição da formação e/ou da atividade dos osteoclastos e, conseqüentemente, pelo controle da remodelação óssea (Pacifici, 1996), alguns autores têm demonstrado que o estrógeno age diretamente sobre os osteoclastos (Ousler et al, 1994; Kameda et al, 1997; Hainey et al, 2000; Bonnelye et al, 2002). Kameda et al (1997) observaram *in vitro* a apoptose em osteoclastos tratados com 17 β -estradiol, sugerindo que o estrógeno pode agir diretamente sobre essas células. Além disso, a presença de receptores α (Bonnelye et al, 2002) e β (Hainey et al, 2000) específicos para o estrógeno (RE α e RE β) tem sido demonstrada em osteoclastos. Bonnelye et al (2002) detectaram por meio de imunohistoquímica a presença de RE α em osteoblastos, osteócitos e também em osteoclastos. Hainey et al (2000) demonstraram a presença de RE β em osteoclastos de tecido ósseo de adultos de ambos os sexos, bem como de idosos apresentando doença de Paget ou hiperparatireoidismo secundário.

Mediante os dados da literatura fica claro que estrógeno inibe a reabsorção óssea. Se o estrógeno diminui a atividade reabsortiva dos osteoclastos é possível que esta redução ocorra, pelo menos em parte, como conseqüência de morte celular programada (apoptose). Assim, nesta revisão de literatura serão abordadas algumas características gerais do processo de apoptose, bem como alguns aspectos relacionados à apoptose de células ósseas.

2.3 Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular programada que exerce no organismo uma função oposta à da mitose (Cummings, 1997; Raff, 1998), sendo responsável pela manutenção do equilíbrio populacional dos tecidos (Wyllie et al, 1980; Huppertz et al, 1999). Diferentemente da necrose, a apoptose é um processo de morte celular que ocorre em resposta a um estímulo específico, seguindo aparentemente um controle intrínseco (Kerr et al, 1972). Além da apoptose e da necrose, outros tipos de morte celular e de variações nas mortes convencionais têm sido descritos (Clarke, 1990; Roach, Clarke, 1999).

Acredita-se que todas as células apresentem um relógio biológico para o programa de morte celular, o qual é desencadeado por sinais provenientes do meio intra ou extracelular (Majno, Joris, 1995). A deflagração inadequada dos mecanismos desencadeadores da apoptose pode promover a ocorrência de doenças degenerativas crônicas e agudas, imunodeficiência e infertilidade. Por outro lado, a ausência ou insuficiência deste tipo de morte celular pode promover o aparecimento do câncer ou de doenças auto-imunes (Danial, Korsmeyer, 2004).

As características morfológicas observadas em células em processo de apoptose foram descritas por Kerr et al (1972). Neste tipo de morte celular, a deflagração de uma complexa e ampla cascata de eventos bioquímicos e moleculares intracelulares (Huppertz et al, 1999) culmina com alterações na morfologia da célula (Wyllie, 1987).

Dentre os mecanismos moleculares desencadeados durante a apoptose, podemos destacar a ativação das caspases ou cisteíno-proteases. Estas proteases, que possuem em seu sítio ativo o aminoácido cisteína, apresentam-se sob a forma inativa de pró-caspases, sendo ativadas pela clivagem de ácidos aspárticos constituintes de sua estrutura. Em humanos existem mais de 10 tipos destas enzimas, muitas das quais são ativadas durante a apoptose (Raff, 1998). Geralmente as caspases são divididas em dois grupos: caspases iniciadoras (caspases-8, 9 e 10), responsáveis pelos primeiros eventos proteolíticos da apoptose e caspases executoras

(caspases-3, 6 e 7), relacionadas à progressão irreversível da apoptose (Smith et al, 1994).

Assim, as caspases iniciadoras deflagram os primeiros eventos proteolíticos da apoptose, como por exemplo, a quebra de fodrina, vimentina, citoqueratina e actina. O rompimento do citoesqueleto determina a formação dos “blebs”, ou seja, saliências na superfície celular. Além destes eventos, nesta fase ocorre também a externalização da fosfatidilserina, que ao se acumular do lado externo da membrana plasmática, serve como sinal para que estas células sejam reconhecidas pelos fagócitos como células em apoptose (Huppertz et al, 1999). Se a cascata proteolítica da apoptose tiver continuidade, ocorre a ativação das caspases executoras que degradam uma grande variedade de proteínas celulares, causando danos irreversíveis à célula. Estas caspases executoras ativam as endonucleases, enzimas responsáveis pela fragmentação do DNA na região de ligação entre nucleossomas (Steller, 1995). Algumas destas caspases atuam diretamente na destruição de proteínas estruturais do núcleo (laminas A, B e C) e, conseqüentemente, o núcleo perde sua forma (Raff, 1998). Além disto, as caspases também atuam inibindo PARP (“Poly ADP-Ribose Polimerase”) – enzima responsável pela reparação do DNA. O complexo ICAD (“inhibitor of deoxyribonuclease caspase-activated”) é clivado e o CAD (“deoxyribonuclease caspase-activated”) liberado atua como uma nuclease, promovendo a fragmentação do DNA (Steller, 1995; Thornberry, Lazebnik, 1998). A fragmentação internucleossomal do DNA em 180-200 pares de bases pode ser detectada em cortes de tecidos por um método preconizado por Gavrieli et al (1992). Este método é baseado na marcação específica da terminação 3'-hidroxil do DNA fragmentado, por meio da adição de nucleotídeos pela enzima TdT (“Terminal deoxynucleotidyl Transferase”). Após a incubação com anti-digoxigenina peroxidase, a reação é revelada com agentes cromogênicos, como a diaminobenzidina (DAB) que proporciona a formação de um precipitado castanho nos núcleos que exibem quebra do DNA. Este método é conhecido como método do TUNEL (“TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling”). Os eventos moleculares relacionados à degradação do DNA e de proteínas estruturais do núcleo determinam a condensação da cromatina que fica agregada em massas compactas, adjacentes à membrana nuclear, podendo apresentar

aspecto de “meia-lua crescente” ou “ferradura” (Wyllie, 1987; Majno, Joris, 1995). Observa-se uma irregularidade no envelope nuclear, que passa a apresentar uma ligeira dilatação de suas cisternas (Arends et al, 1990) e, além disto, o nucléolo torna-se aumentado, apresentando grânulos grosseiros e dispersos. Concomitantemente a estas alterações nucleares, a perda de líquido intracelular promove a diminuição do volume total da célula, o que ocasiona o aumento da densidade citoplasmática e a compactação das organelas, as quais permanecem com aspecto morfológico normal (Wyllie et al, 1980).

Subseqüentemente, a cascata proteolítica da apoptose promove alterações morfológicas que culminam na fragmentação da célula em apoptose. As porções que se separaram da célula em apoptose são denominadas corpos apoptóticos (Steller, 1995; Raff, 1998). Os corpos apoptóticos são envolvidos por membrana plasmática e podem conter fragmentos de núcleo exibindo cromatina condensada e organelas aparentemente intactas (Wyllie et al, 1980; Lincz, 1998). A exposição de moléculas sinalizadoras na membrana plasmática da célula em apoptose garante que os corpos apoptóticos sejam rapidamente fagocitados por células vizinhas ou por macrófagos que apresentam receptores de superfície específicos (Moreira, Barcinski, 2004). Além de receptores para a fosfatidilserina, outros receptores presentes na superfície de células fagocitárias, como CD91, CD14, CD36 e integrina $\alpha_v\beta_3$, também têm sido relacionados à fagocitose de células em apoptose (Savill, Fadok, 2000). Fagossomas contendo corpos apoptóticos adquirem enzimas digestivas pela fusão com lisossomos primários e secundários e a degradação é rápida (Majno, Joris, 1995; Steller, 1995; Raff, 1998). Em geral, a rápida velocidade com que ocorre todo o processo de morte celular programada dificulta a sua observação (Raff, 1998).

Diversos fatores podem ser responsáveis pelo desencadeamento do processo de apoptose, sendo que uma das vias está relacionada a receptores para apoptose (Raff et al, 1993). Os receptores para apoptose fazem parte de uma superfamília denominada TNF (fator de necrose tumoral) e são caracterizados, principalmente, pelos receptores CD95 (também conhecido com Fas ou Apo 1) e TNFR1 (também denominado P55 ou C1420a). O CD95 ou Fas é constituinte de uma das vias mais freqüentemente ativadas na apoptose. A célula sintetiza uma proteína

(Fas-ligante) que se liga aos receptores Fas provocando agregação dos mesmos. O cofator FAAD (proteína Fas associada ao domínio de morte) cliva a pró-caspase-8, ativando a caspase-8 (caspase iniciadora) que, por sua vez, vai ativar a caspase-3 (caspase executora) (Smith et al, 1994). Outro mecanismo que pode desencadear a apoptose é a liberação do citocromo c das mitocôndrias (Toescu, 1998). O citocromo c liberado se associa a outras moléculas como Apaf-1 (“Apoptotic protease activating factor-1”) e pró-caspase-9. Esta associação resulta na ativação da caspase-9 que desencadeia a cascata da apoptose em estágio irreversível de morte celular (Hill et al, 1997).

Apesar das caspases desempenharem um importante papel durante a apoptose de diversos tipos celulares, a ocorrência de morte celular programada, mesmo na ausência de caspases, tem sido sugerida. Acredita-se que neste tipo de morte celular programada caspase-independente, outras proteases como as catepsinas (proteases lisossomais), as calpaínas (da família das proteases cálcio-dependente) e a Granzima B possam estar presentes desempenhando os papéis executados pelas caspases (Abraham, Shaham, 2004).

Além das caspases, outras moléculas também estão relacionadas ao controle intracelular da apoptose. A maior classe de reguladores intracelulares é a família de proteínas Bcl-2 (“B cell lymphoma-2”). Quinze membros desta família têm sido identificados em mamíferos, sendo que alguns deles, como Bcl-2 e Bcl-X, suprimem a apoptose. Por outro lado, Bax, Bad e Bid promovem sua ocorrência (Adams, Cory, 1998). Outra importante família de reguladores intracelulares da apoptose são as proteínas IAP (“Inhibitors of Apoptosis”), as quais podem ligar-se a caspases ou pró-caspases inibindo-as (Raff, 1998).

Considerando-se que a apoptose ocorre na maioria dos tecidos, mantendo a população celular em equilíbrio, e que no tecido ósseo tem sido observada sua ocorrência em osteoblastos e osteócitos (Boabaid et al, 2001), é possível que este mecanismo de morte celular possa estar relacionado ao “turnover” ósseo, o qual é controlado por fatores sistêmicos, locais e ambientais.

2.3.1 Apoptose no tecido ósseo

O desencadeamento dos mecanismos de apoptose em células ósseas tem sido associado principalmente à presença ou à ausência de fatores sistêmicos, locais e ambientais. Estes fatores atuam sobre as células ósseas tanto em condições fisiológicas, quanto patológicas (Noble et al, 1997).

Inicialmente, acreditava-se que osteoblastos e osteócitos morressem por necrose, porém, diversos estudos têm demonstrado que estas células podem morrer por apoptose (Noble et al, 1997; Tomkinson et al, 1997; Silvestrini et al, 1998; 2000; Boabaid et al, 2001; Cerri et al, 2003; O'Brien et al, 2004). A apoptose de osteoblastos e osteócitos tem sido observada *in vivo*, mediante a administração de glicocorticóides (Silvestrini et al, 1998; 2000). Em experimento com camundongos transgênicos, nos quais a ação de glicocorticóides foi bloqueada, observou-se inibição da apoptose de osteoblastos e osteócitos (O'Brien et al, 2004).

A prevenção da apoptose de osteoblastos e osteócitos tem sido associada ao estrógeno (Tomkinson et al 1997; 1998; Kousteni et al, 2001), ao PTH (Dempster et al, 1993; Bringham, 2002), à calcitonina (Plotkin et al, 2005) e à leptina (Gordeladze et al, 2002). Apesar de inibir a formação óssea *in vitro*, a leptina parece proteger os osteoblastos da apoptose por promover o aumento de agentes intracelulares anti-apoptóticos (Gordeladze et al, 2002). Além destes hormônios, bifosfanatos - drogas utilizadas para o tratamento da osteoporose (Plotkin et al, 2005), citocinas, como a IL-6, e a maioria dos fatores de crescimento, como o TGF- β (Jilka et al, 1998), o IGF (Hill et al, 1997) e o FGF (Fator de crescimento de fibroblastos) (Debais et al, 2004) também exibem efeitos anti-apoptóticos nos osteoblastos. Por outro lado, acredita-se que alguns fatores ambientais, como a incidência de sobrecargas mecânicas no osso, estejam relacionados à apoptose dos osteócitos (Noble et al, 1997).

Devido ao fato do osteócito estar rodeado por matriz extracelular calcificada, sua morte celular programada pode apresentar alguns aspectos particulares. De acordo com Hamaya et al (2002) a morte celular de osteócitos consiste inicialmente de apoptose, porém frente à dificuldade de acesso de células vizinhas e

macrófagos para remoção dos corpos apoptóticos, a apoptose pode evoluir para necrose secundária. Por outro lado, sugere-se que a apoptose não só de osteócitos, mas também de osteoblastos e células de revestimento ósseo constitua um fator que promove a atração dos osteoclastos para as regiões do osso destinadas à reabsorção (Tomkinson et al, 1997; 1998; Boabaid et al, 2001; Gu et al, 2005).

2.3.1.1 Apoptose em osteoclastos

Em 1920, Arey propôs que os osteoclastos desaparecem da superfície óssea após sofrerem alterações degenerativas. Greenfield et al (1992) observaram em pré-osteoclastos, a ocorrência de fragmentação do DNA em 180 pares de bases, sugerindo morte celular por apoptose. Noxon et al (2001) sugeriram que durante a movimentação dentária ortodôntica, alguns osteoclastos sofrem apoptose, possivelmente, devido à tração e à hipóxia ocorridas.

A presença do receptor Fas para apoptose foi observada em osteoclastos, *in vitro* e *in vivo*. As supressões de genes que codificam o receptor e de genes que codificam o Fas-ligante promoveram aumento do número de osteoclastos e, conseqüentemente, osteoporose (Wu et al, 2003). Além disso, a presença de caspases foi detectada em cultura de precursores de osteoclastos (Zecchi-Orlandini et al, 1999; Woo et al, 2002), sugerindo que a apoptose está relacionada ao controle da reabsorção óssea.

A influência de hormônios, citocinas e fatores de crescimento na sobrevivência dos osteoclastos tem sido sugerida em diversos estudos. Geralmente, fatores que inibem a reabsorção óssea estão associados à apoptose destas células. Dentre os fatores que inibem a reabsorção estão: glicocorticóides (Dempster et al, 1997), TGF- β (Hughes et al, 1996), bifosfanatos (Ito et al, 1999; 2001), OPG (Hofbauer et al, 1999) e estrógenos (Hughes et al, 1996; Kameda et al, 1997). Por outro lado, ácido ascórbico, IL-1 e M-CSF têm sido sugeridos como inibidores da apoptose de osteoclastos por atuarem ativando a sua formação, inibindo a atividade das caspases e/ou por aumentarem a expressão de proteínas inibidoras da apoptose como c-IAP1 e c-IAP2 (Greenfield et al, 1999). Além destes fatores, a depleção do colesterol, a qual

promove redução dos níveis de M-CSF e RANK-L, também tem sido associada à inibição da formação de osteoclastos e à apoptose destas células (Luegmayer et al, 2004).

Alguns experimentos *in vitro* utilizando estrógeno (Kameda et al, 1997; Zecchi-Orlandini et al, 1999) têm sugerido a possibilidade dos osteoclastos e seus precursores sofrerem apoptose. Algumas características de osteoclastos em apoptose foram demonstradas em tíbia e fêmur de ratos que receberam bifosfanato (Ito et al, 1999). No entanto, até o presente momento, não encontramos estudos ultraestruturais da ação do estrógeno sobre os osteoclastos do osso alveolar. A apoptose, como um processo de morte celular que ocorre rapidamente, é difícil de ser observada. Talvez, a curta duração dos eventos da morte celular por apoptose, associada à rápida eliminação dos corpos apoptóticos, possa explicar porque, em condições fisiológicas, a apoptose de osteoclastos não tem sido observada (Jilka et al, 1998; Boabaid et al, 2001).

Assim, o presente modelo experimental consiste na administração de estrógeno em animais jovens, nos quais o osso alveolar apresenta intensa remodelação devido à erupção dentária. Em decorrência desta intensa remodelação, o osso alveolar exhibe numerosos osteoclastos, constituindo-se num adequado modelo *in vivo* para o estudo da ação do estrógeno sobre a reabsorção óssea, bem como para a verificação da possibilidade do estrógeno induzir a apoptose de osteoclastos. A presença de diversos osteoclastos aumenta as chances de observar se o estrógeno induz a apoptose destas células, visto que o processo de morte celular por apoptose ocorre rapidamente.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a ação do estrógeno sobre a reabsorção do osso alveolar de ratas jovens. Assim, foi realizada uma análise quantitativa dos osteoclastos TRAP-positivos presentes na superfície do osso alveolar. Com a finalidade de investigar a possibilidade do estrógeno induzir a apoptose de osteoclastos foram utilizados cortes corados com HE, submetidos aos métodos TUNEL, TRAP, TUNEL/TRAP combinados, além de microscopia eletrônica de transmissão.

4 MÉTODOS

4.1 Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, os princípios de cuidados para com os animais (NIH publication 85-23, 1985) e as leis nacionais para utilização de animais em pesquisa foram seguidos. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (CEP 98/04 – Anexo 9.2).

Foram utilizadas 15 ratas (*Rattus norvegicus albinus Holtzman*), de 22 dias de idade. Os animais, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - *Campus Araraquara*, foram mantidos sob regime hídrico e alimentar “*ad libitum*” e divididos eqüitativamente em 3 grupos: Grupo Estrógeno (GE), Grupo Sham (GS) e Grupo Controle (GC). O experimento foi realizado da seguinte maneira:

- **Grupo Estrógeno (GE):** nos animais deste grupo, foi administrado, diariamente, por via intramuscular, hexaidrobenzoato de estradiol (Benzoginoestril ap® – Hoechst Marion Roussel – São Paulo, Brasil). O estrógeno foi diluído em óleo de milho e administrado, com seringa de insulina, na concentração de 0,125mg/100g de peso corporal do animal, durante um período de 7 dias (baseado em Silberberg, Silberberg, 1941; Chow et al, 1992). Após 24 horas da última aplicação do hormônio, os animais foram sacrificados.
- **Grupo Sham (GS):** neste grupo os animais foram submetidos às mesmas condições experimentais do GE, porém, receberam apenas o óleo de milho utilizado como veículo para diluição do hexaidrobenzoato de estradiol.
- **Grupo Controle (GC):** os animais deste grupo não receberam qualquer tratamento e foram sacrificados aos 29 dias de idade.

O sacrifício dos animais foi realizado com injeção intraperitoneal de uma superdose de hidrato de cloral a 10% (0,6ml/100g de peso corporal). Após o sacrifício, fragmentos dos lados direito e esquerdo da maxila, contendo os molares superiores, foram removidos. Tesoura cirúrgica curva foi utilizada para remoção da

maxila e, lâmina de bisturi para separação dos lados direito e esquerdo. Os fragmentos foram então imediatamente colocados em solução fixadora.

4.2 Microscopia de Luz

Os fragmentos contendo osso alveolar foram fixados, à temperatura ambiente, durante 48 horas, em solução contendo formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação, os fragmentos contendo os molares superiores foram descalcificados, durante 40 dias, em EDTA (Ácido Etileno-Diamino-Tetracético) a 7%, tamponado em fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Posteriormente, os fragmentos de maxila foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, a partir do álcool 70 °GL até o absoluto, sendo então, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina contendo os fragmentos de maxila foram cortados com auxílio de micrótomo (Micron, modelo HM 325) e cortes seriados com 6 µm de espessura foram aderidos a lâminas de vidro com ou sem tratamento prévio com silano (3-aminopropylthoxysilane – Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Os cortes foram corados com hematoxilina de Carazzi e eosina de Lison (HE), submetidos aos métodos TUNEL, TRAP e TUNEL/TRAP combinados.

4.2.1 Método do TUNEL

Cortes aderidos a lâminas silanizadas foram submetidos ao método do TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling”) para detecção de quebras de DNA (Gavrieli et al, 1992). Foi utilizado o kit Apop-Tag® Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection (Chemicon Internacional, USA), seguindo a metodologia padronizada previamente por Cerri et al (2000).

Após desparafinização, hidratação gradativa e lavagem em PBS (tampão fosfato de sódio 50 mM acrescido de cloreto de sódio 200 mM), pH 7,2, por 5 minutos, os cortes foram tratados com proteinase K (Oncor Protein Digesting Enzyme) (20 µg/ml em PBS), durante 15 minutos, à temperatura ambiente, para expor as quebras de DNA. Após passagens em água corrente e água destilada, os cortes foram

imersos em peróxido de hidrogênio a 3%, por 20 minutos, para bloquear a peroxidase endógena. Subseqüentemente, foram realizadas lavagens em água corrente e água destilada e incubação em soro fetal bovino a 2%. Os cortes foram então colocados em tampão de equilíbrio, durante 20 minutos. Posteriormente, foi realizada a incubação com a enzima TdT (“Terminal deoxynucleotidyl Transferase”), por 1 hora, em câmara úmida, a 37 °C. Após a incubação, os cortes foram imersos, durante 20 minutos, no tampão de bloqueio (fornecido pelo Kit), a 37°C. Após as lavagens em PBS, os cortes foram incubados com a anti-digoxigenina-peroxidase por 30 minutos; subseqüentemente às lavagens em PBS, estes cortes foram tratados, por 5 minutos, com 3,3-diaminobenzidina (DAB) a 0,06% para revelar a reação. Após lavagem em água corrente e água destilada, foi realizada a contracoloração com hematoxilina de Carazzi. Como controle positivo, foram utilizados cortes de glândula mamária em involução (fornecidos pelo kit); no controle negativo, os cortes foram submetidos ao mesmo procedimento, porém a enzima TdT foi substituída por água destilada.

4.2.2 Método do TRAP

Para identificar os osteoclastos foi utilizado o método do TRAP (“Tartrate Resistant Acid Phosphatase”), um marcador de osteoclastos (Minkin, 1982). Este método é baseado na detecção da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato, presente em osteoclastos. A solução de incubação foi preparada dissolvendo 8 mg de naftol AS-BI (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) em 500 µl de N-N-dimetilformamida, seguindo-se a adição de 50 ml de tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,0, acrescido de 70 mg de “Fast Red Salt TR” (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Foi adicionado, posteriormente, tartarato de sódio 50 mM à solução que foi então filtrada. Após a incubação a 37 °C, os cortes foram lavados em água destilada, contracorados com hematoxilina de Carazzi e montados em meio aquoso. Como controle de especificidade, alguns cortes foram incubados na ausência do substrato (naftol AS-BI).

Alguns cortes foram submetidos ao método do TUNEL e subseqüentemente ao método do TRAP (Cerri et al, 2003). Essa combinação dos

métodos permitiu a identificação simultânea das quebras de DNA (apoptose) e da fosfatase ácida resistente ao tartarato, presente em osteoclastos.

Os cortes corados com HE e os cortes submetidos aos métodos TUNEL, TRAP e TUNEL/TRAP combinados foram analisados e fotografados em fotomicroscópio Olympus (modelo BX-50).

4.3 Número de osteoclastos da superfície do osso alveolar

A quantificação de osteoclastos TRAP-positivos/mm de superfície linear do osso alveolar foi realizada no GC, no GS e no GE. Foram quantificadas quatro lâminas por animal, mantendo-se um intervalo mínimo de 60 μ m entre os cortes. Através de um sistema de análise de imagens (Quantimet 500IW - Leica Qwin), a superfície óssea, presente entre as cristas ósseas mesial e distal do primeiro molar superior, foi delimitada e mensurada. Posteriormente, com auxílio de um microscópio de luz, em aumento final de 500x, foi realizada a contagem dos osteoclastos multinucleados TRAP-positivos presentes na superfície óssea delimitada. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística.

4.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Foram realizadas comparações múltiplas entre os três grupos de animais, utilizando-se as médias dos postos dos dados obtidos para cada animal do GC, do GS e do GE. Para execução da análise estatística, foi utilizado o programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA).

4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos de maxila contendo o osso alveolar do 1º molar foram fixados em uma mistura de glutaraldeído a 4% e formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído), em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por 16 horas, à temperatura ambiente. Os espécimes foram descalcificados em EDTA a 7% (contendo

0,5% de formaldeído) tamponado em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, à temperatura ambiente, por 40 dias. Em seguida, as peças foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e colocadas em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, por 1 hora. Após lavagem em água destilada, foi realizada a contrastação (*“en bloc”*) com solução aquosa de acetato de uranila a 1% por duas horas, à temperatura ambiente. Após a lavagem em água destilada, os espécimes foram cuidadosamente desidratados em soluções crescentes de álcool etílico. Após a passagem em óxido de propileno, foi realizada uma lenta infiltração com misturas de resina e óxido de propileno, em proporções crescentes de resina. Após a infiltração, os espécimes foram incluídos em Araldite puro, em moldes de silicone. Posteriormente, os moldes contendo as peças incluídas foram colocados em estufa a 56 °C, por 72 horas, para polimerização da resina.

Os blocos foram aparados e cortes semifinos de 300nm, feitos no ultramicrótomo Leica Ultracut UCT, foram corados com solução aquosa de azul de toluidina a 1% contendo 1% de borato de sódio. As regiões de osso alveolar contendo osteoclastos foram cuidadosamente examinadas e selecionadas para os cortes ultrafinos. Com os blocos aparados, cortes ultrafinos de 70-100nm (cinza-dourado) foram obtidos, coletados em telas de cobre de 400 “mesh” e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila alcoólica a 1% e citrato de chumbo. Os espécimes foram observados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão Philips CM200.

5 RESULTADOS

O osso alveolar do 1º molar de ratas de 29 dias do grupo Controle (GC) exibiu diversos osteoclastos TRAP-positivos, típicos de osso sofrendo rápida remodelação/"turnover" (Fig.5). Numerosos osteoclastos multinucleados exibindo citoplasma com forte atividade positiva para a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (corados em vermelho) foram, freqüentemente, observados justapostos a superfícies de reabsorção óssea, no GC e no grupo Sham (GS) (Fig. 6A). Por outro lado, apenas alguns osteoclastos TRAP-positivos foram encontrados na superfície do osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno (GE) (Fig. 6B). A análise quantitativa revelou que o número de osteoclastos TRAP-positivos/mm de superfície linear do osso alveolar foi significativamente ($p \leq 0,05$) menor no GE comparado ao GC e ao GS. Não foi observada diferença entre o GC e o GS (Tabela 1).

Cortes de osso alveolar de animais do GE, corados com HE, revelaram células gigantes exibindo corpos arredondados/ovóides em seu interior. Freqüentemente, densos corpos arredondados/ovóides contendo massas basofílicas estavam adjacentes a essas células gigantes. Diversas estruturas menores foram observadas ao redor da célula gigante (Fig. 7A). Quando foi realizado o método do TRAP, osteoclastos com conspícua atividade citoplasmática (corados em vermelho) exibiram núcleos fortemente corados pela hematoxilina, típicos de cromatina condensada (Fig. 7B). O método do TUNEL mostrou que, no GE, osteoclastos justapostos a superfície óssea exibiram, ocasionalmente, núcleos corados em castanho, característica de TUNEL-positividade (Fig. 7C). O método do TUNEL e a reação TRAP, realizados no mesmo corte, revelaram osteoclastos corados em vermelho exibindo núcleos TUNEL-positivos (castanho-amarelado) (Figs. 7D e 7E). Porções de osteoclastos TRAP-positivos justapostos a superfícies ósseas exibiram núcleo fortemente TUNEL-positivo (Fig. 7D). Osteoclastos TRAP-positivos com núcleos aparentemente intactos foram também observados no osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno. Algumas vezes, esses osteoclastos mostraram corpos arredondados/ovóides contendo massas irregulares de cromatina condensada no interior de amplos vacúolos do citoplasma TRAP-positivo (Fig. 7F). Os osteoclastos

exibindo cromatina condensada e/ou núcleos TUNEL-positivos não foram observados em todos os cortes de osso alveolar examinados no GE. No GC e no GS não foram encontrados osteoclastos TUNEL-positivos.

Controles para o método do TUNEL utilizando glândula mamária em involução revelaram estruturas positivas. Cortes incubados na ausência da enzima TdT foram negativos. Não foi observada atividade TRAP mediante a incubação em meio livre de substrato (dados não mostrados).

A análise ultraestrutural do osso alveolar do GE revelou osteoclastos com a ultraestrutura totalmente alterada (Fig. 8A) entre os osteoclastos normais (Fig. 8B). Esses osteoclastos alterados mostraram núcleos com formato irregular contendo conspícuas e tortuosas massas de cromatina condensada. Além disso, essas células exibiram citoplasma convoluto e encolhido, contendo numerosas vesículas e vacúolos que ocupavam quase todo seu interior. Imagens de organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático e elementos do Golgi foram raramente observadas entre as vesículas e vacúolos. Além disso, a borda em escova e a zona clara não foram observadas nesses osteoclastos (Fig. 8A).

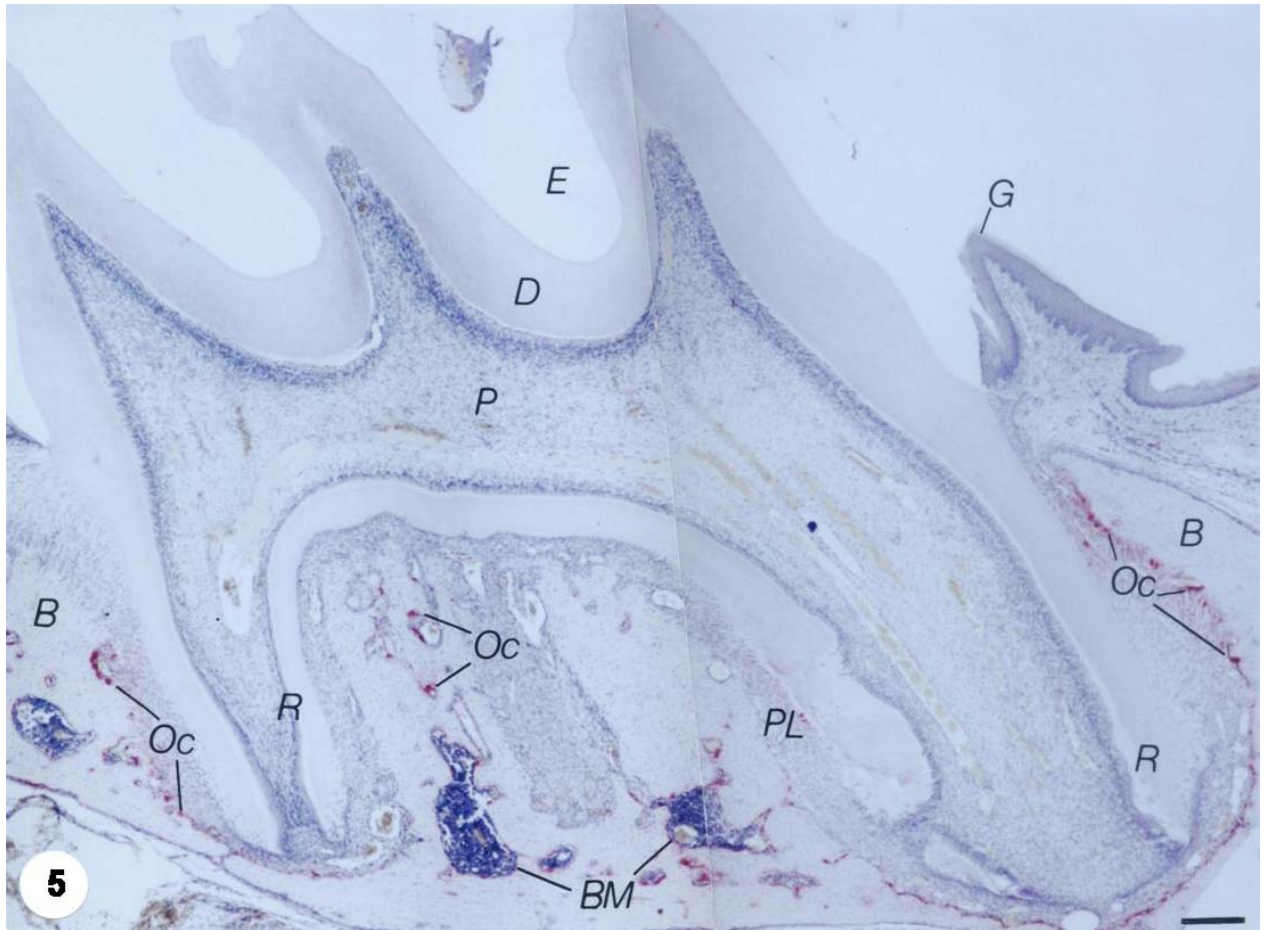
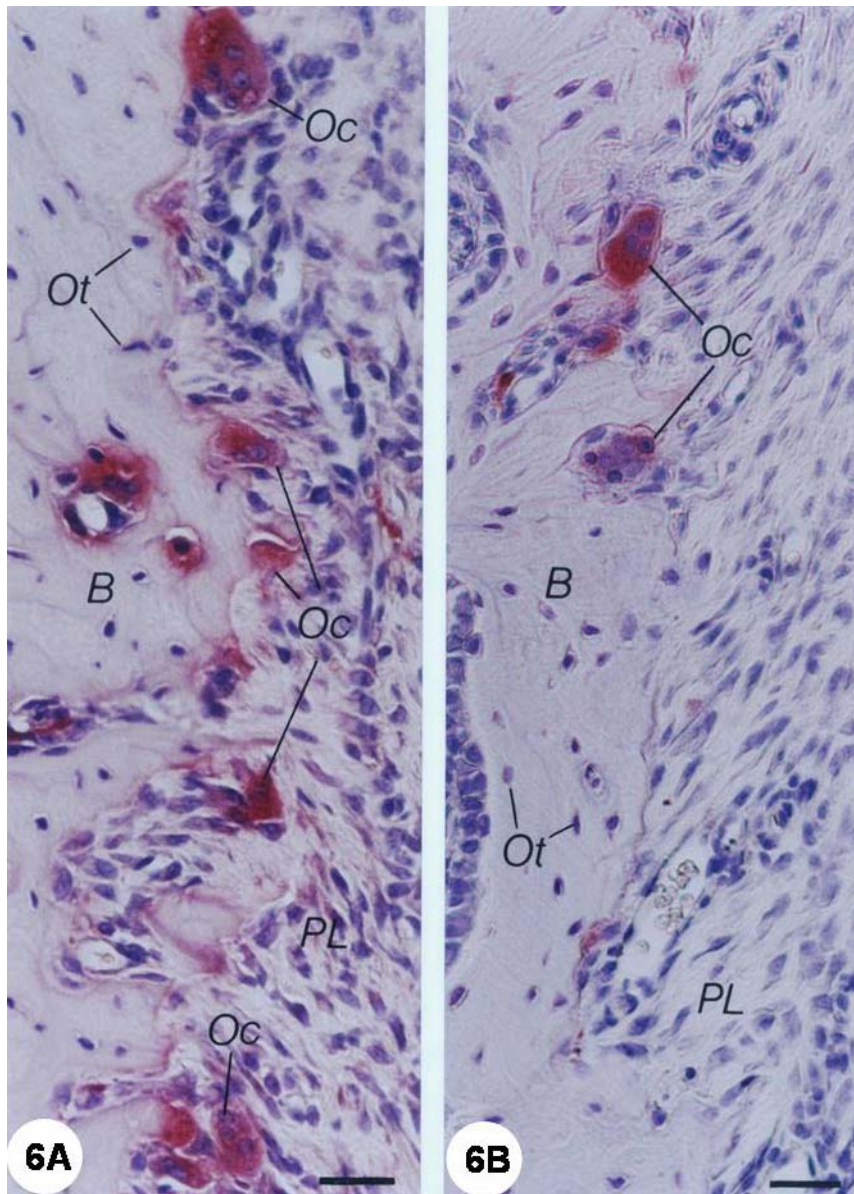


Figura 5 – Fotomicrografia de um corte sagital do primeiro molar superior de rata de 29 dias – grupo Controle (GC). O osso alveolar (B) ao redor das raízes do molar (R) exibe numerosos osteoclastos (Oc) apresentando atividade positiva para a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), corados em vermelho. PL, ligamento periodontal; E, espaço do esmalte; D, dentina; P, polpa dentária; G, gengiva; BM, medula óssea. Contrastado com hematoxilina. Barra: 150 μ m.



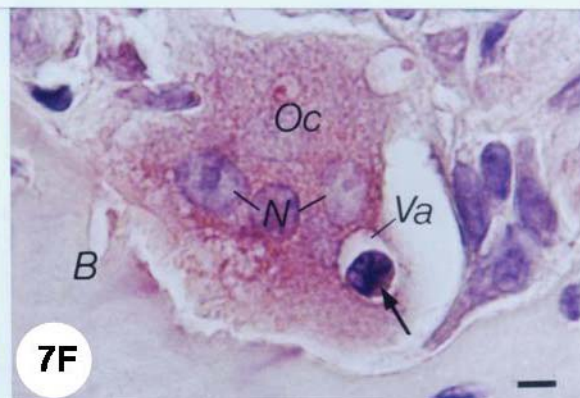
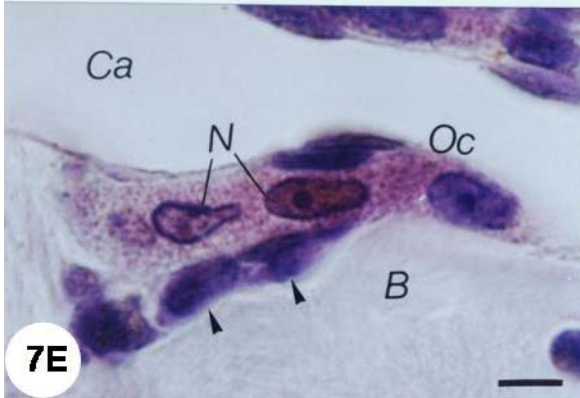
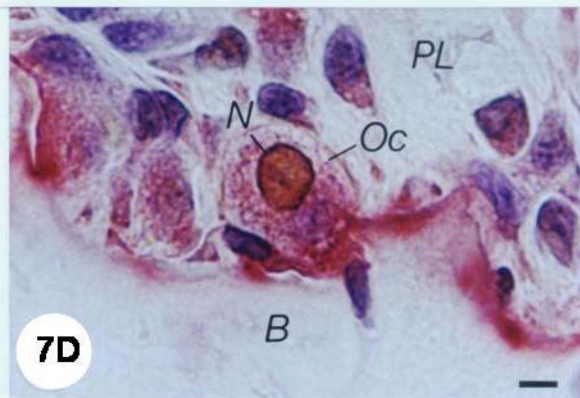
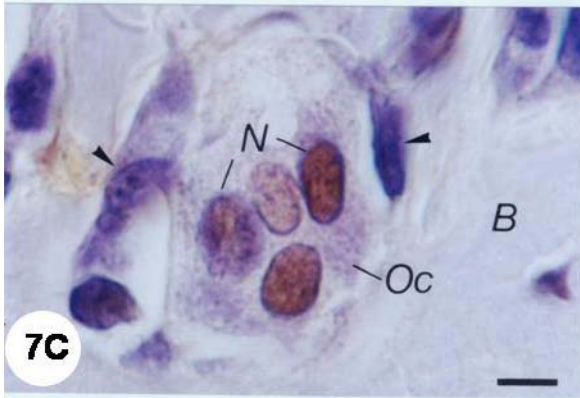
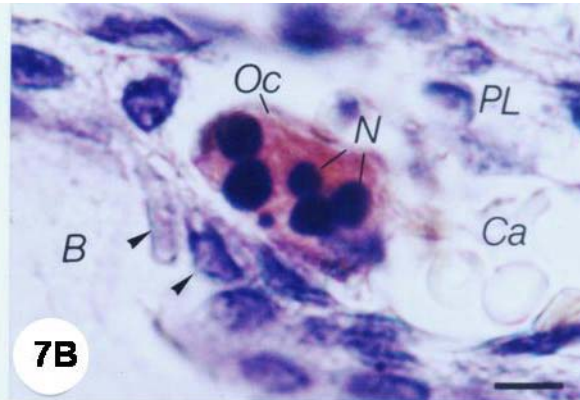
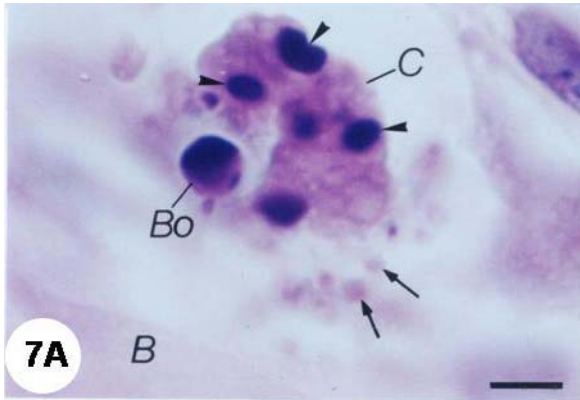
Figuras 6A e 6B – Fotomicrografias de porções de osso alveolar submetidas à reação do TRAP e contrastadas com hematoxilina - grupos Sham (2A) e Estrógeno (2B). Na **fig. 6A**, numerosos osteoclastos (Oc) TRAP-positivos (corados em vermelho) estão justapostos à superfície do osso alveolar (B). A **fig. 6B** mostra o osso alveolar (B) exibindo apenas dois osteoclastos (Oc) corados em vermelho. Ot, osteócitos; PL, ligamento periodontal. Barra: 30 μ m.

Tabela 1. Número de osteoclastos TRAP-positivos/mm de superfície do osso alveolar nos animais dos grupos Controle (GC), Sham (GS) e Estrógeno (GE)

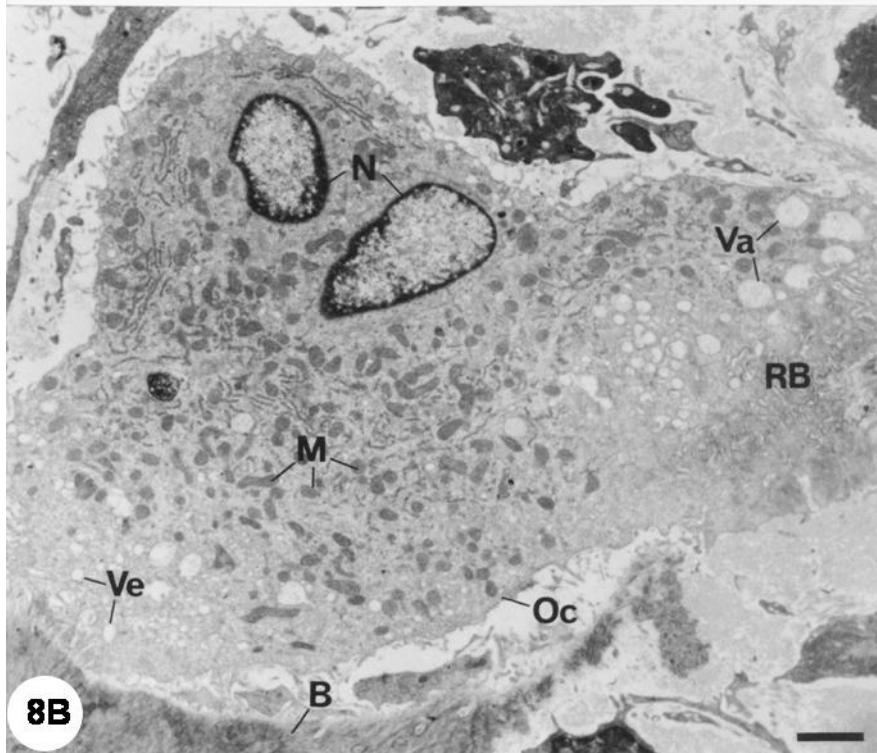
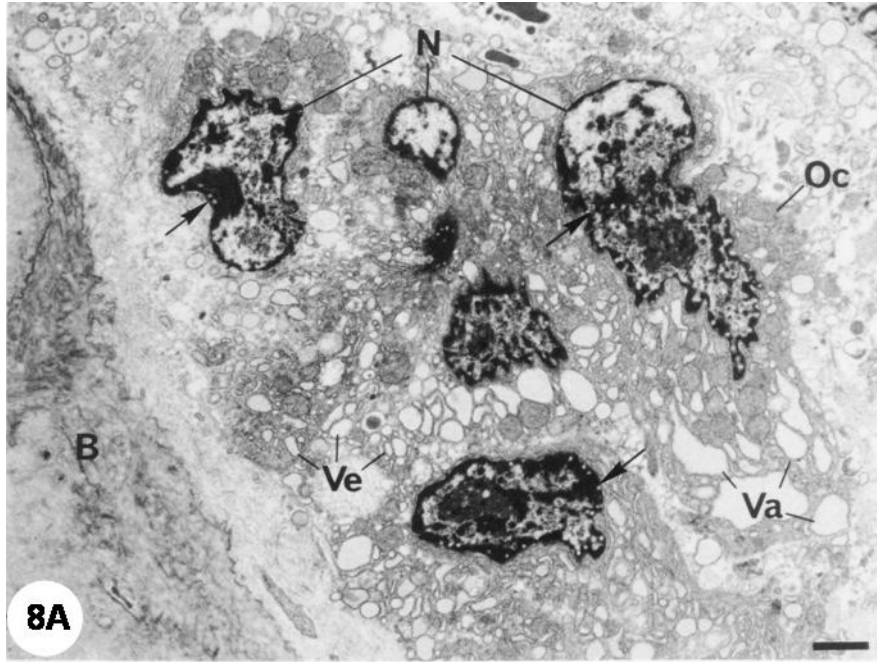
Animais	Grupos		
	GC	GS	GE*
1	1,72	1,76	0,81
2	1,89	1,80	0,88
3	1,91	1,85	1,03
4	1,99	2,20	1,24
5	2,62	2,33	1,27
Média ± DP	2,05 ± 0,34	1,99 ± 0,25	1,04 ± 0,88

DP: Desvio Padrão

* significativamente ($p \leq 0,05$) diferente de GC e GS



Figuras 7A-7F – Fotomicrografias de porções de osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno. Na **fig. 7A**, uma célula gigante (C), justaposta à superfície óssea (B), exibe diversos corpos densos arredondados/ovóides (cabeças de seta) em seu interior. Um corpo arredondado/ovóide (Bo) contendo massas basofílicas encontra-se adjacente à célula gigante (C). Diversas estruturas menores (setas) são observadas ao redor da célula gigante (C). HE. Barra: 5 μ m. A **fig. 7B** mostra uma porção de osso alveolar submetida à reação do TRAP e contrastada com hematoxilina. Um osteoclasto (Oc) TRAP-positivo exibe diversos núcleos (N) fortemente corados pela hematoxilina, típicos de cromatina condensada. B, matriz óssea; Cabeças de seta, células de revestimento ósseo; PL, ligamento periodontal; Ca, capilar sangüíneo. Barra: 6 μ m. A **fig. 7C** mostra uma porção de osso alveolar submetida ao método do TUNEL (castanho-amarelado) e contrastada com hematoxilina. O osteoclasto (Oc) localizado em uma escavação da superfície óssea (B) exibe TUNEL-positividade em todos os núcleos (N) observados. Cabeças de seta, células de revestimento ósseo. Barra: 6 μ m. Nas **figs. 7D e 7E**, o método do TUNEL (castanho-amarelado) foi combinado com a reação TRAP (vermelho). Na **fig. 7D**, uma porção de um osteoclasto (Oc) TRAP-positivo justaposto à superfície óssea (B) exibe núcleos (N) TUNEL-positivos. PL, ligamento periodontal. Barra: 5 μ m. Na **fig. 7E**, um osteoclasto (Oc) TRAP-positivo com formato alongado mostra alguns núcleos (N) TUNEL-positivos. B, matriz óssea; Cabeças de seta, células de revestimento ósseo; Ca, capilar sangüíneo. Barra: 6 μ m. A **fig. 7F** mostra uma porção de osso alveolar submetida à reação TRAP e contrastada com hematoxilina. Um osteoclasto (Oc) TRAP-positivo contendo núcleos (N) intactos está localizado em uma escavação da superfície óssea (B). O osteoclasto (Oc) apresenta um amplo vacúolo (Va) que contém um corpo arredondado/ovóide (seta) exibindo massas irregulares de cromatina condensada no interior. Barra: 5 μ m.



Figuras 8A e 8B - Micrografias eletrônicas de porções de osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno. Na **fig. 8A**, um osteoclasto (Oc) multinucleado localizado próximo à superfície óssea (B) apresenta diversos núcleos (N) com formato irregular exibindo massas conspícuas e tortuosas de cromatina condensada (setas); o citoplasma convoluto e encolhido contém numerosos vacúolos (Va) e vesículas (Ve), os quais ocupam quase todo seu interior. Barra: 1,5 μm . Na **fig. 8B**, um osteoclasto (Oc) típico, exibindo borda em escova (RB), numerosas mitocôndrias (M), vesículas (Ve) e vacúolos (Va) de tamanhos variados, está localizado em uma escavação da superfície óssea (B). N, núcleos. Barra: 2,5 μm .

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados quantitativos mostraram uma acentuada redução do número de osteoclastos (TRAP-positivos) do osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno (GE), quando comparado aos grupos Controle (GC) e Sham (GS). Os mecanismos envolvidos na redução do número de osteoclastos não estão completamente entendidos, mas esta redução pode ocorrer devido à morte celular do osteoclasto induzida pelo estrógeno (Hughes et al, 1996; Kameda et al, 1997), ou devido à interferência do estrógeno nos mecanismos de formação do osteoclasto (Pacifci, 1996; Cenci et al, 2000; Srivastava et al, 2001).

Nossos resultados morfológicos, *i.e.* cortes corados com HE, submetidos à reação do TRAP, ao método do TUNEL e aos métodos TUNEL/TRAP combinados, sugerem fortemente que os osteoclastos do osso alveolar sofrem morte celular no GE, sendo, por esta razão, observada a diminuição do número. Cortes corados por HE e TRAP revelaram osteoclastos encolhidos exibindo cromatina condensada. Ocasionalmente, esses osteoclastos estavam rodeados por estruturas arredondadas/ovóides contendo material denso, similares aos corpos apoptóticos descritos em outros tecidos (Kerr et al, 1972; Wyllie et al 1980; Boabaid et al, 2001; Cerri, Katchburian, 2005). Além disso, osteoclastos TRAP-positivos também exibiram TUNEL-positividade. Os métodos TUNEL e TRAP, realizados no mesmo corte (Cerri et al, 2003), permitiram a demonstração simultânea das quebras de DNA (Gavrieli et al, 1992) e da fosfatase ácida resistente ao tartarato, um marcador característico de osteoclastos (Minkin, 1982). As quebras de DNA constituem parte da cascata de eventos moleculares observada durante a apoptose (Cohen, 1999; Danial, Korsmeyer, 2004), porém, deve-se considerar que o método do TUNEL sozinho não é específico para apoptose (Grasl-Kraupp et al, 1995). Embora existam diversos marcadores para apoptose, é geralmente aceito que as imagens ultraestruturais são mais relevantes para a identificação da apoptose clássica (Torres et al, 2002; Cerri, Katchburian, 2005). Deve-se considerar que osteócitos (Elmardi et al, 1990) e células ósseas apoptóticas (Taniwaki, Katchburian, 1998; Boabaid et al, 2001; Cerri et al, 2003) são fagocitadas por osteoclastos durante a reabsorção óssea. Então, é importante notar que alguns corpos

encontrados no interior de osteoclastos podem ser osteoblastos/osteócitos apoptóticos internalizados por osteoclastos. Estes corpos internalizados podem ser distinguidos de núcleos de osteoclastos apoptóticos por, usualmente, apresentar um halo claro ao seu redor.

Nossas imagens ultraestruturais revelaram que no GE, alguns osteoclastos justapostos à superfície óssea exibiram massas conspícuas e tortuosas de cromatina condensada no interior de seus núcleos. Esses núcleos são típicos de células que podem estar sofrendo apoptose (Kerr et al, 1972; Cerri et al, 2000; Boabaid et al, 2001; Cerri, Katchburian, 2005). Porém, o citoplasma desses osteoclastos, diferente do observado em células apoptóticas mononucleadas (Kerr et al, 1972; Cerri et al, 2000), encontrava-se quase totalmente preenchido por vesículas e vacúolos e pobre em organelas como mitocôndria, retículo endoplasmático rugoso e elementos do Golgi. Além disso, esses osteoclastos não exibiram borda em escova nem zona clara. A ausência de ambas estruturas também foi observada em osteoclastos apoptóticos presentes em ratas tratadas com bifosfanatos (Ito et al, 1999; Ito et al, 2001) e isso pode ser devido à degradação das proteínas do citoesqueleto, que ocorre durante a cascata proteolítica da apoptose (Huppertz et al, 1999; Danial, Korsmeyer, 2004).

Embora alguns aspectos observados fossem característicos de morte celular por apoptose, a presença de numerosas vesículas e vacúolos no citoplasma de osteoclastos do GE difere da apoptose clássica, descrita para células mononucleadas. Além disto, os osteoclastos em processo de morte celular exibiram poucas organelas, diferindo da apoptose clássica de células mononucleadas, na qual as organelas permanecem intactas (Kerr et al, 1972; Wyllie et al, 1980). É importante mencionar a possibilidade de que a presença de numerosas vesículas e vacúolos em osteoclastos morrendo possa ser devido à superfície extremamente convoluta do osteoclasto. Assim, em cortes ultrafinos, estas vesículas e vacúolos podem representar cortes transversais e oblíquos da superfície convoluta e/ou da membrana da borda em escova, a qual pode ter sido internalizada.

Em conjunto, nossos resultados indicam que os osteoclastos sofrem um processo de apoptose que em alguns aspectos ultraestruturais difere da apoptose

clássica (Clarke, 1990). A morte celular de condrócitos também parece diferir da apoptose clássica (Roach, Clarke, 1999).

Embora corpos apoptóticos adjacentes à superfície óssea tenham sido observados, fomos incapazes de discernir imagens de corpos apoptóticos originados a partir de osteoclastos em apoptose, de outras células em processo de morte celular. Corpos apoptóticos localizados próximos ao osso e próximos a osteoclastos morrendo não diferem de estruturas apoptóticas derivadas de células mononucleadas (Kerr et al, 1972; Cerri et al, 2000; Boabaid et al, 2001; Cerri, Katchburian, 2005). Além disto, como a apoptose é extremamente rápida, não se pode excluir a possibilidade de que células vizinhas, como fibroblastos, osteoblastos ou outros osteoclastos possam ter fagocitado corpos apoptóticos derivados de osteoclastos apoptóticos. Na maioria dos tecidos, os corpos apoptóticos são removidos pela ação combinada de células vizinhas, células do mesmo tipo e macrófagos (Raff, 1998; Cerri, 2005).

Desde que a maioria dos estudos envolvendo morte de osteoclastos foi realizada *in vitro* (Kameda et al, 1995; 1997) e/ou foi restrita a microscopia de luz (Hughes et al, 1996; Noxon et al, 2001), acreditamos que nossos resultados mostraram, pela primeira vez *in vivo*, imagens ultraestruturais de osteoclastos do osso alveolar em processo de morte celular, em ratas tratadas com estrógeno. A ausência de imagens de osteoclastos morrendo no GC e no GS estão de acordo com os achados de outros autores (Jilka et al, 1998; Boabaid et al, 2001). No GE foi difícil encontrar imagens de osteoclastos morrendo e, além disso, não houve um padrão de distribuição dessas células na superfície do osso alveolar. Assim, os osteoclastos em processo de morte celular coexistiram com osteoclastos normais, porém, não temos explicações para o fato que alguns osteoclastos são afetados pelo estrógeno e outros não o são.

Devido à sua ação inibitória sobre a reabsorção óssea, o estrógeno é utilizado para prevenção e tratamento da osteoporose. Porém, os mecanismos celulares e moleculares de ação do estrógeno no osso não estão esclarecidos. Tem sido sugerido que o estrógeno regula negativamente a formação, atividade e sobrevivência do osteoclasto (Manolagas, 2000). A ação do estrógeno nos osteoclastos pode ser mediada por células T (Cenci et al, 2000), monócitos e osteoblastos (Pacifci et

al, 1996), bem como também ocorrer diretamente em osteoclastos por meio de receptores de estrógeno (Hainey et al, 2000; Bonnelye et al, 2002). Existem evidências que o estrógeno inibe a produção de citocinas tais como: IL-1, TNF, IL-6, M-CSF (Pacifci 1996) e RANK-L (Srivastava et al, 2001). Desde que algumas destas citocinas estimulam a atividade e a sobrevivência dos osteoclastos, tem sido sugerido que o estrógeno diminui a reabsorção óssea, promovendo, via ação de citocinas, a redução do número de osteoclastos. Nossos resultados reforçam a idéia de que o estrógeno inibe a reabsorção óssea por meio da redução do número de osteoclastos, indicando que esta redução pode ser, pelo menos em parte, uma consequência da apoptose de osteoclastos. Porém, não se pode excluir a possibilidade de que esta redução possa estar também associada à atividade inibitória do estrógeno sobre a formação do osteoclasto (Pacifci 1996; Cenci et al, 2000; Srivastava et al, 2001).

Nossos resultados quantitativos, quando combinados com os métodos TUNEL/TRAP e microscopia eletrônica de transmissão suportam a interpretação que o estrógeno promove – direta e/ou indiretamente – a apoptose de osteoclastos do osso alveolar. Porém, mais estudos são necessários para esclarecer possíveis eventos moleculares envolvidos.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados quantitativos combinados com os resultados morfológicos obtidos com HE, métodos TUNEL/TRAP e microscopia eletrônica de transmissão apóiam a interpretação que o estrógeno promove a apoptose de osteoclastos do osso alveolar. Assim, a apoptose de osteoclastos seria responsável, pelo menos em parte, pela redução do número destas células e, conseqüentemente, pela diminuição da reabsorção óssea. Entretanto, nossos resultados indicam que a apoptose de osteoclastos difere, em alguns aspectos ultraestruturais, da apoptose clássica que ocorre em células mononucleadas.

8 REFERÊNCIAS

1. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 1994;55:287-99.
2. Abraham MC, Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends Cell Biol* 2004;14:184-93.
3. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.
4. Andersson G, Ek-Rylander B. The tartrate-resistant purple acid phosphatase of bone osteoclasts - a protein phosphatase with multivalent substrate specificity and regulation. *Acta Orthop Scand* 1995;266:189-93.
5. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593-608.
6. Arey LB. The origin, growth and fate of osteoclasts and their relation to the bone resorption. *Am J Anat* 1920;26:315-45.
7. Aubin JE. Osteoclast adesion and resorption: the role of podosomes. *J Bone Miner Res* 1992;7:365-68.
8. Bernick S, Ershoff BH. Histochemical study of bone in estrogen-treated rats. *J Dent Res* 1963;42:981-9.
9. Birn H. The vascular supply of the periodontal membrane. An investigation of the number and size of perforations in the alveolar wall. *J Periodont Res* 1966;1:51-68.
10. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989;245:855-7.
11. Bloom W, Bloom MA, McLean FC. Calcification and ossification. Medulary bone changes in reproductive cycle of female pigeons. *Anat Rec* 1941;81:443-75.

12. Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue Cell* 2001;33:318-25.
13. Bonafe-Oliveira L, Faltin RM, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and histochemical examination of alveolar bone at the pressure areas of rat molars submitted to continuous orthodontic force. *Eur J Oral Sci* 2003;111:410-6.
14. Bonnelye E, Kung V, Laplace C, Galson DL, Aubin JE. Estrogen receptor-related receptor α impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. *Endocrinology* 2002;143:3658-70.
15. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 2003;32:136-41.
16. Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem* 1980;49:957-1003.
17. Bowman BM, Miller SC. The proliferation and differentiation of the bone-lining cell in estrogen-induced osteogenesis. *Bone* 1986;7:351-7.
18. Boyce BF, Hughes DE, Wright RK, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Inv* 1999;79:83-94.
19. Bringhurst FR. PTH receptors and apoptosis in osteocytes. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002;2:245-51.
20. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J Clin Invest* 2000;106:1229-37.
21. Cerri PS, Freymüller E, Katchburian E. Apoptosis in the early developing periodontium of rat molars. *Anat Rec* 2000;258:136-44.
22. Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods

- suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodont Res* 2003;38:223-6.
23. Cerri PS. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. *Anat Rec* 2005;286:833-40.
 24. Cerri PS, Katchburian E. Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez of the periodontium of rat molars. *J Periodont Res* 2005;40:365-72.
 25. Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behavior of isolated osteoclasts. *J Pathol* 1982;136:27-39.
 26. Chambers TJ. The pathobiology of the osteoclast. *J Clin Pathol* 1985;38:241-52.
 27. Chambers TJ, Chambers JC, Symonds J, Darby JA. The effect of human calcitonin on the cytoplasmic spreading of rat osteoclasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:1080-85.
 28. Chow JWM, Lean JM, Chambers TJ. 17β -estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology* 1992;130:3025-32.
 29. Clarke PGH. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embriol* 1990;181:195-213.
 30. Cohen JJ. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:548-54.
 31. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. In: Sternberg SS. *Histology for pathologists*. 2nd ed. New York: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p.3-21.
 32. Damoulis PD, Hauschka PV. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1997;12:412-22.
 33. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-19.
 34. Davies J, Warwick J, Tutty N, Philip R, Helfrich M, Horton M. The osteoclast

- functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *J Cell Biol* 1989;109:1817-26.
35. Debiais F, Lefevre G , Lemonnier J, Le Mee , Lasmoles F, Mascarelli F, et al. Fibroblast growth factor-2 induces osteoblast survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent,-beta-catenin-independent signaling pathway. *Exp Cell Res* 2004;297:235-46.
 36. Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev* 1993;14:690-709.
 37. Dempster DW, Moonga BS, Stein LS, Horbert WR, Antakly T. Glucocorticoids inhibit bone resorption by isolated rat osteoclasts by enhancing apoptosis. *J Endocrinol* 1997;154:397-406.
 38. Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr. FH. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res* 2004;39:107-10.
 39. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-54.
 40. Elmardi AS, Katchburian MV, Katchburian E. Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1990;46:239-45.
 41. Fukushima O, Bekker PJ, Gay CV. Characterization of the functional stages of osteoclasts by enzyme histochemistry and electron microscopy. *Anat Rec* 1991;231:298-315.
 42. Garant PR. Bone. In: Garant PR, editor. *Oral cells and tissues*. 1st ed. Chicago: Quintessence books; 2003. p.195-238.
 43. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.

44. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *J Cell Biochem* 2002;85:825-36.
45. Göthlin G, Ericsson JLE. The osteoclast. Review of ultrastructure, origin and structure-function relationship. *Clin Orthop Relat Res* 1976;120:201-31.
46. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann. *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995;21:1465-68.
47. Greenfield EM, Alvarez JI, McLaurine EA, Oursler MJ, Blair HC, Osdoby P, et al. Avian osteoblast conditioned media stimulate bone resorption by targeting multinucleating osteoclast precursors. *Calcif Tissue Int* 1992;51:317-23.
48. Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. *Life Sci* 1999;65:1087-102.
49. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Väänänen HK. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Bioph Res Commun* 2005;335:1095-101.
50. Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders P, Hoyland JA, Braidman IP. Oestrogen receptor beta *in vivo* in osteoclasts and other bone cells of adult men and women [abstract]. *J Bone Miner Res* 2000;15:1217.
51. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y. Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int* 2002;70:117-26.
52. Helder MN, Bronckers AL, Woltgens JH. Dissimilar expression patterns for the extracellular matrix proteins osteopontin (OPN) and collagen type I in dental tissues and alveolar bone of the neonatal rat. *Matrix* 1993;13:415-25.

53. Heller M, McLean FC, Bloom W. Cellular transformation in mammalian bones induced by parathyroid extract. *Am J Anat* 1950;87:315-45.
54. Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblasts survival and apoptosis. *Endocrinology* 1997;138:3849-58.
55. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4382-9.
56. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat Med* 1996;2:1132-5.
57. Hughes DE, Boyce BF. Apoptosis in bone physiology and disease. *J Clin Pathol* 1997;50:132-37.
58. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade - morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999;200:1-18.
59. Ito M, Amizuka N, Nakajima T, Ozawa H. Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts induced by bisphosphonate treatment. *Bone* 1999;25:447-52.
60. Ito M, Amizuka N, Nakajima T, Ozawa H. Bisphosphonate acts on osteoclasts independent of ruffled borders in osteoclerotic (oc/oc) mice. *Bone* 2001;28:609-16.
61. Jilka RL, Takahashi K, Munshi M, Williams DC, Roberson PK, Manolagas SC. Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. *J Clin Invest* 1998;101:1942-50.
62. Kameda T, Ishikawa H, Tsutsui T. Detection and characterization of apoptosis in osteoclasts *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:753-60.
63. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, et al. Estrogen

- inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 1997;186:489-95.
64. Kanehisa J, Heersche JNM. Osteoclastic bone resorption: *in vitro* analysis of the rate of the resorption and migration of individual osteoclasts. *Bone* 1988;9:73-9.
 65. Kanzaki H, Chiba M, Arai K, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, et al. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Therapy* 2006; Jan 5 [in press].
 66. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 1999;13:3037-51.
 67. Katchburian E, Arana VE. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
 68. Katchburian E, Cerri PS. Formação e destruição óssea. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. *Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas (Divisão Odontológica); 2002. p.437-45.
 69. Kawamoto S, Ejiri S, Nagaoka E, Ozawa H. Effects of estrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. *Arch Oral Biol* 2002;47:67-73.
 70. Kember NF. Cell division in endochondral ossification. A study of cell proliferation in rat bones by the method of tritiated thymidine autoradiography. *J Bone Joint Surg Br* 1960;42:824-39.
 71. Kerr JFR, Wyllie, AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
 72. Kölliker A. Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung für die Entstehung der typischen Knochenformen, Vogel, Leipzig, 1873. Apud: Göthlin G, Ericsson JLE. The osteoclast. Review of ultrastructure, origin and structure-function relationship. *Clin Orthop Relat Res* 1976;120:201-31.
 73. Komori T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab* 2003;21:193-7.
 74. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, et al.

- Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104:719-30.
75. Lakkakorpi P, Tuukkanen J, Hentunen T, Järvelin K, Väänänen HK. Organization of osteoclasts microfilaments during the attachment to bone surface *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1989;4:817-25.
 76. Leaffer D, Sweeney M, Kellerman LA, Avnur Z, Krstenansky JL, Vickery BH, et al. Modulation of osteogenic cell ultrastructure by RS-23581, an analog of human parathyroid hormone (PTH)-related peptide-(1-34), and bovine PTH-(1-34). *Endocrinology* 1995;136:3624-31.
 77. Li CY, Yam LT, Lam KW. Studies of acid phosphatase isoenzymes in human leukocytes. Demonstration of isoenzyme cell specificity. *J Histochem Cytochem* 1970;18:901-10.
 78. Lian JB, Tassinari M, Glowacki J. Resorption of implanted bone prepared from normal and warfarin-treated rats. *J Clin Invest* 1984;73:1223-6.
 79. Lincz LF. Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 1998;76:1-19.
 80. Liu CC, Howard GA. Bone-cell changes in estrogen-induced bone-mass, increase in mice: dissociation of osteoclasts from bone surfaces. *Anat Rec* 1991;229:240-50.
 81. Luegmayer E, Glantschnig H, Wesolowski GA, Gentile MA, Fisher JE, Rodan GA, et al. Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ* 2004;11:108-18.
 82. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-19.
 83. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21:115-37.

84. Marks S, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988;183:1-44.
85. Marks SC, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec* 1996;245:374-93.
86. Miao D, Scutt A. Recruitment augmentation apoptosis of rat osteoclasts in 1,25-(OH)₂D₃ response to short-term treatment with 1,25 dihydroxyvitamin D₃ *in vivo*. *BMC Musculoskeletal Disord* [serial online] 2002 June [cited 2006 Feb 8]; 3:16[10 screens]. Available from: URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/3/16>.
87. Miller SC, Jee WSS. The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int* 1987;41:1-5.
88. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982;34:285-90.
89. Moreira MEC, Barcinski MA. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *An Acad Bras Ciênc* 2004;76:93-115.
90. Nefussi JR, Sautier JM, Nicolas V, Forest N. How osteoblasts become osteocytes: a decreasing matrix forming process. *J Biol Buccale* 1991;19:75-82.
91. Nesbit SA, Horton MA. Trafficking of matrix colagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 1997;276:266-9.
92. Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. *Bone* 1997;20:273-82.
93. Noxon SJ, King G, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:466-76.
94. O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 2004;145:1835-41.

95. Okahashi N, Nakamura I, Jimi E, Koide M, Suda T, Nishihara T. Specific inhibitors of vacuolar H⁺ ATPase trigger apoptotic cell death of osteoclasts. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1116-23.
96. Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8819-23.
97. Ousler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, et al. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology* 1991;129:3313-20.
98. Ousler MJ, Pederson L, Fitzpatrick L, Riggs BL, Spelsberg T. Human giant cells tumors of the bone (osteoclastomas) are estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5227-31.
99. Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV, et al. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocytes interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2398-402.
100. Pacifici R, Brown C, Rifas L, Avioli LV. TNF- α and GM-CSF secretion from human blood monocytes: effect of menopause and estrogen replacement. *J Bone Miner Res* 1990;5:145 [abstract].
101. Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11:1043-8.
102. Parikka V, Lehenkari P, Sassi ML, Halleen J, Risteli J, Härkönen P, et al. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. *Endocrinology* 2001;142:5371-8.
103. Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol* 2004;19:1325-44.

104. Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *J Biol Chem* 2005;280:7317-25.
105. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*. 1993;262:695-700.
106. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998;396:119-22.
107. Raina V. Normal osteoid tissue. *J Clin Pathol* 1972;25:229-32.
108. Raisz LG, Rodan GA. Embryology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM. *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. 3rd ed. New York: Academic Press; 1998. p.1-22.
109. Raynal C, Delmas PD, Chenu C. Bone sialoprotein stimulates *in vitro* bone resorption. *Endocrinology* 1996;137:2347-54.
110. Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest* 2000;106:1203-4.
111. Roach HI, Clarke NMP. "Cell paralysis" as an intermediate stage in the programmed cell death of epiphyseal chondrocytes during development. *J Bone Miner Res* 1999;14:1367-78.
112. Rogers A, Saleh G, Hannon RA, Greenfield D, Eastell R. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4470-5.
113. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999;27:1229-41.
114. Sakai H, Kobayashi Y, Sakai E, Shibata M, Kato Y. Cell adhesion is a prerequisite for osteoclast survival. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270:550-6.
115. Salo J, Metsikkö K, PaloKangas H, Lehenkari P, Väänänen HK. Bone-resorbing osteoclasts reveal a dynamic division of basal plasma membrane into two

- different domains. J Cell Sci 1996;109:301-7.
116. Savil J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature 2000;407:784-8.
 117. Schroeder HE. Development and structure of the dental attachment apparatus. In: Schroeder HE, editor. Oral structural biology. 4th ed. New York: Thieme; 1991. p.187-293.
 118. Scott BL. The occurrence of specific cytoplasmic granules in the osteoclast. J Ultrastruct Res 1967;19:417-31.
 119. Silberberg M, Silberberg R. Further investigations concerning the influence of estrogen on skeletal tissues. Am J Anat 1941;69:295-331.
 120. Silvestrini G, Mocetti P, Ballanti P, Di Grezia R, Bonucci E. *In vivo* incidence of apoptosis evaluated with the TdT FragEL™ DNA fragmentation detection kit in cartilage and bone cells of the rat tibia. Tissue Cell 1998;30:627-33.
 121. Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, Mocetti P, Di Grezia R, Wedard BM, et al. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone. Bone 2000;26:33-42.
 122. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 1997;89:309-19.
 123. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. Cell 1994;76:959-62.
 124. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontol 2000 2000;24:99-126.
 125. Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci SC, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. Biol Chem 2001;276:8836-40.

126. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:49-60.
127. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-9.
128. Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodont Res* 2002;37:161-5.
129. Taniwaki NN, Katchburian E. Ultrastructural and lanthanum tracer examination of rapidly resorbing rat alveolar bone suggests that osteoclasts internalize dying bone cells. *Cell Tissue Res* 1998;293:173-76.
130. Tapp E. The effects of hormones on bone in growing rats. *J Bone Joint Surg Br* 1966;48:526-31.
131. Ten Cate AR, Mills C, Solomon G. The development of the periodontium. A transplantation and autoradiographic study. *Anat Rec* 1970;170:365-80.
132. Ten Cate AR, Mills C. The development of the periodontium: the origin of alveolar bone. *Anat Rec* 1971;173:69-78.
133. Ten Cate AR. Osso. In: Ten Cate AR, editor. *Histologia Bucal. Desenvolvimento, estrutura e função*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.101-22.
134. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981;26:99-105.
135. Toescu EC. Apoptosis and cell death in neuronal cells: where does Ca²⁺ fit in cell? *Cell Calcium* 1998;24:387-403.
136. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3128-35.
137. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in

- control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 1998;13:1243-50.
138. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.
 139. Torres C, Munell F, Roig M, Reventós J, Macaya A. Naturally occurring cell death during postnatal development of rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2002;26:777-83.
 140. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000;113:377-81.
 141. Väänänen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption – rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:959-71.
 142. Vavidovitch Z. Bone metabolism associated with tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Periodontol* 1979;50:22-9.
 143. Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec.* 1980;196:191-200.
 144. Walker DG. Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science* 1975;190:784-5.
 145. Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med* 2000;108:153-64.
 146. Woo KM, Kim HM, Ko JS. Macrophage colony-stimulating factor promotes the survival of osteoclast precursors by up-regulating Bcl-X_L. *Exp Mol Med* 2002;34:340-6.
 147. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992;32:160-7.
 148. Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of Fas *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 2003;144:5545-55.
 149. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Ver*

Cytol 1980;68:251-306.

150. Wyllie AH. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 1987;153:313-6.
151. Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:709-720.
152. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and cbfa1. *Endocrin Rev* 2000;21:393-411.
153. Yang CR, Wang JH, Hsieh SL, Wang SM, Hsu TL, Lin WW. Decoy receptor 3 (DcR3) induces osteoclast formation from monocyte/macrophage lineage precursor cells. *Cell Death Differ* 2004;11:97-107.
154. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okumura H, et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990;345:442-44.
155. Young RW. Nucleic acids, protein synthesis and bone. *Clin Orthop Relat Res*. 1963;26:147-60.
156. Zecchi-Orlandini S, Formigli L, Tani A, Benvenuti S, Fiorelli G, Papucci L, et al. 17 β -estradiol induces apoptosis in preosteoclastic FGL 29.1 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:680-5.
157. Zhang, X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved bone repair. *J Clin Invest* 2002;109:1405-15.

9.1 Artigo enviado para publicação

**APOPTOSIS MAY BE RESPONSIBLE FOR THE DECREASED NUMBER OF
ALVEOLAR BONE OSTEOCLASTS IN ESTROGEN TREATED RATS**

Faloni APS¹, Sasso-Cerri E², Katchburian E¹, Cerri PS²

¹Department of Morphology, School of Medicine – Federal University of São Paulo (UNIFESP/EPM), São Paulo, SP, Brazil.

²Department of Morphology, Dental School – São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

Running Title: Estrogen and alveolar bone osteoclasts apoptosis

Key words: alveolar bone, osteoclast, estradiol, programmed cell death

Address for all correspondence:

Dr. Paulo Sérgio Cerri

Department of Morphology

Dental School – São Paulo State University – UNESP

Rua Humaitá, 1680 – Centro – CEP 14801-903

Araraquara, SP – Brazil

Phone: +55 16 3301 6497/FAX:+55 16 3301 6433

e-mail: pcerri@foar.unesp.br

ABSTRACT

Bone is a mineralized tissue which is under the influence of several systemic, local and environmental factors. Among systemic factors, estrogen is a hormone well known for its inhibitory function on bone resorption. Since alveolar bone of young rats undergoes continuous and intense remodeling to accommodate the growing and erupting tooth, it is a suitable *in vivo* model to study the possible estrogen action on bone. Thus, in an attempt to investigate the possibility that estrogen may induce death of osteoclasts, we have examined the alveolar bone of estrogen treated rats. Fifteen 22-day-old female rats were divided into Estrogen (EG), Sham (SG) and Control (CG) groups. EG received estrogen and SG received corn oil used as dilution vehicle. After 8 days, fragments containing alveolar bone were removed and processed for light microscopy and transmission electron microscopy. Sections were stained in hematoxylin/eosin (HE) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP - an osteoclast marker). Quantitative analysis of the number of TRAP-positive osteoclasts/mm of bone surface was carried out. For detection of apoptosis, sections were submitted to the Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) method; TUNEL/TRAP methods combined were also used. The number of TRAP-positive osteoclasts/mm of bone surface was significantly reduced in EG compared to CG and SG. TRAP-positive osteoclasts exhibiting TUNEL-positive nuclei were observed. In addition, the ultrastructural images revealed shrunken osteoclasts exhibiting nuclei with conspicuous and tortuous masses of condensed chromatin, typical of apoptosis. Our results reinforce the idea that the estrogen inhibits bone resorption by promoting reduction in the number of osteoclasts, indicating therefore, that this reduction may be, at least in part, a consequence of osteoclast apoptosis.

INTRODUCTION

Bone is a mineralized tissue that undergoes continuous remodeling by the combined action of osteoclasts, osteoblasts and osteocytes (1) which together are under the influence of several systemic, local and environmental factors (2). These factors regulate proliferation, differentiation, function and survival of bone cells (3). Among systemic factors, estrogen is a hormone well known for its inhibitory function on bone resorption (4-6). More recently, it has been shown that estrogen depletion promotes intense resorptive activity in the alveolar bone of rats (7,8). In the tibia of estrogen treated rats, a decrease in the number of osteoclasts was shown, and osteoclast disintegration (6) or death was suggested (9). However, the mechanism by which estrogen acts upon skeletal tissues remains far from understood (10).

Some systemic and local factors are capable of switching on the chain of molecular events leading to programmed cell death (apoptosis) of bone cells (11-14). Therefore, apoptosis may contribute to the homeostatic regulation of bone (15).

The chances of observing images of the extremely rapid events of apoptosis are rare; apoptosis of osteoclasts has not been observed *in vivo*, *i.e.* under physiological conditions (16,17). The alveolar bone of young rats undergoes continuous and intense remodeling to accommodate the growing and erupting tooth (18) and it is, therefore, a suitable *in vivo* model to study the possible estrogen action on bone.

Thus, in an attempt to investigate the possibility that estrogen may induce death of osteoclasts, we have examined the alveolar bone of estrogen treated young rats using quantitative analysis of TRAP-positive osteoclasts on the bone surface. In addition to HE-stained sections, the TUNEL method, TUNEL and TRAP combined methods, and transmission electron microscopy were used to detect apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Principles of laboratory animal care (NIH publication 85-23, 1985) and national laws on animal use were observed in the present study, which was authorized by Ethical Committee for Animal Research of the São Paulo State University, Brazil (Araraquara Dental School-UNESP).

Fifteen 22 day-old female Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*) from the São Paulo State University animal house were divided in Estrogen (EG), Sham (SG) and Control (CG) groups. Rats from EG received estrogen (estradiol hexahydrobenzoate - Benzoginoestril ap® - Hoechst Marion Roussel - São Paulo, Brazil) diluted in corn oil. The animals received daily intramuscular injection of 0.125mg/100g body weight [based on Silberberg, Silberberg (19) and Chow et al (20)], during 7 days. The rats of the SG received the same dose of the corn oil used to dilute the estrogen. Twenty-four hours after the last injection, the rats from SG and EG were sacrificed. In the CG, the rats did not receive any treatment.

The rats were sacrificed with chloral hydrate (600mg/Kg) and fragments of the maxilla containing alveolar bone surrounding the upper molars were removed and immediately immersed in the fixative solution.

Light Microscopy

The specimens containing alveolar bone were fixed in 4% formaldehyde (freshly derived from paraformaldehyde) buffered at pH 7.2 with 0.1 M sodium phosphate at room temperature for 48 h. After decalcification for 40 days in 7% disodium ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) solution containing 0.5% formaldehyde, in sodium phosphate 0.1 M, at pH 7.2, the specimens were dehydrated in graded concentrations of ethanol and embedded in paraffin. Sections 6 µm thick were stained by hematoxylin and eosin (HE), submitted to TUNEL method, TRAP reaction and TUNEL/TRAP combined methods.

- TUNEL method

For detection of DNA breaks, we used the TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) method (21). The kit Apop-Tag® Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection (Chemicon Internacional, USA) was used, as previously described (22).

Deparaffinized sections adhered to silanized (3-aminopropyltrithoxysilane – Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) slices were washed in phosphate-buffered saline (PBS - 50 mM sodium phosphate and 200 mM NaCl, at pH 7.2) and treated with 20

µg/ml proteinase K (Oncor-Protein Digesting Enzyme) in PBS, at room temperature. The sections were subsequently treated with 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase and immersed in a equilibration buffer. The reaction was followed by incubation in solution containing Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) in a humid chamber at 37 °C for 1 h. The sections were immersed in the stop/wash solution and were then incubated in the anti-digoxigenin-peroxidase. After washings in PBS, they were treated with 0.06% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) in PBS and then were counterstained with Carazzi's hematoxylin. Sections of mammary gland provided by the manufacturer of the Kit were used as positive controls for the TUNEL method. Negative controls were incubated in a solution TdT enzyme-free.

- *Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)*

TRAP method was used as an osteoclast marker (23). Deparaffinized sections were incubated in a solution prepared by dissolving 8 mg of naphtol AS-BI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in 500 µl of N-N-dimethylformamide followed by addition of 50 ml of 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0) and 70 mg Fast Red Salt TR (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Sodium tartrate dihydrate 50 mM was added to the solution. After incubation at 37 °C, the sections were washed in distilled water and stained with hematoxylin. As control of specificity for TRAP-activity, some sections were incubated in substrate-free medium. For the simultaneous demonstration of apoptosis and TRAP-activity, some sections were submitted to the TUNEL method and followed by TRAP reaction (24).

The HE stained sections and the sections submitted to TRAP reaction, TUNEL method and TUNEL/TRAP combined methods were examined and photographed in a light microscope Olympus BX-50.

Number of Osteoclasts on the Alveolar Bone Surface

Quantitative analysis of TRAP-positive osteoclasts/mm of linear surface of the alveolar bone around the first molar was carried out in EG, SG and CG. For this

purpose, four sections of the first molar from each animal were used. The least distance between the sections was 60 μm .

The surface of the alveolar bone was measured using an image analysis system (Quantimet 500IW - Leica Qwin). Subsequently, the multinucleated TRAP-positive osteoclasts on the alveolar bone surface were counted on a light microscope (Carl Zeiss, Inc., Germany) at x500.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using software Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA). The data were submitted to multiple comparisons using non-parametric Kruskal-Wallis test. The significance level accepted was $p \leq 0.05$.

Transmission Electron Microscopy

Specimens containing alveolar bone of the first molar were fixed in a mixture of 4% of glutaraldehyde and formaldehyde (freshly derived from paraformaldehyde) buffered at pH 7.2 with 0.1 M sodium cacodylate at room temperature. After decalcification in a 7% solution of EDTA containing 0.5% formaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, at pH 7.2, the specimens were washed in 0.1 M sodium cacodylate at pH 7.2. They were then transferred to 0.1 M sodium cacodylate buffered 1% osmium tetroxide for 1 h at room temperature. Subsequently the specimens were washed in distilled water and treated with aqueous 2% uranyl acetate for 2 h. The specimens were dehydrated in graded concentrations of ethanol, treated with propylene oxide and then embedded in Araldite.

Semithin sections were stained with 1% toluidine blue and examined in a light microscope. Suitable regions were carefully selected for trimming of the blocks. Ultrathin sections from selected regions were collected on grids and stained in alcoholic 1% uranyl acetate and in lead citrate solution prior to examination in a Philips CM 200 transmission electron microscope.

RESULTS

The alveolar bone from the upper first molar of 29-day-old rats exhibited several TRAP-positive osteoclasts, typical of bone undergoing rapid remodeling/turnover (Fig. 1). Numerous multinucleated osteoclasts exhibiting conspicuous TRAP-positive activity in their cytoplasm (red staining) were often observed apposed to resorption bone surfaces in Control (CG) and Sham (SG) groups (Fig. 2A). On the other hand, only a few TRAP-positive osteoclasts were found on the alveolar bone surfaces of estrogen treated rats (EG) (Fig. 2B). The quantitative analysis revealed significant reduction ($p \leq 0.05$) in the number of TRAP-positive osteoclasts/mm of linear surface of the alveolar bone in EG compared to CG and SG. No difference was observed between CG and SG (Table 1).

HE-stained sections of alveolar bone from EG revealed large giant cells exhibiting round/ovoid bodies in their interior. Frequently, dense round/ovoid bodies containing basophilic masses were in close juxtaposition to these giant cells. Several smaller structures were observed surrounding the giant cell (Fig. 3A). When the TRAP method was applied, osteoclasts with conspicuous cytoplasmic activity (red staining) exhibited nuclei strongly stained by hematoxylin, typical of condensed chromatin (Fig. 3B). The TUNEL method showed that osteoclasts apposed to resorption surfaces of alveolar bone of the EG exhibited, occasionally, brown-yellow nuclei, characteristic of TUNEL-positivity (Fig. 3C). The TUNEL method combined to the TRAP reaction, in the same section, revealed that red stained osteoclasts exhibited brown-yellow TUNEL-positive nuclei (Figs. 3D and 3E). Portions of TRAP-positive osteoclasts apposed to bone surfaces exhibited nucleus strongly TUNEL-positive (Fig. 3D). TRAP-positive osteoclasts with apparent intact nuclei were also observed on the alveolar bone of the EG. Sometimes, these osteoclasts showed round/ovoid bodies with irregular masses of condensed chromatin inside large vacuoles in their TRAP-positive cytoplasm (Fig. 3F). The osteoclasts exhibiting condensed chromatin and/or TUNEL-positive nuclei were not present in all sections examined in the alveolar bone of the EG.

Controls for the TUNEL method using involuting mammary gland sections revealed positive structures. Sections incubated in medium lacking TdT enzyme were

negative. No reaction product for TRAP-activity was observed when incubated in substrate-free medium (data not shown).

Ultrastructural examination of the alveolar bone from EG revealed osteoclasts with grossly changed ultrastructure (Fig. 4A) intermingled with normal osteoclasts (Fig. 4B). These altered osteoclasts showed irregular shaped nuclei with conspicuous and tortuous masses of condensed chromatin. In addition, these cells exhibited shrunken and convoluted cytoplasm containing numerous vesicles and vacuoles which occupied most of the cytoplasm. Images of organelles, such as mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi elements were rarely observed between vesicles and vacuoles. Moreover, the ruffled border and clear zone were not observed in these osteoclasts (Fig. 4A).

DISCUSSION

Our quantitative results showed a marked decrease in the number of alveolar bone osteoclasts (TRAP-positive) in estrogen treated rats (EG), when compared to control (CG) and sham treated (SG) groups. The mechanisms involved in the reduction of osteoclast numbers is not yet understood but it may either be due to estrogen induced cell death (9, 25) or by interference of estrogen on the mechanism of osteoclast formation (26-28).

Our morphological results, *i.e.* HE staining, TRAP reaction, TUNEL method and TUNEL/TRAP combined methods strongly suggest that alveolar bone osteoclasts undergo cell death in EG, hence the decrease in numbers observed. HE and TRAP stained sections of estrogen treated rats revealed shrunken osteoclasts exhibiting condensed chromatin. These osteoclasts were occasionally surrounded by small round/ovoid structures containing dense material, similar to apoptotic bodies as also previously described (17, 29-31). Furthermore, TRAP-positive osteoclasts also exhibited TUNEL-positivity. The TUNEL and TRAP methods in the same section (24) allowed simultaneous demonstration of DNA breaks (21) and tartrate-resistant acid phosphatase, a characteristic marker of osteoclasts (23). DNA breaks constitute part of the cascade of molecular events observed during apoptosis (32, 33). However, it should be noted that the TUNEL method alone is not specific for apoptosis (34). Although

several markers for apoptosis are available, it is generally accepted that ultrastructural images are most relevant for the identification of classical apoptosis (31, 35). It must also be taken into account that osteocytes (36) and apoptotic bone cells (17, 24, 37) are engulfed by osteoclasts during bone resorption. So, it is important to note that some bodies found in osteoclasts may be apoptotic osteoblasts/osteocytes internalized by osteoclasts. These internalized bodies may be distinguished from apoptotic osteoclast nuclei because they usually possess a clear halo around them.

Our ultrastructural images revealed that some osteoclasts apposed to bone surface of the EG exhibited conspicuous and tortuous masses of condensed chromatin within their nuclei. These nuclei are typical of dying cells that may be undergoing apoptosis (17, 22, 29, 31). However, the cytoplasm of osteoclasts, unlike that observed in mononuclear apoptotic cells (22, 29), it was packed with vesicles and vacuoles and was poor in mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi elements. Moreover, osteoclasts did not exhibit a ruffled border and a clear zone. Absence of both structures were also observed in apoptotic osteoclasts of rats treated with bisphosphonate (38, 39) and it may be due to degradation of cytoskeleton proteins, which occurs during the proteolytic cascade of apoptosis (33, 40).

Although some features observed were characteristic of cell death by apoptosis, the presence of numerous vesicles and vacuoles in the cytoplasm of osteoclasts in EG differs from classical apoptosis. Moreover, dying osteoclasts exhibited few organelles differing from classical apoptosis of mononucleated cells in which organelles remain intact (29, 30). It is important to mention the possibility that the presence of numerous vesicles and vacuoles in dying osteoclasts may be due to the extremely convoluted surface of the osteoclast. Thus, in ultrathin sections, these vesicles and vacuoles may represent cross and oblique sections of the convoluted surface and/or the ruffled border membrane which may have been internalized.

Taken together, our results indicate that osteoclasts undergo a process of apoptosis which differ in some aspects from classical apoptosis (41). Cell death of chondrocytes also seems to differ from classical apoptosis (42).

Although apoptotic bodies adjacent to bone surface were observed, we were unable to discern images of apoptotic bodies arising from osteoclasts or from other

dying cells. Apoptotic bodies located next to bone and next to dying osteoclasts do not differ from apoptotic structures derived from mononucleated cells (17, 22, 29, 31). In addition, as apoptosis is extremely rapid, it is not possible to exclude that neighboring cells, as fibroblasts, osteoblasts or other osteoclasts may have engulfed apoptotic bodies deriving from apoptotic osteoclasts. In most other tissues, apoptotic bodies are removed by the combined action of neighboring, same-type cells and macrophages (43, 44).

Since the majority of studies involving osteoclasts death was done *in vitro* (25, 45) and/or were restricted to light microscopy (9, 46), we believe that our results show, for the first time, *in vivo* ultrastructural images of dying alveolar bone osteoclasts in estrogen treated rats. Absence of images of dying osteoclasts in CG and SG agrees with other authors (16, 17). In the EG, it was difficult to find dying osteoclasts and there was no observable pattern in the distribution of these dying cells through the alveolar bone surface. Thus, dying osteoclasts coexisted with normal osteoclasts. However, we have no explanation for the fact that some osteoclasts were affected by estrogen and others not.

Estrogen exerts inhibitory action on bone resorption, therefore, it is used for prevention and treatment of osteoporosis. However, the cellular and molecular mechanisms of estrogen action on bone remain unclear. It has been suggested that estrogen promotes downregulation of osteoclast formation, activity and survival (3). Estrogen action on osteoclasts may be mediated by T cells (27), monocytes and osteoblasts (26), as well as occur directly on osteoclasts via estrogen receptor (47, 48). There is evidence that estrogen inhibits production of cytokines such as IL-1 (interleukin-1), TNF (tumor necrosis factor), IL-6, M-CSF (macrophage colony stimulating factor) (26) and RANK-L (Receptor activator of NF- κ B Ligand) (28). Since some of these cytokines stimulate activity and survival of osteoclasts, it has been suggested that estrogen decreases bone resorption, via action of cytokines, by reducing the number of osteoclasts. Our results reinforce the idea that the estrogen inhibits bone resorption by promoting reduction in the number of osteoclasts, indicating therefore that this reduction may be, at least in part, a consequence of osteoclasts apoptosis. However, we can not

exclude the possibility that this reduction may also be associated to the inhibitory activity of estrogen on osteoclast formation (26-28).

Our quantitative results, when combined with TUNEL/TRAP methods and transmission electron microscopy support the interpretation that estrogen promotes - directly and/or indirectly - apoptosis of alveolar bone osteoclasts. However, further studies are required to clarify the underlying molecular events involved.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Prof. Dr. João Aristeu da Rosa for allows us to use the image analysis system. We would also like to thank Mr. Luis Antônio Potenza and Mr. Pedro Sérgio Simões for technical support and Dr. Yves Maniette for his assistance with the transmission electron microscope. This research was supported by CAPES, CNPq, FADA, FUNDUNESP (293/03) and FAPESP (04/09898-0) – Brazil.

REFERENCES

1. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; **15**: 49-60.
2. Raisz LG, Rodan GA. Embryology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM, eds. *Metabolic bone disease and clinically related disorders*. New York: Academic Press, 1998: 1-22.
3. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; **21**: 115-137.
4. Bernick S, Ershoff BH. Histochemical study of bone in estrogen-treated rats. *J Dent Res* 1963; **42**: 981-989.
5. Tapp E. The effects of hormones on bone in growing rats. *J Bone Joint Surg Br* 1966; **48**: 526-531.
6. Liu CC, Howard GA. Bone-cell changes in estrogen-induced bone-mass, increase in mice: dissociation of osteoclasts from bone surfaces. *Anat Rec* 1991; **229**: 240-250.
7. Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodont Res* 2002; **37**: 161-165.
8. Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr. FH. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res* 2004; **39**: 107-110.
9. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat Med* 1996; **2**: 1132-135.
10. Rogers A, Saleh G, Hannon RA, Greenfield D, Eastell R. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 4470-4475.
11. Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblasts survival and apoptosis. *Endocrinology* 1997; **138**: 3849-3858.

12. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 3128-3135.
13. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 1243-1250.
14. Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **328**: 709-720.
15. Hughes DE, Boyce BF. Apoptosis in bone physiology and disease. *J Clin Pathol* 1997; **50**: 132-137.
16. Jilka RL, Takahashi K, Munshi M, Williams DC, Roberson PK, Manolagas SC. Loss of estrogen upregulates osteoblastogenesis in the murine bone marrow. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1942-1950.
17. Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue Cell* 2001; **33**: 318-325.
18. Marks SC, Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts. *Anat Rec* 1996; **245**: 374-393.
19. Silberberg M, Silberberg R. Further investigations concerning the influence of estrogen on skeletal tissues. *Am J Anat* 1941; **69**: 295-331.
20. Chow JWM, Lean JM, Chambers TJ. 17 β -estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology* 1992; **130**: 3025-3032.
21. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; **119**: 493-501.
22. Cerri PS, Freymüller E, Katchburian E. Apoptosis in the early developing periodontium of rat molars. *Anat Rec* 2000; **258**: 136-144.
23. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982; **34**: 285-290
24. Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Period Res* 2003; **38**: 223-226.

25. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 1997; **186**: 489-495.
26. Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996; **11**: 1043-1048.
27. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J Clin Invest* 2000; **106**: 1229-1237.
28. Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci SC, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *Biol Chem* 2001; **276**: 8836-8840.
29. Kerr JFR, Wyllie, AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; **26**: 239-257.
30. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Ver Cytol* 1980; **68**: 251-306.
31. Cerri PS, Katchburian E. Apoptosis in the epithelial cells of the rests of Malassez of the periodontium of rat molars. *J Periodont Res* 2005; **40**: 365-72.
32. Cohen JJ. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **103**: 548-54.
33. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; **116**: 205-19.
34. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann. *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; **21**: 1465-1468.
35. Torres C, Munell F, Roig M, Reventós J, Macaya A. Naturally occurring cell death during postnatal development of rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2002; **26**: 777-783.
36. Elmardi AS, Katchburian MV, Katchburian E. Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1990; **46**: 239-245.

37. Taniwaki NN, Katchburian E. Ultrastructural and lanthanum tracer examination of rapidly resorbing rat alveolar bone suggests that osteoclasts internalize dying bone cells. *Cell Tissue Res* 1998; **293**: 173-176.
38. Ito M, Amizuka N, Nakajima T, Ozawa H. Ultrastructural and cytochemical studies on cell death of osteoclasts induced by bisphosphonate treatment. *Bone* 1999; **25**: 447-452.
39. Ito M, Amizuka N, Nakajima T, Ozawa H. Bisphosphonate acts on osteoclasts independent of ruffled borders in osteoclerotic (oc/oc) mice. *Bone* 2001; **28**: 609-616.
40. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade - morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999; **200**: 1-18.
41. Clarke PGH. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embriol* 1990; **181**: 195-213
42. Roach HI, Clarke NMP. "Cell paralysis" as an intermediate stage in the programmed cell death of epiphyseal chondrocytes during development. *J Bone Miner Res* 1999; **14**: 1367-1378.
43. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998; **396**: 119-22.
44. Cerri PS. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. *Anat Rec* 2005; **286**: 833-840.
45. Kameda T, Ishikawa H, Tsutsui T. Detection and characterization of apoptosis in osteoclasts *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **207**: 753-760.
46. Noxon SJ, King G, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001; **120**: 466-476.
47. Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders P, Hoyland JA, Braidman IP. Oestrogen receptor beta *in vivo* in osteoclasts and other bone cells of adult men and women [abstract]. *J Bone Miner Res* 2000; **15**: 1217.
48. Bonnelye E, Kung V, Laplace C, Galson DL, Aubin JE. Estrogen receptor-related receptor α impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. *Endocrinology* 2002; **143**: 3658-3670.

LEGENDS

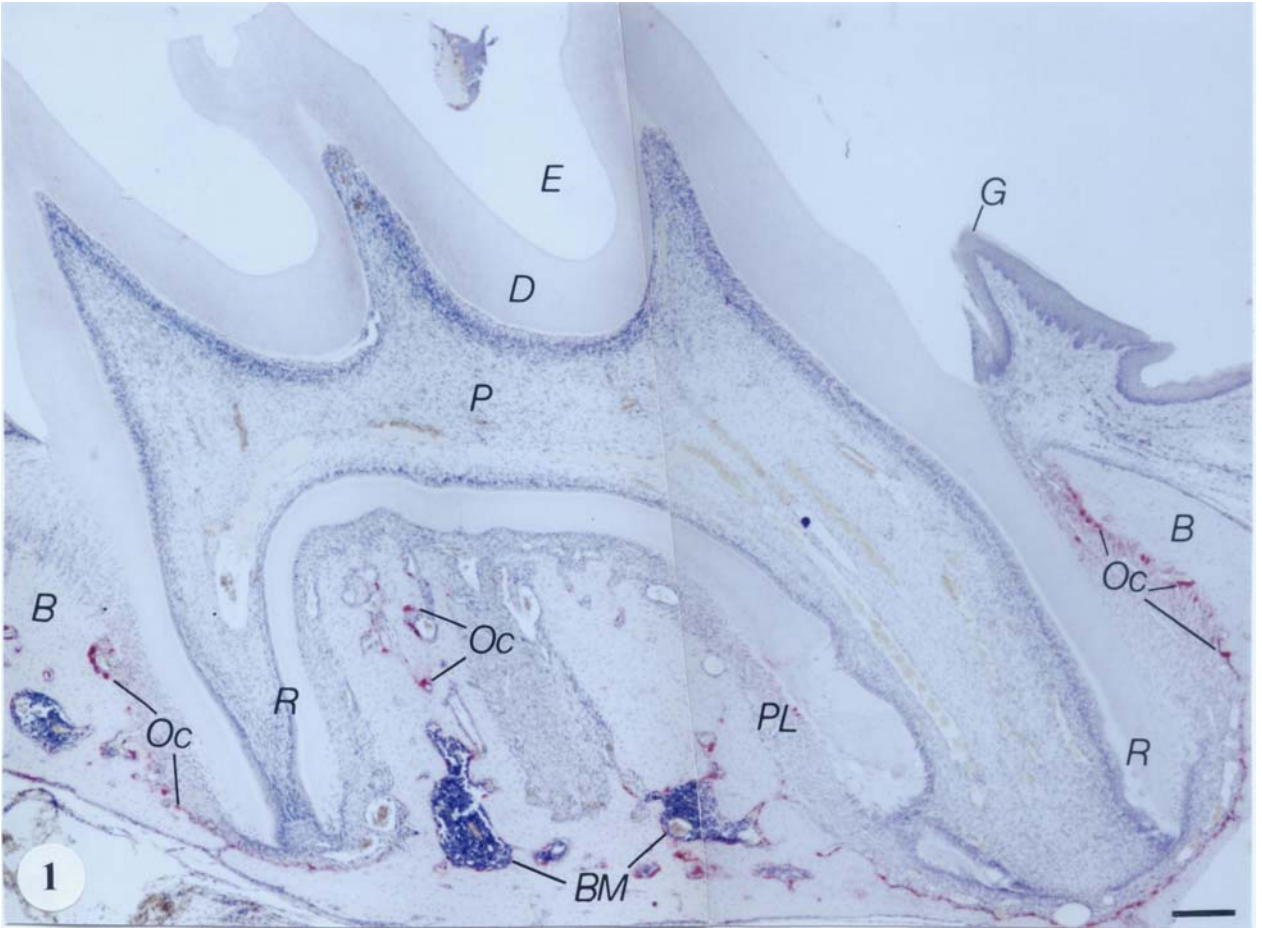
Figure 1 - Light micrograph of a sagittal section of the first upper molar of a 29-days-old control rat. The alveolar bone (B) surrounding the molar roots (R) exhibits numerous TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase)-positive osteoclasts (Oc) – red color. PL, periodontal ligament; E, enamel space; D, dentine; P, dental pulp; G, gingiva; BM, bone marrow. Counterstained with hematoxylin. Bar: 150 μ m.

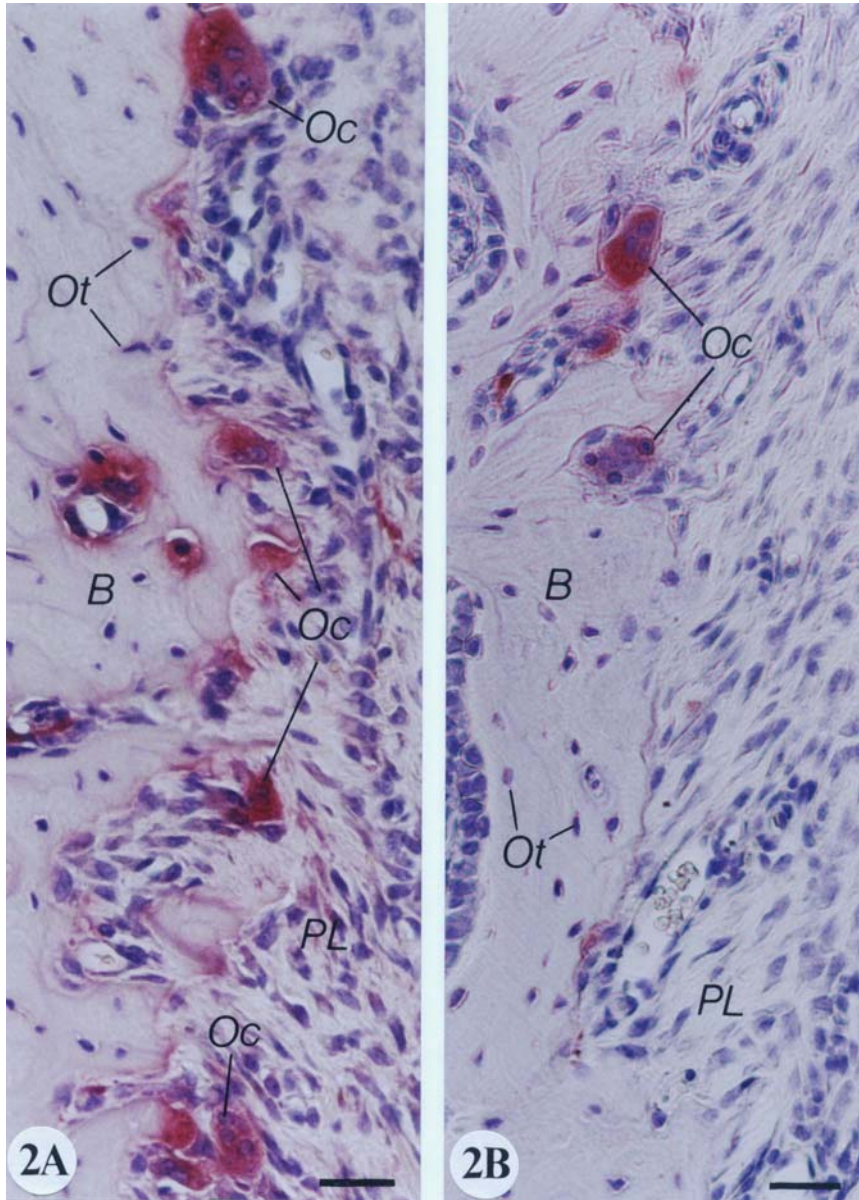
Figures 2A and 2B – Light micrographs of portions of the alveolar bone of sham (2A) and estrogen (2B) treated rats submitted to the TRAP reaction and counterstained with hematoxylin. In the **fig. 2A**, numerous TRAP-positive (red color) osteoclasts (Oc) are apposed on the alveolar bone surface (B). **Fig. 2B** shows alveolar bone (B) exhibiting only two red stained osteoclasts (Oc). Ot, osteocytes; PL, periodontal ligament. Bar: 30 μ m.

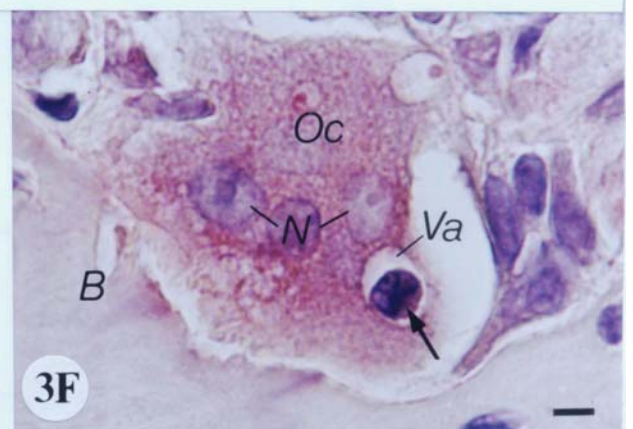
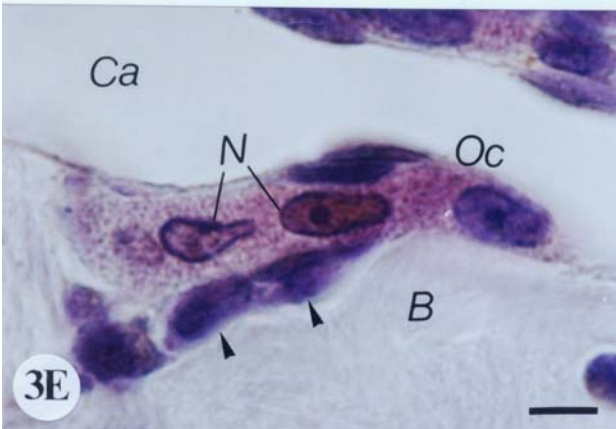
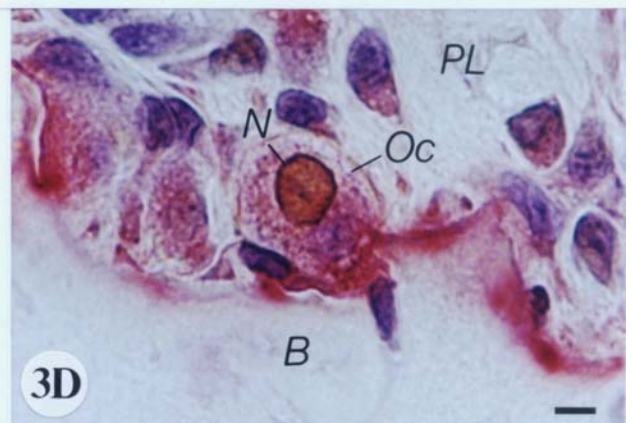
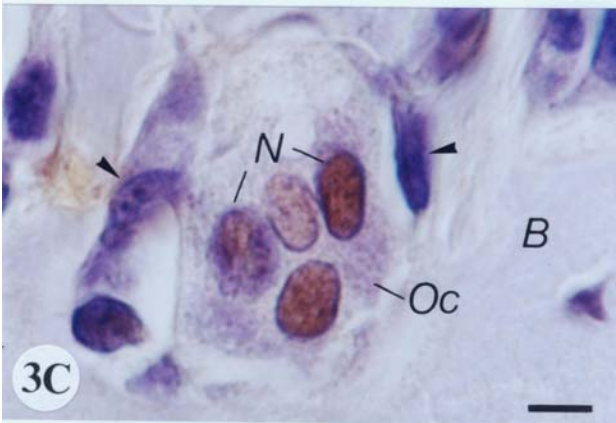
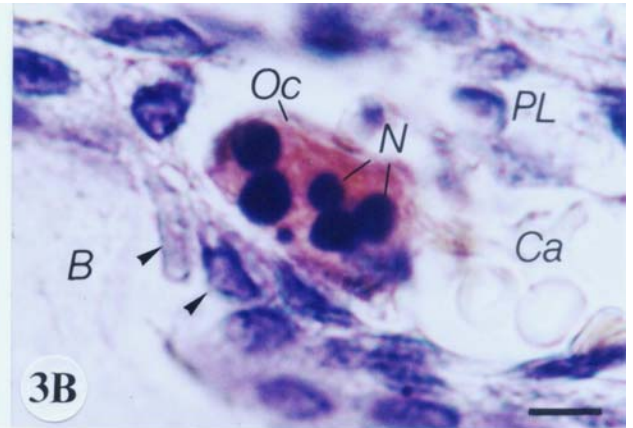
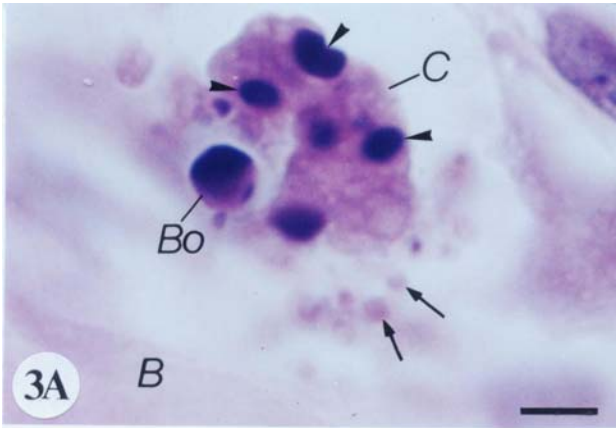
Figures 3A-3F – Light micrographs of portions of the alveolar bone of estrogen treated rats. In the **fig. 3A** a large giant cell (C), adjacent to bone surface (B), exhibits several round-ovoid dense bodies (arrowheads) in its interior. A round-ovoid body (Bo) containing basophilic masses is in close juxtaposition to giant cell. Several smaller structures (arrows) are observed surrounding the giant cell (C). HE. Bar: 5 μ m. The **fig. 3B** shows a portion of alveolar bone submitted to the TRAP reaction and counterstained with hematoxylin. A TRAP-positive osteoclast (Oc) exhibits several nuclei (N) strongly stained by hematoxylin, typical of condensed chromatin. B, bone matrix; Arrowheads, bone lining cells; PL, periodontal ligament; Ca, capillary. Bar: 6 μ m. The **fig. 3C** shows a portion of alveolar bone submitted to the TUNEL method (brown-yellow) and counterstained with hematoxylin. The osteoclast (Oc) located in an excavation of the bone surface (B) exhibits TUNEL-positivity in all nuclei (N) observed. Arrowheads, bone lining cells. Bar: 6 μ m. In the **figs. 3D and 3E**, the TUNEL method (brown-yellow) was combined with TRAP reaction (red). In **3D**, a portion of a TRAP-positive osteoclast (Oc) apposed to the bone surface (B) exhibits TUNEL-positive nucleus (N). PL, periodontal ligament. Bar: 5 μ m. In the **fig. 3E**, an elongated TRAP-positive osteoclast (Oc) shows some TUNEL-positive nuclei (N). B, bone matrix; Arrowheads, bone lining cells; Ca,

capillary. Bar: 6 μm . The **fig. 3F** shows a portion of alveolar bone submitted to the TRAP reaction and counterstained with hematoxylin. A TRAP-positive osteoclast (Oc) containing normal nuclei (N) is located in an excavation of the bone surface (B). The osteoclast (Oc) exhibits a round/ovoid body (arrow) with irregular masses of condensed chromatin inside a large vacuole (Va). Bar: 5 μm .

Figures 4A and 4B – Electron micrographs of portions of the alveolar bone of estrogen treated rats. In the **fig. 4A**, a multinucleated osteoclast (Oc) located next to bone surface (B) shows several irregularly shaped nuclei (N) exhibiting conspicuous and tortuous masses of condensed chromatin (arrows); the shrunken and convoluted cytoplasm contains numerous vesicles (Ve) and vacuoles (Va) which occupy most of the cytoplasm. Bar: 1.5 μm . In the **fig. 4B**, a typical osteoclast (Oc), exhibiting ruffled border (RB), numerous mitochondria (M), vesicles (Ve) and vacuoles (Va) of varied sizes, is located on an excavation of bone surface (B). N, nuclei. Bar: 2.5 μm .







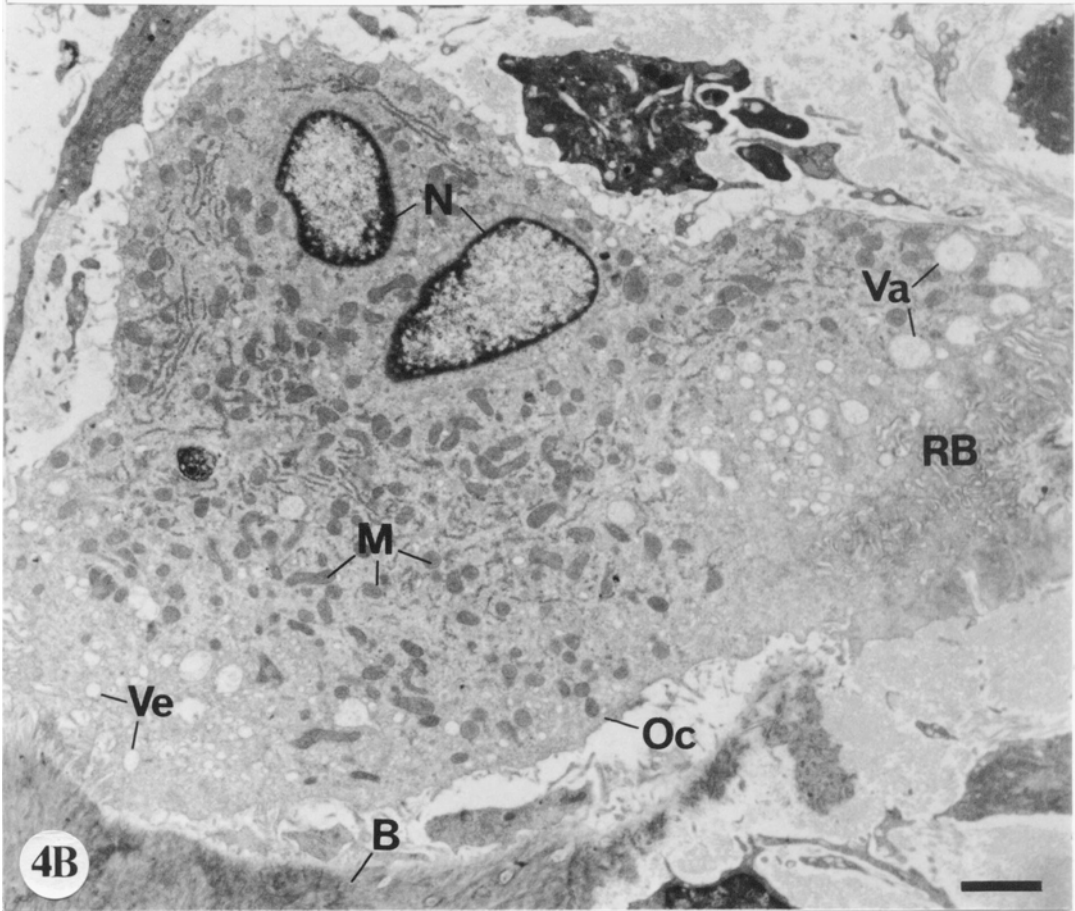
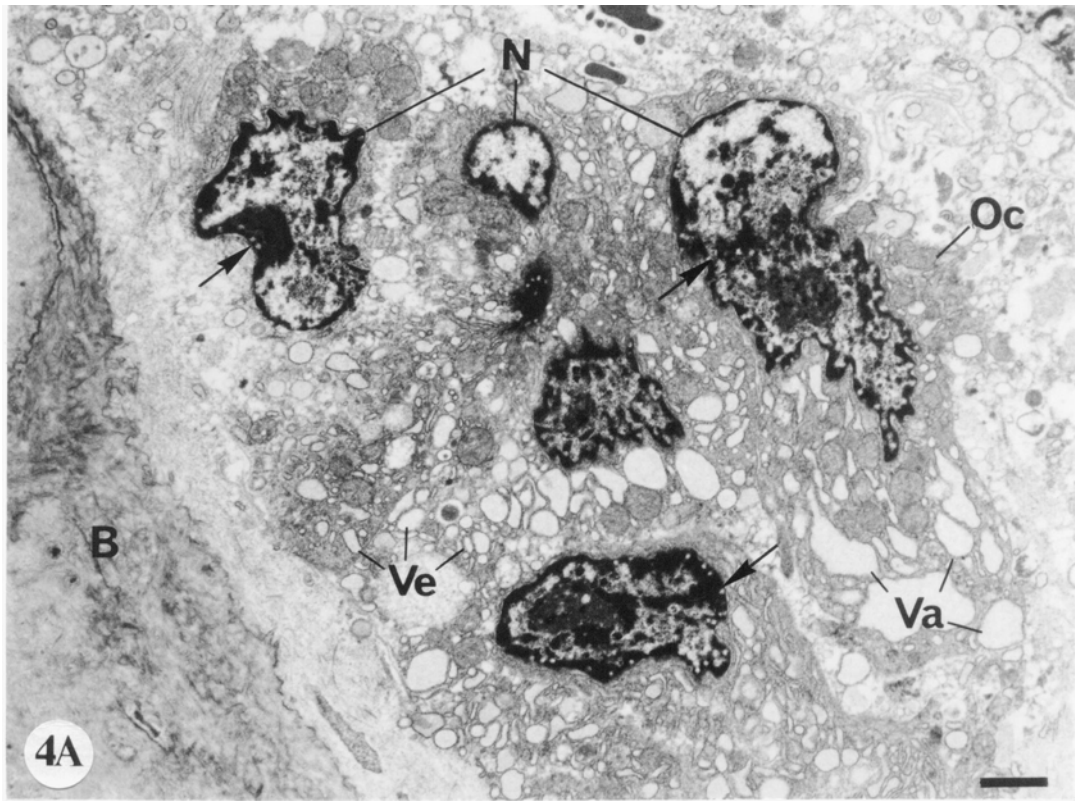


Table 1. Number of TRAP-positive osteoclasts/mm of the alveolar bone surface in the animals from Control (CG), Sham (GS) and Estrogen (EG) groups

Animals	Groups		
	CG	SG	EG [*]
1	1.72	1.76	0.81
2	1.89	1.80	0.88
3	1.91	1.85	1.03
4	1.99	2.20	1.24
5	2.62	2.33	1.27
Mean ± SD	2.05 ± 0.34	1.99 ± 0.25	1.04 ± 0.88

SD: standard deviation

* statistically significant ($p \leq 0.05$) from CG and SG

9.2 Parecer do Comitê de Ética



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 17 de março de 2004.
CEP 0098/04

Sr(a).
Pesquisador(a) ANA PAULA DE SOUZA FALONI
Disciplina/Departamento: Histologia e Biologia Estrutural/Morfologia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Apoptose em osteoclastos de osso alveolar de ratas tratadas com estrogênio".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme estabelecido pelo CEP/UNIFESP, são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Apresentar primeiro relatório parcial em **08/setembro/2004**.
3. Apresentar primeiro relatório parcial em **07/março/2005**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Resaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa"

Abstract

Introduction: Bone is a mineralized tissue which is under the influence of several systemic, local and environmental factors. Among systemic factors, estrogen is a hormone well known for its inhibitory function on bone resorption. Since alveolar bone of young rats undergoes continuous and intense remodeling to accommodate the growing and erupting tooth, it is a suitable *in vivo* model to study the possible estrogen action on bone. **Purpose:** In an attempt to investigate the possibility that estrogen may induce death of osteoclasts, we have examined the alveolar bone of estrogen treated young rats. **Methods:** Fifteen 22-day-old female rats were divided into Estrogen (EG), Sham (SG) and Control (CG) groups. Rats from EG received during 7 days, daily intramuscular injection of 0.125mg/100bw of estrogen (Benzoginoestril-ap[®]) diluted in corn oil. Rats from SG received oil used as dilution vehicle. After 8 days, fragments containing alveolar bone were removed and processed for light microscopy and transmission electron microscopy. Sections were stained with hematoxylin/eosin (HE) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was used as an osteoclast marker. Quantitative analysis of the number of TRAP-positive osteoclasts/mm of bone surface was carried out. For detection of apoptosis, sections were submitted to the TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) method; TUNEL/TRAP methods combined were also used. **Results:** The number of TRAP-positive osteoclasts/mm of bone surface was significantly reduced in EG compared to CG and SG. TRAP-positive osteoclasts exhibiting TUNEL-positive nuclei were observed in EG. In addition, the ultrastructural images revealed shrunken osteoclast exhibiting nuclei with conspicuous and tortuous masses of condensed chromatin, typical of apoptosis. **Conclusion:** Our results reinforce the idea that the estrogen inhibits bone resorption by promoting reduction in the number of osteoclasts, indicating therefore, that this reduction may be, at least in part, a consequence of osteoclast apoptosis.

Bibliografia Consultada

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª ed. rev. e atual. São Paulo: BC Gráfica e Editora Ltda; 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)