

6 RESULTADOS

6.1 Dosagem hormonal

A dosagem do teor de 17β estradiol no sangue dos animais tratados com estrógeno revelou aumento significativo da concentração plasmática do hormônio, em ambas as doses e idades, quando comparados com o grupo controle e o grupo sham. Animais do grupo controle e do grupo sham também apresentaram índices hormonais, embora com menor expressão (gráfico 1).

6.2 Análise morfológica

A análise morfológica das lâminas mostra que não há diferenças no grau de desenvolvimento do elemento dentário entre os animais dos grupos tratados com estrógeno e os animais do grupo controle dentro da mesma idade analisada (Figura 6). Comparando o grau de desenvolvimento dentário entre as diferentes idades, a análise revelou poucas alterações entre as idades de 09 e 11 dias em todos os grupos estudados.

Nos animais de 09 dias de idade, não tratados e tratados com estrógeno, o elemento dentário se apresenta em adiantado estágio de desenvolvimento, com os tecidos mineralizados, esmalte e dentina, já depositados. Ainda é possível observar uma pequena porção do retículo estrelado, principalmente entre as cúspides, além do folículo dental, uma faixa de tecido conjuntivo frouxo separando o tecido ósseo circunjacente do elemento dentário em desenvolvimento. Os ameloblastos, também ainda visíveis, apresentam-se polarizados na porção mais cervical das cúspides, indicando a deposição de esmalte, e nas demais regiões, já com tamanho reduzido, demonstrando a diminuição da atividade secretora. É possível observar uma faixa de tecido ósseo na região oclusal, sobre as cúspides que, em alguns pontos, já aparece parcialmente reabsorvida, e na região basal do elemento, que está sendo continuamente depositada (figura 6). Uma análise do tecido conjuntivo interposto entre a superfície óssea e o epitélio oral revela uma pequena espessura do conjuntivo, caracterizando sua involução durante o processo eruptivo (figura 7).

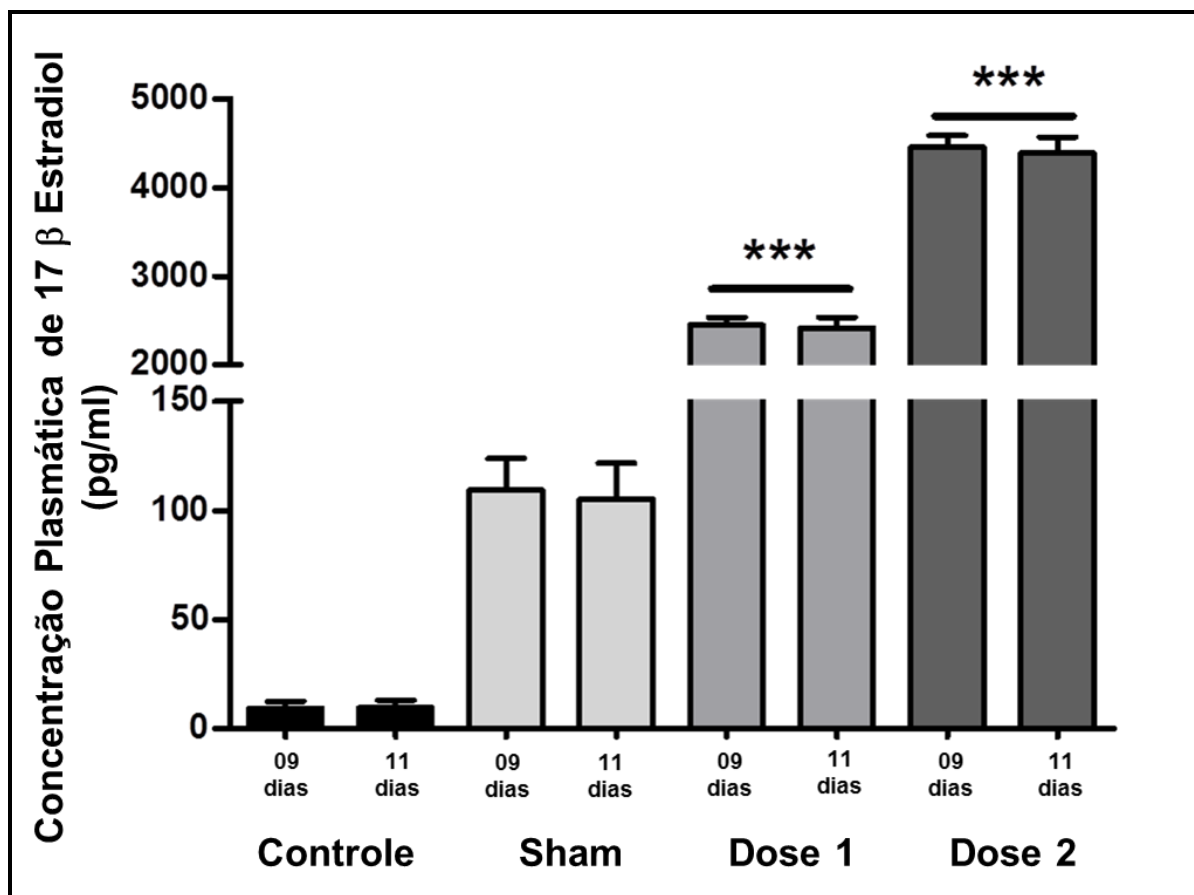


GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE 17 β ESTRADIOL NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA DOS ANIMAIS: concentração plasmática de estradiol de 9.3 ± 3.2 pg/ml para o grupo controle, 110.8 ± 14.5 pg/ml para o grupo sham, 2448.2 ± 90.6 pg/ml para o grupo tratado com estrógeno na dose de $62,5 \mu\text{g}/100\text{g}$ e 4451.0 ± 134.8 pg/ml para animais do grupo tratado com a dose de $125 \mu\text{g}/100\text{g}$ de estrógeno em animais com 09 dias de idade. Para os animais com 11 dias de idade os valores encontrados foram, respectivamente, 9.5 ± 3.5 pg/ml, 105.0 ± 16.5 pg/ml, 2414.7 ± 119.5 pg/ml, 4384.0 ± 181.6 pg/ml. *** $p < 0,05$.

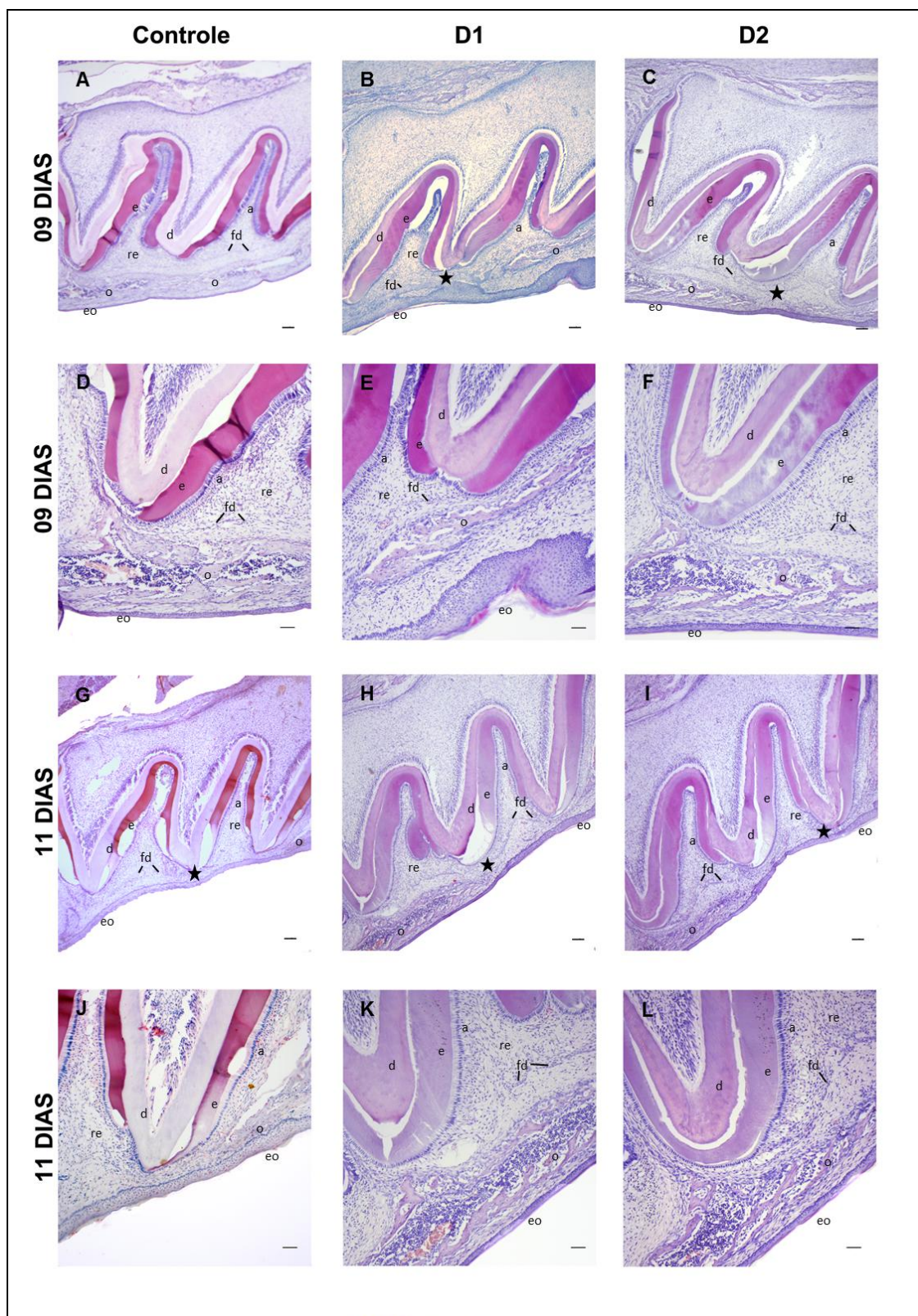


FIGURA 6 – Análise histológica da progressão do processo eruptivo. A, B, C, G, H, I: Observe o elemento dentário em adiantado estágio de desenvolvimento, ameloblastos, folículo dentário, retículo estrelado e osso, que em alguns pontos já aparece parcialmente reabsorvido (estrela). Coloração Hematoxilina e Eosina, barra de escala 100 μm . Em D, E, F, J, K, L as mesmas estruturas em maior aumento. Coloração Hematoxilina e Eosina, barra de escala 50 μm . e (esmalte); d (dentina); a (ameloblastos); fd (folículo dentário); re (retículo estrelado); o (osso); eo (epitélio oral).

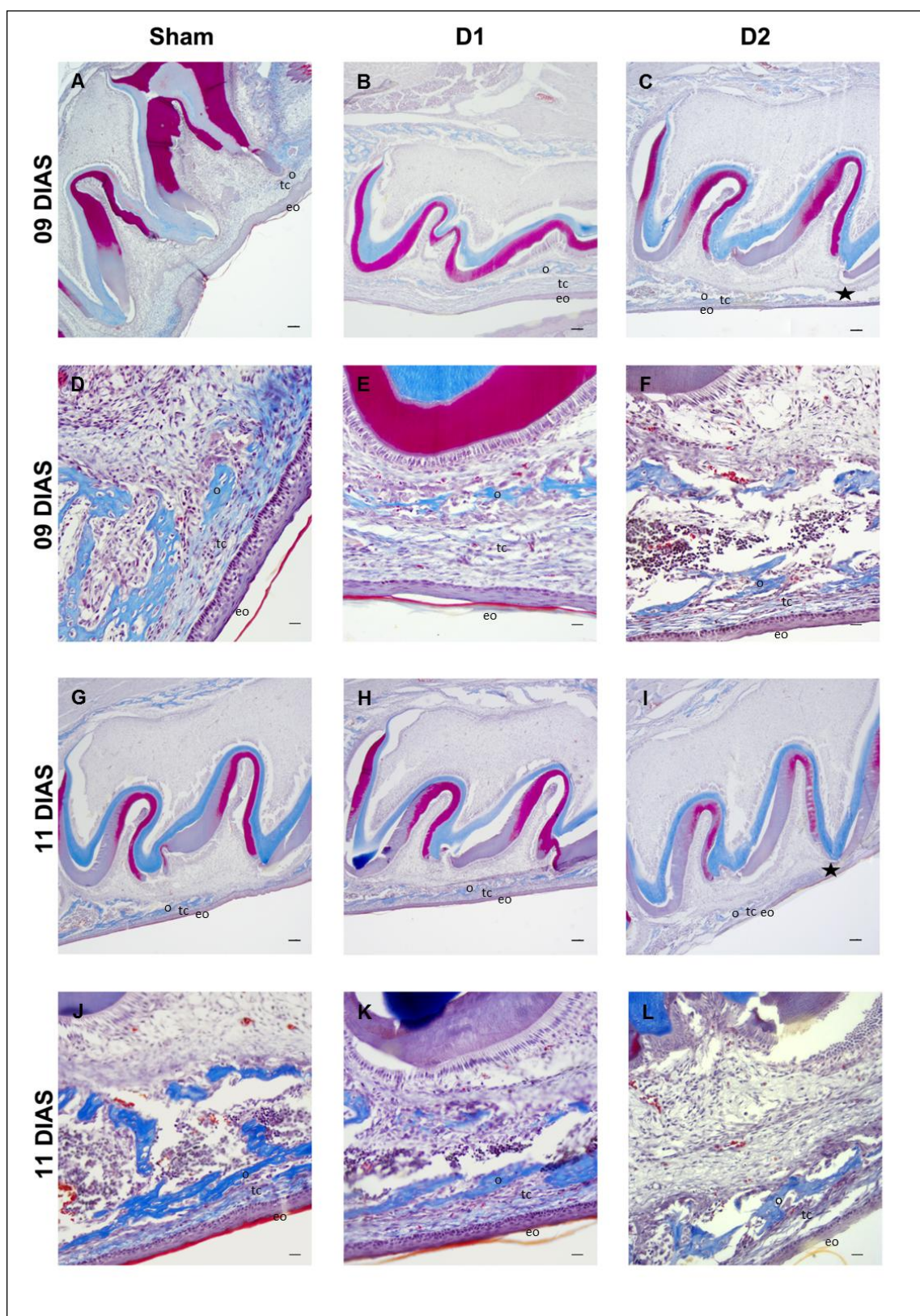


FIGURA 7 – Tecido conjuntivo interposto entre a superfície óssea e o epitélio oral. Observa-se pequena espessura do tecido conjuntivo (tc) entre a superfície óssea remanescente (o) e epitélio oral (eo). Em alguns pontos (estrela) apenas tecido conjuntivo está presente entre o elemento dentário e o epitélio oral. A, B, C, G, H, I. Coloração Tricrômio de Mallory, barra de escala 100 μm . Em D, E, F, J, K, L as mesmas estruturas em maior aumento. Coloração Tricrômio de Mallory, barra de escala 20 μm .

As características morfológicas do elemento dentário nos animais de 11 dias de idade, em ambos os grupos, permanecem praticamente inalteradas se comparadas aos animais de 09 dias de idade. O elemento dentário apresenta aspecto morfológico semelhante ao relatado anteriormente. Contudo, uma característica antes não observada é a mineralização do esmalte nas pontas de cúspides. Nessa região o esmalte apresenta-se maduro e, portanto, com alto conteúdo mineral, o que leva a sua perda durante o processamento histológico. Consequentemente, nessas regiões observa-se apenas o espaço branco, correspondente ao espaço previamente ocupado pelo esmalte (figuras 6 e 7).

6.3 Quantificação de osteoclastos

A análise histológica revelou a presença da superfície óssea remanescente interposta entre o germe dentário e a mucosa oral em todos os grupos estudados nas idades de 09 dias e 11 dias, como pode ser observado na figura 8.

Foram observados, ainda, células multinucleadas apoiadas sobre a superfície óssea, osteoclastos, em todos os grupos nas idades de 09 dias e 11 dias. Não foram observadas diferenças na morfologia celular dos osteoclastos nos diferentes grupos. Cortes corados com hematoxilina e eosina exibiram células grandes, multinucleadas e com presença de vacúolos seguindo o mesmo padrão no grupo controle, no grupo sham e nos grupos tratados com estrógeno, em ambas as doses (figura 9).

A análise quantitativa do número de osteoclastos mostrou uma aparente redução nos grupos tratados com estrógeno quando comparados com o grupo controle e o grupo sham nas idades de 09 dias (Gráfico 2) e 11 dias (Gráfico 3). Entretanto, o tratamento estatístico dos dados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney não revelou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no número de osteoclastos entre os grupos.

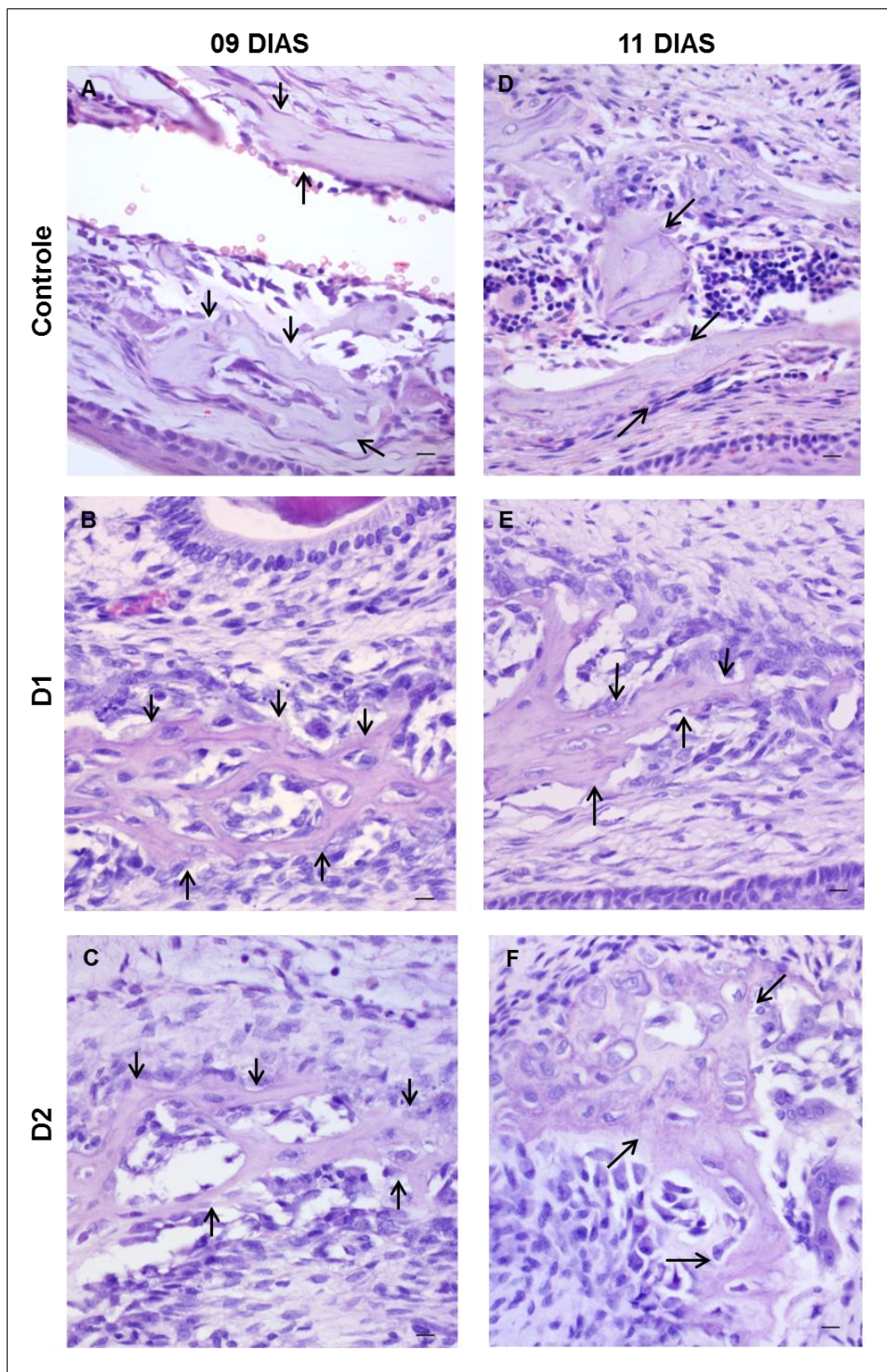


FIGURA 8 - Superfície óssea interposta entre o germe dentário e a mucosa oral. Observa-se o tecido ósseo (setas) interposto entre o germe dentário e a mucosa oral apresentando o mesmo aspecto em todos os grupos de estudo, com a presença de osteoblastos e osteoclastos apoiados sobre a superfície e osteócitos incorporados à matriz óssea. Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de escala 10 μ m.

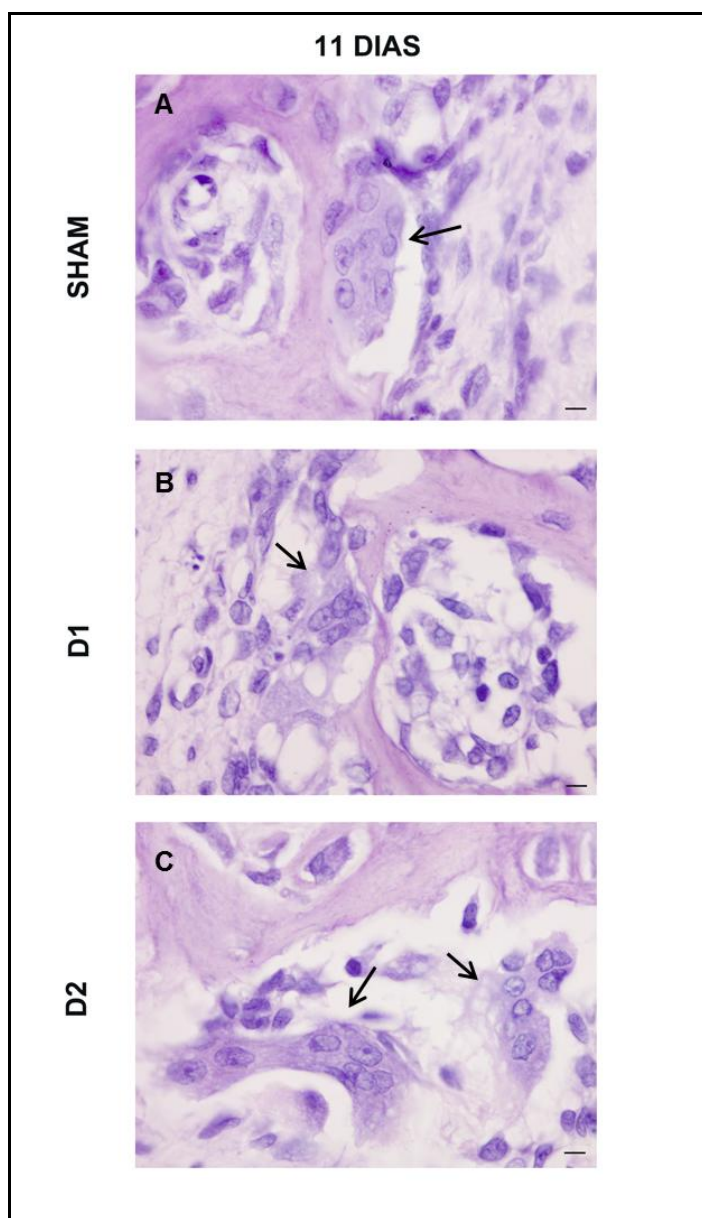


FIGURA 9 – Osteoclastos apoiados sobre a superfície óssea interposta entre o germe dentário e a mucosa oral. Observar osteoclastos (setas) do grupo sham (A) e dos grupos tratados com estrógeno (B e C). Coloração Hematoxilina e Eosina. Barra de escala 5µm.

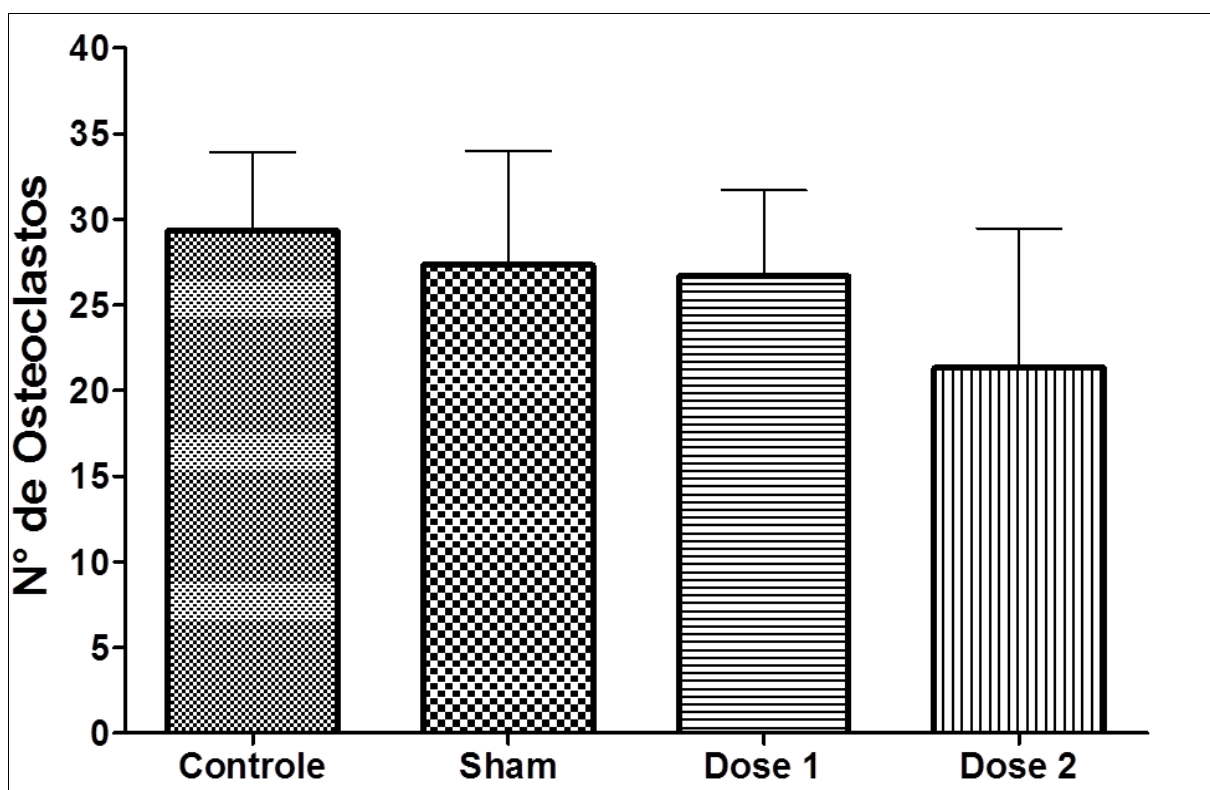


GRÁFICO 2 – QUANTIFICAÇÃO DE OSTEOCLASTOS EM ANIMAIS COM 09 DIAS DE IDADE: Valores de $29,33 \pm 4,61$ osteoclastos para o grupo controle, $27,33 \pm 6,65$ para o grupo sham, $26,66 \pm 5,03$ para dose 1 ($62,5\mu\text{g}/100\text{g}$) e de $21,33 \pm 8,14$ para dose 2 ($125\mu\text{g}/100\text{g}$). Valores referentes às médias e ao desvio padrão. Os valores de p foram $> 0,05$.

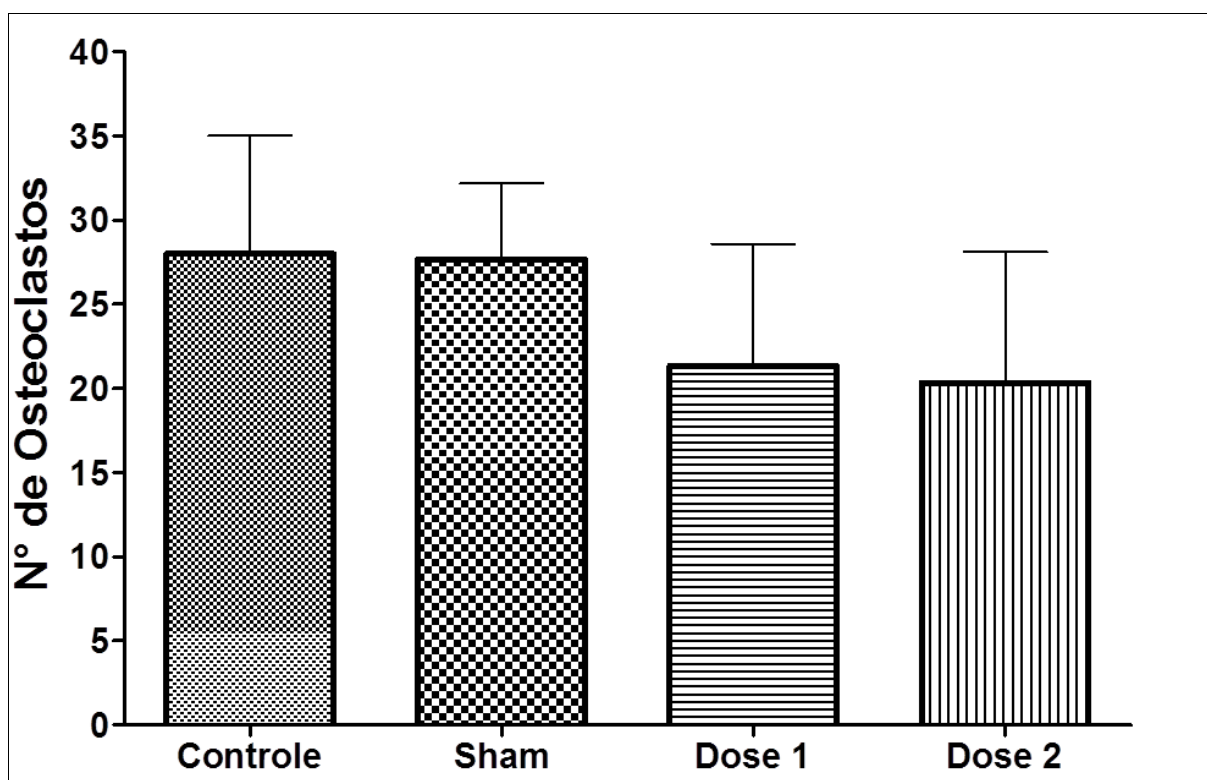


GRÁFICO 3 – QUANTIFICAÇÃO DE OSTEOCLASTOS EM ANIMAIS COM 11 DIAS DE IDADE: Valores de 28 ± 7 para o grupo controle, $27,66 \pm 4,50$ para o grupo sham, $21,33 \pm 7,23$ para os animais tratados com a dose 1 e $20,33 \pm 7,76$ para dose 2. Valores referentes às médias e ao desvio padrão. Os valores de p foram $> 0,05$.

6.4 Análise imuno-histoquímica

Análise qualitativa de lâminas processadas pela técnica imuno-histoquímica revelou a presença de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos marcados para o receptor α de estrógeno em animais do grupo sham e em animais tratados com estrógeno, em ambas as doses, como pode ser observado nas figuras 10 e 11. As marcações foram observadas no núcleo, no citoplasma e em ambas estruturas simultaneamente. Marcação citoplasmática associada à marcação nuclear foi observada na maioria dos casos nos três tipos celulares. Células não marcadas também foram, ocasionalmente, observadas entremeando as células marcadas.

Análise quantitativa do número de células marcadas para o receptor de estrógeno tipo α em osteoclastos revelou um aparente aumento da expressão do receptor em animais tratados com a dose 01 em comparação aos animais do grupo sham, entretanto, esses valores não foram estatisticamente significativos, tanto na idade de 09 dias quanto na idade de 11 dias. Nos animais de 09 dias, quando se compara animais tratados com a dose 02 com os animais do grupo sham observa-se uma tendência à redução nos valores de células marcadas para o receptor do tipo α ($p=0,0556$), o mesmo pode ser observado quando se compara os animais tratados com a dose 02 com animais tratados com a dose 01 ($p=0,0542$), todavia, esses valores não foram estatisticamente significativos. Contudo, para a idade de 11 dias, redução significativa do número de células marcadas para o receptor foi observada nos animais tratados com estrógeno na dose 02 em relação aos animais tratados com a dose 01 ($p=0,0224$). Nesta idade, quando se compara animais tratados com a dose 02 e animais do grupo sham, a redução não se mostrou estatisticamente significativa. Esses dados podem ser observados nas figuras 10 e 11.

Em relação à expressão do receptor α em osteoblastos foi possível observar um pequeno aumento na marcação em animais tratados em comparação com o animal do grupo sham em ambas as idades, todavia, esse aumento não foi estatisticamente significativo (figuras 10 e 11).

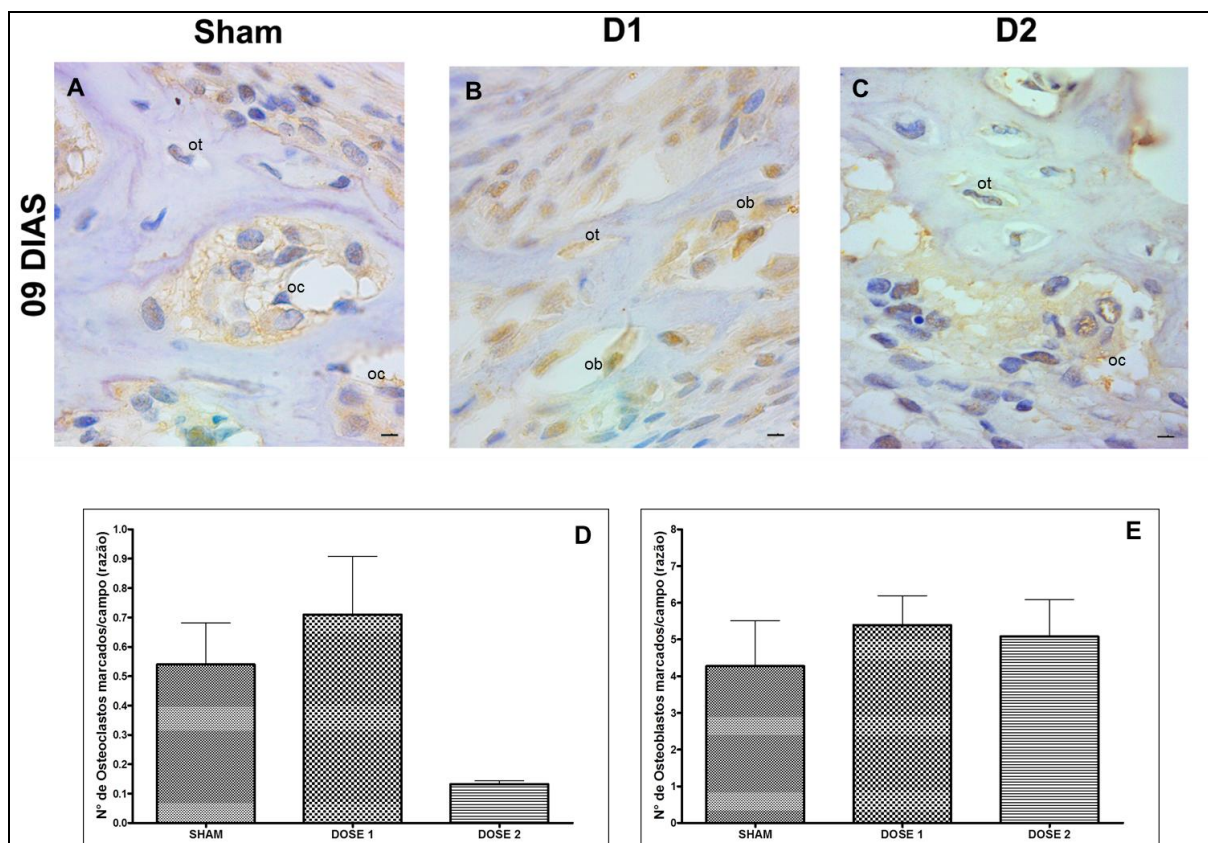


FIGURA 10: Imuno-histoquímica para o receptor α de estrógeno em células ósseas em animais com 09 dias de idade. A-C - As fotomicrografias das lâminas processadas mostram osteoblastos (ob), osteoclastos (oc) e osteócitos (ot) na superfície óssea oclusal a ser reabsorvida. Observe os diferentes tipos de marcação: nuclear, citoplasmática e ambas. Barra de escala: 5 μ m. D – (Gráfico 4) Quantificação da expressão do receptor α de estrógeno em osteoclastos em animais com 09 dias de idade: Valores de 0.54 ± 0.10 para o grupo sham, 0.71 ± 0.14 para os animais tratados com a dose 1 e 0.13 ± 0.0075 para dose 2. Valores referentes às médias e ao desvio padrão. Os valores de p foram $> 0,05$. E - (Gráfico 5) Quantificação da expressão do receptor α de estrógeno em osteoblastos em animais com 09 dias de idade: Valores de 4.27 ± 0.71 para o grupo sham, 5.39 ± 0.46 para a dose 1 e 5.08 ± 0.58 para a dose 2. Valores referentes às médias e ao desvio padrão. Os valores de p foram $> 0,05$.

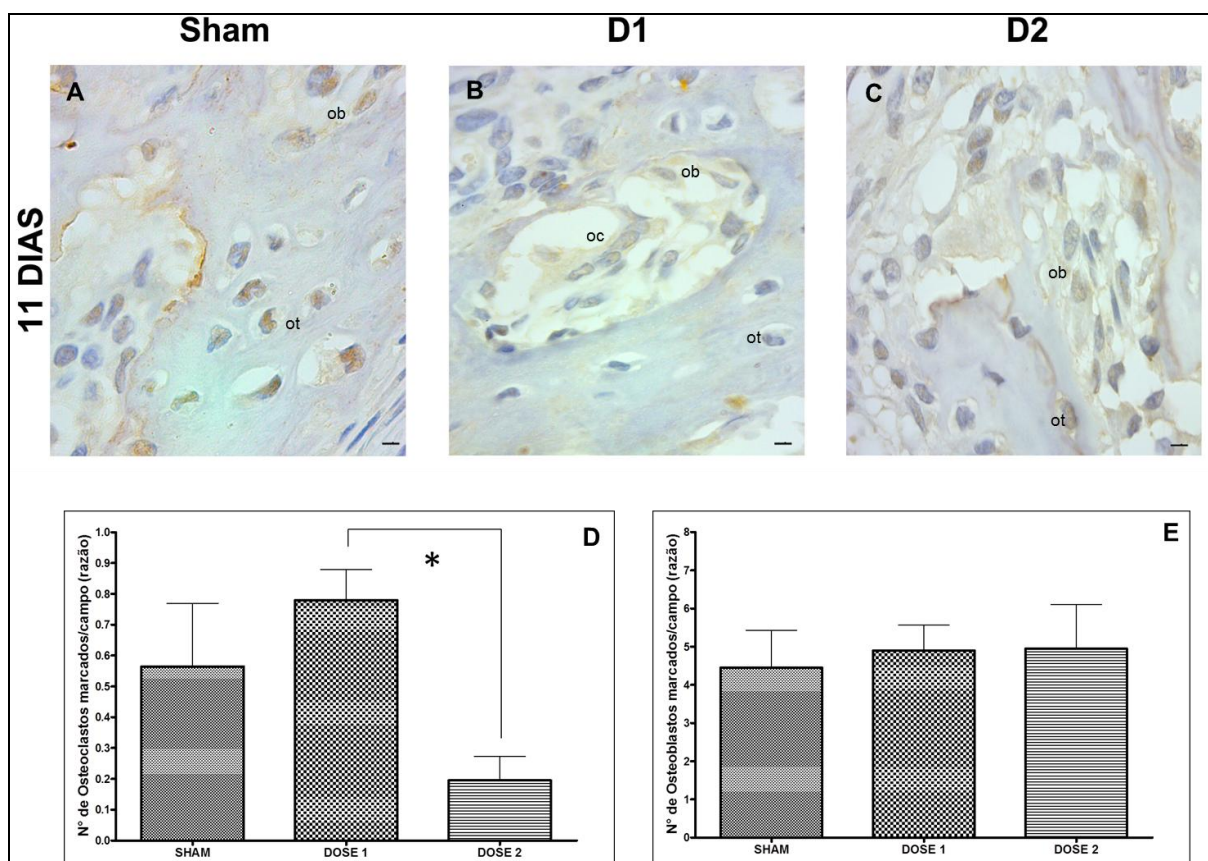


FIGURA 11: - Imuno-histoquímica para o receptor α de estrógeno em células ósseas em animais com 11 dias de idade. A-C - As fotomicrografias das lâminas processadas mostram osteoblastos (ob), osteoclastos (oc) e osteócitos (ot) na superfície óssea oclusal a ser reabsorvida em animais com 09 dias. Observe os diferentes tipos de marcação: nuclear, citoplasmática e ambas. Barra de escala: 5 μ m. D - (Gráfico 6) Quantificação da expressão do receptor α de estrógeno em osteoclastos em animais com 11 dias de idade: Valores de 0.56 ± 0.14 para o grupo sham, 0.78 ± 0.07 para a dose 1 e 0.19 ± 0.05 para a dose 2. Valores referentes às médias e ao desvio padrão. * Valor de $p= 0,0224$. E - (Gráfico 7) Quantificação da expressão do receptor α de estrógeno em osteoblastos em animais com 11 dias de idade: Valores de 4.45 ± 0.56 para o grupo sham, 4.90 ± 0.38 para a dose 1 e 4.95 ± 0.66 para a dose 2. Valores referentes às médias e ao desvio padrão. Os valores de p foram $> 0,05$.

6.5 Exame clínico

Ao exame clínico, a análise intra-oral dos animais de 09 dias de idade injetados com estrógeno com ambas as doses não mostrou variações da normalidade quando comparados com os animais de mesma idade nos grupos controle e sham. É possível observar, em todos os grupos, o desenvolvimento da mucosa do palato com a presença das pregas palatinas transversais, o início da erupção dos incisivos, superiores e inferiores, além de uma pequena isquemia na região dos molares superiores. Contudo, a erupção dos molares não foi observada (dados não mostrados).

Também nos animais tratados e sacrificados aos 11 dias de idade, o exame clínico se mostrou de acordo com os padrões da normalidade para esta idade. Em todos os grupos, controle, sham e tratados com estrógeno, foi nítido o crescimento e desenvolvimento da maxila, o qual pôde ser constatado pelo progresso no desenvolvimento da mucosa palatina, pela erupção dos incisivos superiores e inferiores e pela presença de um rebordo alveolar na região dos molares cada vez mais evidente e com certo grau de isquemia. A erupção dos molares superiores, entretanto, também não ocorreu nesta idade (dados não mostrados).

Aos 17 dias, os animais do grupo controle apresentaram a maxila bem desenvolvida. A mucosa do palato apresentou as pregas palatinas transversais bem mais evidentes, assim como os incisivos. Nesta idade é possível observar a erupção, ainda que parcial, dos molares superiores, dada pela exposição de suas cúspides no meio oral. Nos animais tratados com estrógeno o desenvolvimento da maxila e a erupção dos molares seguiu o mesmo padrão para esta idade (Figura 12 A-C).

Os dados clínicos são confirmados histologicamente. Aos 17 dias o aspecto morfológico do elemento dentário apresenta profundas alterações quando comparados aos animais das outras idades. O aspecto dentro da mesma idade nos diferentes grupos, contudo, permanece inalterado. Nessa idade folículo dental e ameloblastos em paliçada não são mais observados e as camadas constituintes do órgão do esmalte (epitélio externo, epitélio interno e retículo estrelado), em alguns pontos, já reduziram para formar o epitélio reduzido do esmalte. Dentina e esmalte estão completamente formados e mineralizados sendo que o que é visto deste último é o espaço negativo. O tecido ósseo da região oclusal foi totalmente

reabsorvido e as cúspides já iniciaram o rompimento do epitélio oral caracterizando a erupção dentária. Na região basal, além da continuidade da formação de tecido ósseo, é possível observar o início do desenvolvimento radicular (Figura 12 D-F).

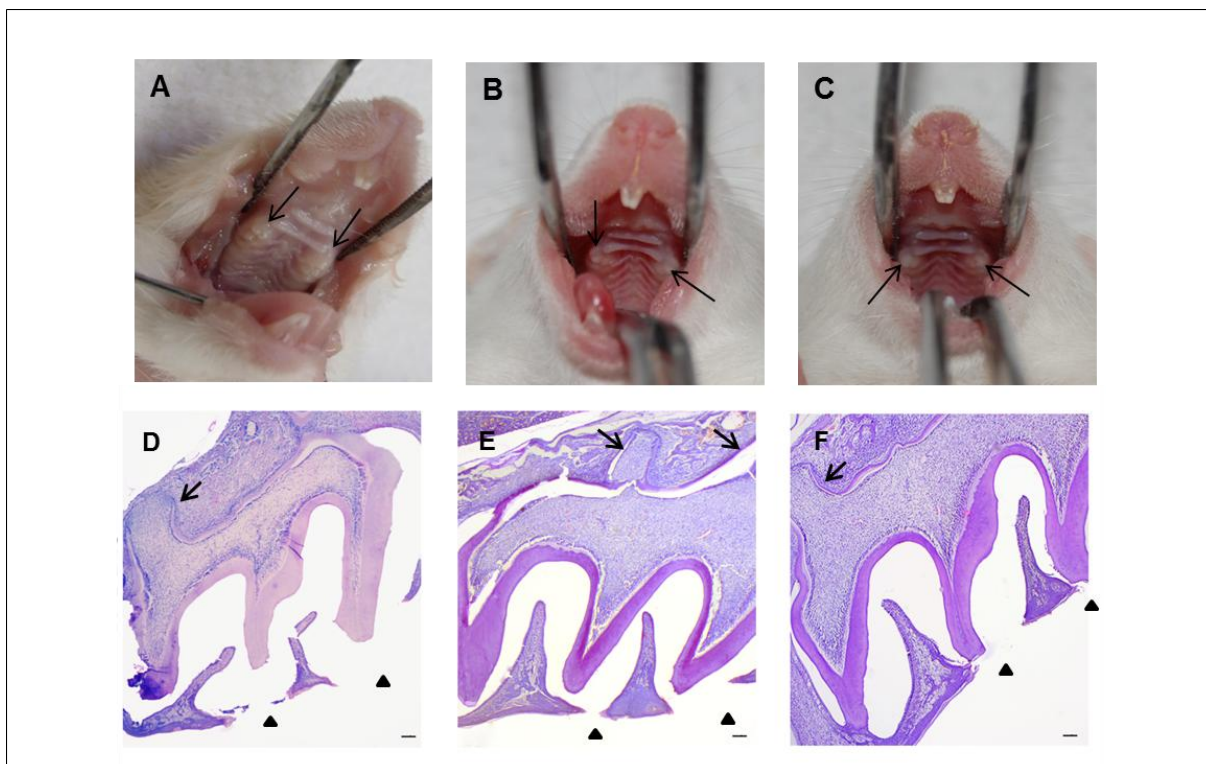


FIGURA 12 – Análise clínica e histológica do processo eruptivo observado em animais de 17 dias. A-C – Análise clínica: observa-se o desenvolvimento da mucosa palatina, dos incisivos e o processo de erupção dos molares. Aos 17 dias é possível observar a presença dos molares superiores (setas) na cavidade oral, tanto no animal do grupo controle (A) quanto nos animais tratados com estrógeno (B e C), todos seguindo o mesmo padrão de desenvolvimento. D-F - Análise histológica: constata-se histologicamente a erupção dentária com as cúspides rompendo o epitélio oral (cabeças das setas) e início da formação radicular (setas).

7 DISCUSSÃO

A erupção dentária é o processo através do qual o elemento dentário atravessa barreiras teciduais e emerge na cavidade oral (NANCI, 2008). Ao longo desse processo o germe dentário sofre uma movimentação intra-óssea, mais lenta, mediada pela reabsorção do tecido ósseo pelos osteoclastos e uma movimentação extra-óssea, mais rápida, visto que depende apenas da degradação do tecido conjuntivo da mucosa oral e fusão ao epitélio oral (FERRARIS; MUÑOZ, 2006; CERRI et al., 2010). Visto que a reabsorção do tecido ósseo interposto entre o germe dentário e a mucosa oral consiste de uma etapa essencial no desenvolvimento desse processo, espera-se que a interferência na atividade das células osteoclásticas possa impactar o movimento eruptivo. Dentre os fatores que vem sendo estudados pela sua capacidade de interferir na ação dessas células está o estrógeno, um hormônio cuja administração promove a redução do número de osteoclastos, seja por inibir sua formação e/ou induzir a apoptose dessas células (VÄÄNÄNEM, 2005; FALONI; CERRI, 2007). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do estrógeno sobre o processo de erupção dentária, tendo sido realizados para tanto a administração desse hormônio, com posterior análise clínica, histológica e imuno-histoquímica. Nossos resultados clínicos demonstraram que a progressão do desenvolvimento maxilar dos animais tratados com estrógeno não sofreu qualquer alteração no padrão de normalidade como efeito do tratamento hormonal. Aspectos característicos do processo de erupção dentária foram observados em todos os grupos, tal qual o padrão isquêmico da mucosa na região dos molares superiores notado já nos animais com 09 dias de idade. Tal aspecto resulta das alterações circulatórias no tecido conjuntivo da mucosa oral, causadas pela pressão exercida pelo elemento dentário que se move em direção ao epitélio oral (FERRARIS; MUÑOZ, 2006). A degradação do tecido conjuntivo interposto entre o epitélio reduzido do esmalte e o epitélio oral é que permite posteriormente a fusão desses epitélios possibilitando que a erupção dentária ocorra sem que haja sangramento no ato da perfuração da mucosa (FERRARIS; MUÑOZ, 2006; CERRI et al., 2010).

A análise da concentração plasmática de 17β estradiol no sangue dos animais utilizados neste estudo confirma a efetividade do tratamento hormonal utilizado em

nossos experimentos. Animais tratados com estrógeno apresentaram elevados índices hormonais quando comparados com o grupo controle e o grupo sham. Valores também superiores aos encontrados na literatura para animais fêmeas adultas, com idade de 03 meses, que apresentam concentração de estradiol de 98 ± 12 pg/ml (GRACELI et al., 2012). A maior concentração de 17β estradiol foi observada nos animais que receberam a maior dose do hormônio durante o experimento ($125 \mu\text{g}/100\text{g}$), sendo esta o dobro da concentração encontrada nos animais que receberam a metade desta dose, ou seja, que receberam a dose de $62,5 \mu\text{g}/100\text{g}$ durante o tratamento experimental. Animais do grupo sham apresentaram pequeno aumento na concentração plasmática de estrógeno quando comparados com os animais do grupo controle, fato que pode estar relacionado à administração do óleo de milho. Dados da literatura confirmam que óleos vegetais, tais como óleo de soja e óleo de gergelim, podem elevar a concentração de estrógeno circulante em ratas ovariectomizadas que receberam dieta rica em óleo (HASSAN; ABDEL-WAHHAB, 2012; HASSAN; WAKF; GHARIB, 2012).

Morfologicamente nossos resultados confirmam as alterações clínicas, uma vez que as lâminas histológicas demonstraram, já aos 09 dias de idade, alguns pontos em que apenas tecido conjuntivo está interposto entre o elemento dentário e o epitélio oral. Aos 11 dias de idade, também é possível observar essas alterações, tanto clínica quanto morfologicamente, constatando a progressão do processo de erupção nos animais de todos os grupos estudados. A penetração das cúspides do elemento dentário no tecido conjuntivo caracteriza, nessas idades, o início da fase de penetração da mucosa, tal qual o relatado por Cerri e colaboradores em 2010. Essa fase é caracterizada por uma intensa remodelação e degradação da lâmina própria durante a erupção dentária através da ação das metaloproteinases da matriz (MMPs), sobretudo de MMP-9. MMP-9 é apontada como a principal responsável pela degradação de diversos componentes teciduais como colágeno, fibronectina e elastina. A degradação desses componentes é que permite o avanço do elemento dentário em direção à cavidade oral na fase avançada do estágio de penetração da mucosa (CERRI et al., 2010).

A progressão do processo eruptivo ocorre normalmente nos animais tratados com estrógeno, em ambas as doses. Nossos dados não demonstraram alteração nessa

progressão visto que em animais com 17 dias de idade foi possível observar a erupção, ainda que parcial, dos molares superiores direitos, da mesma forma como o relatado na literatura (WISE; FRAZIER-BOWERS; D'SOUZA, 2002; WISE; KING, 2008; WISE, 2009) em animais que não foram submetidos a tratamentos. Fato constatado clínica e morfológicamente, como pode ser observado nas lâminas referentes aos animais de 17 dias de idade, onde visualizamos a perfuração do epitélio oral, parcialmente, pelas cúspides do elemento dentário.

A velocidade da erupção dentária depende, sobretudo, da reabsorção do osso que cobre a superfície oclusal do elemento dentário e, em parte, da aposição de tecido ósseo na base do alvéolo (MARKS; SCHROEDER, 1996; WISE; KING, 2008). Nossa análise histológica demonstrou não apenas a reabsorção da superfície óssea oclusal durante a progressão do processo eruptivo como também alterações na base do dente em formação. Trabalhos do nosso grupo de pesquisa demonstraram a referida aposição óssea na base do alvéolo e o início da formação radicular, para muitos uma consequência e não uma causa da erupção (MARKS; SCHROEDER, 1996; WISE; KING, 2008; WISE, 2009; WANG, 2013), associado ao deslocamento axial da coroa (FERRARIS; MUÑOZ, 2006), visto, principalmente nos animais com 17 dias de idade, em todos os grupos estudados.

Em uma análise geral do aspecto morfológico, visualizamos o elemento dentário em adiantado estágio de desenvolvimento. Nos animais de 09 dias e 11 dias de idade, em todos os grupos, a coroa já está completamente formada com dentina e esmalte já depositados e mineralizados, de acordo com outros dados já relatados na literatura (CERRI et al., 2010; WANG, 2013). A maturação do esmalte pode ser observada, principalmente, nos animais de 11 dias de idade em que é possível observar o espaço negativo do esmalte, mais precisamente nas porções mais superiores das cúspides, região onde os ameloblastos encontram-se com tamanho reduzido, demonstrando a diminuição da atividade secretora, ao contrário da porção mais cervical das cúspides, onde essas células encontram-se polarizadas indicando a recente deposição do esmalte (BRADASCHIA-CORREA; MASSA; ARANA-CHAVES, 2007). A faixa de tecido ósseo entre o elemento dentário e o epitélio oral nessas idades já se encontra reabsorvida em alguns pontos e o tecido conjuntivo já se apresenta como uma estreita faixa, o que caracteriza a degradação desses tecidos e a progressão do processo eruptivo. Esses achados concordam com

resultados publicados por Cerri e colaboradores (2010) que sugerem uma participação ativa de mastócitos e MMP-9 nessa degradação tecidual. Também como relatado por esses autores, a progressão do processo eruptivo culmina, aos 17 dias, com o estágio de penetração da mucosa onde as cúspides, com o esmalte totalmente mineralizado, aparecem rompendo o epitélio oral, caracterizando, de fato, a erupção dentária.

Outras estruturas como folículo dental, retículo estrelado e ameloblastos são vistos de forma discreta nas idades analisadas e regredindo à medida que a idade avança, constatando a involução dessas estruturas com o progresso do movimento eruptivo.

Os dados histológicos demonstraram ainda a presença de osteoclastos na superfície óssea oclusal que cobre o elemento dentário em animais de 09 dias e 11 dias de idade, tanto em animais do grupo controle quanto nos tratados com estrógeno, tal qual os achados na literatura (CERRI et al., 2010), indicando o ativo processo de reabsorção óssea oclusal nesses animais.

A análise quantitativa do número de osteoclastos mostrou uma aparente redução nos grupos tratados com estrógeno quando comparados com o grupo controle e o grupo sham nas idades de 09 dias e 11 dias, podendo isto ser relatado como resultado de um efeito direto da ação hormonal sobre a osteoclastogênese e atividade osteoclástica, concordando com outros trabalhos encontrados literatura (HUGHES, et al., 1996; KAMEDA, 1997; SRIVASTAVA, et al., 2001; FALONI, et al., 2007). Entretanto, o tratamento estatístico dos dados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney não revelou redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no número de osteoclastos.

Nossos resultados para contagem de osteoclastos mostram que o estrógeno pode reduzir o número de osteoclastos da superfície óssea. Entretanto, tal hormônio parece não promover uma redução significativa dos osteoclastos da superfície óssea oclusal a ser reabsorvida durante o processo de erupção dentária a ponto de interferir neste mecanismo. Esse fato pode ser comprovado quando se faz a correlação dos dados histomorfométricos com as análises clínica e histológica dos ratos tratados com estrógeno, que apresentaram erupção dentária inalterada aos 17 dias de idade, período de erupção esperado para animais que não receberam

qualquer tratamento (WISE; FRAZIER-BOWERS; D' SOUZA, 2002; WISE; KING, 2008; WISE, 2009).

Nossos dados estatísticos vão de encontro aos achados de Faloni e colaboradores (2007) que analisaram os efeitos do estrógeno no osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno. O fato de se tratar de regiões de análise diferentes pode explicar tal discordância. O osso interposto entre os germes dentários e a cavidade oral necessariamente precisa ser completamente reabsorvido por ação osteoclástica para garantir o êxito do processo eruptivo (MARKS; SCHROEDER, 1996; BRADASCHIA-CORREA; MASSA; ARANA-CHAVES, 2007). Vale lembrar que dois picos de produção de osteoclastos, controlados pelo folículo dental através de interações moleculares, são observados durante o processo eruptivo em molares de ratos, aos 03 dias e aos 09-11 dias de idade, para garantir a formação do caminho eruptivo e emergência do elemento dentário na boca (WISE; FRAZIER-BOWERS; D' SOUZA, 2002; WISE; KING, 2008; WISE, 2009). O tratamento hormonal realizado em nossos experimentos compreende estes dois picos, assim, o efeito inibitório que a administração de estrógeno poderia provocar sobre os osteoclastos da superfície óssea oclusal pode ter sido compensado pela alta produção dessas células nesse período, justificando a redução não significativa do número de osteoclastos. Por outro lado, o osso alveolar que circunda dentes já erupcionados é um tecido sujeito à constante remodelação, como resultado da adaptação à demanda funcional (FERRARIS; MUÑOZ, 2006; NANJI, 2008). Apesar disso, não está destinado a desaparecer, pelo contrário, sua presença é fator fundamental na manutenção e suporte do elemento dentário. Na doença periodontal, por exemplo, a perda óssea alveolar decorrente do processo inflamatório pode ocasionar a perda do elemento dentário (PAGE; KORNMAN, 1997; PIHLSTROM, MICHALOWICZ, JOHNSON, 2005).

Interessante observar que a não interferência do estrógeno no processo eruptivo pode também está relacionado à resposta diferente dos ossos maxilares frente ao hormônio como mostram dados da literatura (BERNICK; ERSHOFF, 1963; YANG; PHAM; GRABBE, 2003; EJIRI et al., 2006; BINTE ANWAR et al., 2007; RAWLINSON et al., 2009; ALMEIDA et al., 2013). Trabalhos em nosso laboratório já estão sendo conduzidos para investigar possíveis diferenças metabólicas entre o

osso interposto entre o germe dentário e a mucosa oral e os ossos longos, sabidamente suscetíveis ao tratamento com estrógeno.

Além disso, vale lembrar que o fenômeno de reabsorção óssea para a erupção dentária não é um evento isolado, a aposição óssea na base do dente em formação ocorre de forma paralela e trabalhos anteriores já demonstraram sua importância para o êxito do processo eruptivo (CAHILL; MARKS, 1980; MARKS; CAHILL, 1984). Para alguns autores a formação óssea apical ao dente seria de tal forma que o elemento dentário não teria outra alternativa se não seguir o caminho oclusal (WISE; FRAZIER-BOWERS; D' SOUZA, 2002; WISE; KING, 2008; WISE, 2009).

É importante observar ainda que a formação óssea na base do alvéolo fica a cargo dos osteoblastos, células que, além de exercer essa função formadora, são capazes de produzir muitas moléculas que interferem na formação de osteoclastos de maneira inibitória, tais como OPG e TGF- β . Recentes estudos têm mostrado também que sobre os osteoblastos o estrógeno tem um papel inverso ao observado em osteoclastos, a presença de estrógeno exerce um efeito antiapoptótico em osteoblastos (CRUZOÉ-SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009). Somado a esse mecanismo, o estrógeno é capaz também de induzir a liberação de fatores moleculares, que interferem na osteoclastogênese (HUGHES et al., 1996; CRUZOÉ-SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009). Esse efeito do estrógeno em osteoblastos pode ser justificado pela presença de receptores específicos para esse hormônio nesse tipo celular (BORD et al., 2001; MICHAEL et al., 2005). De acordo com a literatura, efeito semelhante ao observado em osteoblastos é encontrado em osteócitos. Sobre estas células o estrógeno também exerce um efeito preventivo na apoptose, bem como induz a produção de TGF- β que, como já visto, inibe a reabsorção óssea por osteoclastos (MICHAEL et al., 2005). Dessa forma, com o objetivo de investigar se a super-expressão de estrógeno modularia a atividade de osteoblastos foi realizada uma análise imuno-histoquímica para a detecção da expressão de receptores de estrógeno nessas células, também realizada para os osteoclastos.

A expressão do receptor α de estrógeno em osteoblastos e osteócitos parece ser bem sedimentada na literatura (BORD et al., 2001; MICHAEL et al., 2005) e nossos achados confirmam esses relatos. O que ainda gera controvérsias é a presença

desse tipo de receptor em osteoclastos. Alguns estudos apontam a presença de receptor α em osteoclastos (KAMEDA et al., 1997; BORD et al., 2001; MICHAEL et al., 2005), enquanto outros afirmam que apenas o receptor β está presente em osteoclastos maduros (SØRENSEN et al., 2006; CRUZOÉ-SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009). Nossa análise imuno-histoquímica encontrou células multinucleadas, osteoclastos, marcadas para o receptor α como já demonstrado.

Uma especulação a mais sobre a presença de receptores de estrógeno em osteoclastos ainda pode ser pertinente. Dados da literatura afirmam que osteoclastos maduros apresentam somente o receptor β . Entretanto, os osteoclastos encontrados na superfície óssea oclusal a ser reabsorvida durante o processo eruptivo são células recém-formadas o que pode justificar a marcação encontrada nessas células em nossas análises.

Análise quantitativa de osteoclastos marcados para o receptor α de estrógeno mostrou uma expressão aparentemente maior nos animais tratados com a dose 01 em comparação com animais do grupo sham, em ambas as idades, embora não significativa. Esse aumento aparente poderia ser explicado, visto que a presença de um determinado hormônio pode induzir a um aumento do número de receptores (RHOADES; TANNER, 1995 apud CRUZOÉ-SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009). Ainda sobre esses dados verificou-se redução na expressão do receptor ao comparar animais tratados com a dose 01 para a dose 02, fato que pode ser justificado por uma possível dessensibilização do receptor, sobretudo na idade de 11 dias, onde esta queda mostrou-se estatisticamente significativa. Dessensibilização significa diminuição do número ou afinidade de receptores que ocorre, por exemplo, quando altas concentrações de um hormônio, entre eles os esteróides, são administradas resultando numa diminuição do número desses receptores e provocando, conseqüentemente, redução da resposta da célula ou do tecido alvo (CARVALHO, 2011). Para a idade de 09 também foi observado uma forte tendência na redução da expressão da menor dose para a maior dose, embora não estatisticamente significativa, tendência também observada comparando animais do grupo sham com animais tratados com a dose 02 nesta idade. Esses dados podem ser relacionados com a redução não significativa do número de osteoclastos

observada em nossas análises, tendo em vista que a dessensibilização do receptor pode ter reduzido a disponibilidade dessas moléculas para a ação do estrógeno.

Para os osteoblastos, a análise quantitativa da expressão do receptor α de estrógeno não revelou alterações significativas. Assim, o estrógeno pode não ter sido capaz de promover um efeito estimulador sobre os osteoblastos e, conseqüentemente, não ter levado a uma ação inibitória sobre os osteoclastos (HUGHES et al., 1996; VÄÄNÄNEM, 2005), contribuindo, dessa forma, para a manutenção do número de células clásticas possibilitando que a erupção dentária tenha ocorrido no tempo esperado em animais tratados da mesma forma que em animais que não recebem qualquer tipo de tratamento (WISE; FRAZIER-BOWERS; D'SOUZA, 2002; WISE; KING, 2008; WISE, 2009).

Marcação citoplasmática associada à marcação nuclear foi o padrão de marcação observado na maioria dos casos e de acordo com a literatura é uma resposta esperada. Como já relatado, receptores para estrógeno são levados para dentro do núcleo após a ligação ao estrógeno, entretanto, uma marcação de receptores ainda não associados ao hormônio pode ocorrer no citoplasma (VIDAL; KINDBLUM, OHLSSON, 1999; CRUZOÉ-SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009). Outros trabalhos, *in vivo* e *in vitro*, têm demonstrado ainda que a estimulação com estrógeno aumenta significativamente a expressão do receptor α no núcleo tornando-a também detectável no citoplasma e em regiões da membrana celular e próximas a ela, neste último caso através de interações com outras moléculas (SONG et al., 2004; KUMMER et al., 2011). Estimulações prolongadas com estrógeno aumentam ainda mais a quantidade do receptor α no citoplasma enquanto que a nuclear se mantém inalterada (KUMMER, et al., 2011).

Quantificação de osteoclastos e células marcadas para o receptor α de estrógeno também foram realizadas separando os animais utilizados neste estudo por sexo. Entretanto, os dados não trazem informações adicionais (dados não mostrados), possivelmente porque os animais utilizados nesse estudo são recém-nascidos e, portanto, muito distantes da maturidade sexual, onde um efeito adicional do estrógeno natural do organismo poderia ser observado. Não podemos descartar, todavia, a possibilidade de animais do sexo feminino terem uma pré-disposição genética de reagirem positivamente ao tratamento com estrógeno, mesmo que muito

jovens. Nossos resultados não apontaram para essa hipótese, sendo assim, outros estudos são necessários para comprová-la.

8 CONCLUSÃO

Após a indução do aumento da concentração de estrógeno na circulação de ratos, nossos experimentos não revelaram alterações no mecanismo da erupção dentária decorrente da alta concentração desse hormônio.

A análise histológica do germe dentário e progressão do processo eruptivo mostrou o elemento em adiantado estágio de desenvolvimento, mas não revelou grandes alterações entre os grupos estudados. Animais injetados com estrógeno apresentaram progressão do mecanismo eruptivo e desenvolvimento dentário dentro dos padrões de normalidade para cada idade analisada.

Análise histomorfométrica revelou a presença de osteoclastos apoiados sobre a superfície óssea oclusal a ser reabsorvida durante o processo eruptivo nos animais de todos os grupos estudados. Animais tratados com estrógeno mostraram uma aparente redução do número dessas células, entretanto, essa redução não se mostrou ser estatisticamente significativa.

Reações de imuno-histoquímica para o receptor α de estrógeno confirmaram a presença desse tipo de receptor em osteoclastos, osteoblastos e osteócitos comprovando o efeito do hormônio nas células ósseas. Contudo, essa expressão não foi alterada com a administração de estrógeno. Esses dados podem estar relacionados à redução não significativa do número de osteoclastos da superfície óssea oclusal.

O aspecto geral da lâmina própria mostrou-se inalterado frente à administração de estrógeno. A degradação do tecido conjuntivo interposto entre o elemento dentário e o epitélio oral seguiu o mesmo padrão em todos os grupos analisados.

De acordo com o exame clínico intra-oral, não foram observadas alterações do padrão de desenvolvimento clínico nos animais tratados com estrógeno em comparação com os animais que não receberam tratamento hormonal.

De acordo com a metodologia utilizada nesse trabalho, nossos dados em conjunto sugerem que a administração de estrógeno não interfere com o processo eruptivo,

uma vez que a erupção dentária em animais tratados deu-se no tempo normal, não havendo, portanto, atraso nesse processo.

9 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. et al. Estrogen receptor signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. **J Clin Invest.**, New Haven, v. 123, n. 1, p. 394-404, Jan. 2013.
- ALQAHTANI, S. J.; HECTOR, M. P.; LIVERSIDGE, H. M. Brief communication: The London atlas of human tooth development and eruption. **Am J Phys Anthropol**, Hoboken, v. 142, n. 3, p. 481-490, Jul. 2010.
- AUBIN, J. E.; BONNELYE, E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. **Osteoporos Int.**, London, v. 11, n. 11, p. 905-913, 2000.
- BERNICK, S.; ERSHOFF, B. H. Histochemical study of bone in estrogen-treated rats. **J Dent Res.**, Chicago, v. 42, p. 981-989, July-Aug. 1963.
- BINTE ANWAR, R. et al. Relationship between Porotic Changes in Alveolar Bone and Spinal Osteoporosis. **J Dent Res.**, Chicago, v. 86, n. 1, p. 52-57. Jan. 2007.
- BORD, S. et al. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. **J Clin Endocrinol Metab.**, Springfield, v. 86, n. 5, p. 2309-2314, May. 2001.
- BORD, S. et al. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. **Bone**, Elmsford, v. 32, n. 2, p. 136-141, Feb. 2003.
- BRADASCHIA-CORREA, V.; MASSA, L. F.; ARANA-CHAVES, V. E. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in young growing rats. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 330, n. 3, p. 475-485, Dec. 2007.
- BRZOZOWSKI, A. M. et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. **Nature**, London, v. 389, n. 6652, p. 753-758, Oct. 1997
- CAHILL, D. R.; MARKS, S. C. J. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v. 9, n. 4, p. 189-200, Jul. 1980.
- CARVALHO, C. R. O. Mecanismos de ação hormonal. In: CURI, R.; PROCOPIO, J. **Fisiologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap. 47, p.673-694.
- CENCI, S. et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-a. **J Clin Invest.**, New Haven, v. 106, n. 10, p. 1229-1237, Nov. 2000.
- CERRI, P. S. et al. Mast cells and MMP-9 in the lamina propria during eruption of rat molars: quantitative and immunohistochemical evaluation. **J. Anat.**, London, v. 217, n. 2, p. 116-125, Aug. 2010.

CHIBA, M.; OHSHIMA, S. Effects of colchicine and hydrocortisone on unimpeded eruption rates of root-resected mandibular incisors of rats. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 147-153, 1985.

CHO, Y. A. et al. Multiple calcifying hyperplastic dental follicles: comparison with hyperplastic dental follicles. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 40, n. 3, p. 243-249, Mar 2011.

CRUZOÉ-SOUZA, M.; SASSO-CERRI, E.; CERRI, P. S. Immunohistochemical detection of estrogen receptor b in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span. **J Anat.**, London, v. 215, n. 6, p. 673-681, Dec. 2009.

EJIRI, S. et al. Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. **Arch Oral Biol.**, Oxford, v. 51, n.11, p. 941-950, Nov. 2006.

FALONI, A. P. S.; CERRI, P. S. Mecanismos celulares e moleculares do estrogênio na reabsorção óssea. **Rev. Odontol. UNESP**, Marília, v. 36, n. 2, p. 181-188, Apr. - June 2007.

FALONI, A. P. S. et al. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. **J Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 42, n. 3, p. 193-201, Jun. 2007.

FALONI, A. P. S. et al. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. **J Anat.**, London, v. 220, n.1, p. 77-85, Jan. 2012.

FERRARIS, M. E. G.; MUÑOZ, A. C. Erupção dentária. In: FERRARIS, M. E. G. e MUÑOZ, A. C. **Histologia e embriologia bucodental**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 13, p.347-364.

GOMEZ, R. S. et al. Multiple calcifying hyperplastic dental follicles. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 27, n. 7, p. 333-334, Aug 1998.

GRACELI, J. B. et al. Role of estrogen and progesterone in the modulation of CNG-A1 and Na/K+-ATPase expression in the renal cortex. **Cell Physiol Biochem.**, Basel, V. 30, n. 1, p. 160-172, June. 2012.

GRIER, R. L. I.; WISE, G. E. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. **J Dent Res**, Chicago, v. 77, n. 1, p. 8-15, Jan. 1998.

GRIER, R. L. I. et al. Secretion of CSF-1 and its inhibition in rat dental follicle cells: implications for tooth eruption. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 106, n. 3, p. 808-815, Jun. 1998.

HASSAN, H. A.; ABDEL-WAHHAB, M. A. Effect of soybean oil on atherogenic metabolic risks associated with estrogen deficiency in ovariectomized rats: dietary

- soybean oil modulate atherogenic risks in ovariectomized rats. **J Physiol Biochem.**, Pamplona, v. 68, n. 2, p. 247-253, June. 2012.
- HASSAN, H. A.; WARKF, A. M.; GHARIB, N. E. Role of phytoestrogenic oils in alleviating osteoporosis associated with ovariectomy in rats. **Cytotechnology.**, Dordrecht, 18 Nov. 2012.
- HEINRICH, J. et al. CSF-1, RANKL and OPG regulate osteoclastogenesis during murine tooth eruption. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 50, n. 10, p. 897-908, Oct. 2005.
- HJERRILD, B. E.; MORTENSEN, K. H.; GRAVHOLT, C. H. Turner syndrome and clinical treatment. **Br Med Bull**, London, v. 86, p. 77-93, Apr. 2008.
- HOFBAUER, L. C.; SCHOPPET, M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. **JAMA.**, Chicago, v. 292, n. 4, p. 490-495, July. 2004.
- HUGHES, D. E. et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . **Nat Med.**, New York, v. 2, n. 10, p. 1132-1136, Oct 1996.
- KAMEDA, T. et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. **J Exp Med.**, New York, v. 186, n. 4, p. 489-495, Aug 1997.
- KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Periodonto. In: KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 09, p.205-245.
- KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Introdução ao sistema endócrino. In: KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy: Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2009. cap. 37, p.657-667.
- KUMMER, S. et al. Estrogen receptor alpha expression in podócitos mediates protection against apoptosis in vitro and in vivo. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n.11, p. e27457, Nov. 2011.
- LIANG, L. et al. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. **J Periodontol.**, Chicago, v. 79, n. 9, p. 1745-1751, Sep. 2008.
- LIU, D.; WISE, G. E. A DNA microarray analysis of chemokine and receptor genes in the rat dental follicle-role of secreted frizzled-related protein-1 in osteoclastogenesis. **Bone**, Elmsford, v. 41, n. 2, p. 266-272, Apr. 2007.
- LIU, D.; WISE, G. E. Expression of endothelial monocyte-activating polypeptide II in the rat dental follicle and its potential role in tooth eruption. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 116, n. 4, p. 334-340, Aug 2008.
- LIU, D. et al. Chronology and regulation of gene expression of RANKL in the rat dental follicle. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 113, n. 5, p. 404-409, Oct. 2005.

LIU, D.; YAO, S.; WISE, G. E. MyD88 expression in the rat dental follicle: implications for osteoclastogenesis and tooth eruption. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 118, n. 4, p. 333-341, Aug. 2010.

MARKS, J. S. C.; SCHROEDER, H. E. Tooth eruption: theories and facts. **Anat Rec.**, New York, v. 245, n. 2, p. 374-393, June. 1996.

MARKS, S. C.; CAHILL, D. R. Regional control by the dental follicle of alterations in alveolar bone metabolism during tooth eruption. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v. 16, n. 4, p. 164-169, Apr 1987.

MARKS, S. C. J.; CAHILL, D. R. Experimental study in the dog of the non-active role of the tooth in the eruptive process. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 311-322, 1984.

MARKS, S. C. J.; GORSKI, J. P.; WISE, G. E. The mechanisms and mediators of tooth eruption - Models for developmental biologists. **Int J Dev Biol**, Vizcaya, v. 39, n. 1, p. 223-230, Feb. 1995.

MIDTBØ, M.; HALSE, A. Skeletal maturity, dental maturity, and eruption in young patients with Turner syndrome. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, v. 50, n. 5, p. 303-312, Oct. 1992.

MICHAEL, H. et al. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. **J Bone Miner Res.**, New York, v. 20, n. 12, p. 2224-2232, Dec. 2005.

MOXHAM, B. J.; BERKOVITZ, B. K. Interactions between thyroxine, hydrocortisone and cyclophosphamide in their effects on the eruption of the rat mandibular incisor. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1083-1087, 1983.

NANCI, A. Movimento Dentário Fisiológico: Erupção e Exfoliação. In: NANCI, A. **Tem Cate Histologia Oral: Desenvolvimento, estrutura e função**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 10, p.268-289.

PACIFICI, R. Estrogen, Cytokines, and Pathogenesis of Postmenopausal Osteoporosis. **J Bone Miner Res.**, New York, v. 11, n. 8, p. 1043-1051, Aug. 1996.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v.14, p. 9-11, Jun. 1997.

PARIKKA, V. et al. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. **Endocrinology**, Springfield, v. 142, n. 12, p. 5371-5378, Dec. 2001.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, London, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, Nov. 2005.

QUE, B. G.; LUMPKIN, S. J.; WISE, G. E. Implications for tooth eruption of the effect of interleukin-1 α on nuclear factor- κ B gene expression in the rat dental follicle. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 44, n. 11, p. 961-967, Nov. 1999.

QUE, B. G.; WISE, G. E. Colony-stimulating factor-1 and monocyte chemotactic protein-1 chemotaxis for monocytes in the rat dental follicle. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 42, n. 12, p. 855-856, Dec. 1997.

RAWLINSON, S. C. et al. Ovariectomy vs. hypofunction: their effects on rat mandibular bone. **J Dent Res.**, Chicago, v. 88, n. 7, p. 615-620, July. 2009.

RICKARD, D. J.; SUBRAMANIAM, M.; SPELSBERG, T. C. Molecular and Cellular Mechanisms of Estrogen Action on the Skeleton. **J Cell Biochem.**, New York, v. Suppl 32-33, p. 123-132, 1999.

SAIKA, M. et al. 17 β -estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor- α . **Endocrinology**, Springfield, v. 142, n. 6, p. 2205-2212, Jun. 2001.

SONG, R. X. et al. The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor α to the plasma membrane. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 101, n. 7, p. 2076-2081, Feb. 2004.

SØRENSEN, M. G. et al. Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts. **DNA Cell Biol**, New York, v. 28, n. 8, p. 475-483, Aug. 2006.

SRIVASTAVA, S. et al. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. **J Biol Chem.**, Baltimore, v. 276, n. 12, p. 8836-8840, Mar. 2001.

THESLEFF, I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. **J Cell Sci**, London, v. 1, n. 116, p. 1647-1648, May. 2003.

VÄÄNÄNEN, H. K. et al. How do osteoclasts resorb bone? **Materials Science and Engineering C**, v. 6, n. 4, p. 205-209, July. 1998.

VÄÄNÄNEM, H. K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption—rationale for the design of new therapeutics. **Adv Drug Deliv Rev.**, Amsterdam, v. 57, n. 7, p. 959-971, May. 2005.

VIDAL, O; KINDBLUM, L. G.; OHLSSON, C. Expression and localization of estrogen receptor- β in murine and human bone. **J Bone Miner Res.**, New York, v. 14, n.6, p. 923-929, June. 1999.

WANG, X. P. Tooth eruption without roots. **J Dent Res**, Chicago, v. 92, n. 3, p. 212-214, Mar. 2013.

WINDAHL, S. H. et al. Estrogen receptor alpha in osteocytes is important for trabecular bone formation in male mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 110, n. 6, p. 2294-2299, Feb. 2013.

WISE, G. E. In vivo effect of interleukin-1 alpha on colony-stimulating factor-1 gene expression in the dental follicle of the rat molar. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 163-165, Feb. 1998.

WISE, G. E. Cellular and molecular basis of tooth eruption. **Orthod Craniofac Res**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 67-73, May. 2009.

WISE, G. E.; FRAZIER-BOWERS, S.; D'SOUZA, R. N. Cellular, Molecular, and Genetic Determinants of Tooth Eruption. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v. 13, n. 4, p. 323-334, 2002.

WISE, G. E. et al. Effects of Dexamethasone on Tooth Eruption in Rats: Differences in Incisor and Molar Eruption. **Clin Anat.**, New York, v. 14, n. 3, p. 204-209, May. 2001.

WISE, G. E.; HUANG, H.; QUE, B. G. Gene expression of potential tooth eruption molecules in the dental follicle of the mouse. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 107, n. 6, p. 482-486, Dec. 1999.

WISE, G. E.; KING, G. J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. **J Dent Res**, Chicago, v. 87, n. 5, p. 414-434, May. 2008.

WISE, G. E.; LIN, F. Regulation and localization of colony-stimulating factor-1 mRNA in cultured rat dental follicle cells. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 39, n. 7, p. 621-627, Jul. 1994.

WISE, G. E. et al. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. **J Dent Res**, Chicago, v. 79, n. 12, p. 1937-1942, Sept. 2000.

WISE, G. E.; YAO, S. Expression of tumour necrosis factor-alpha in the rat dental follicle. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 47-54, Jan. 2003.

WISE, G. E. et al. CSF-1 regulation of osteoclastogenesis for tooth eruption. **J Dent Res**, Chicago, v. 84, n. 9, p. 837-841, June. 2005.

WISE, G. E. et al. Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin in vitro by rat dental follicle cells and its implications for tooth eruption. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 247-254, Mar. 2002.

WISE, G. E.; ZHAO, L.; LIN, F. Effects of epidermal growth factor (EGF) and colony-stimulating factor-1 (CSF-1) on expression of c-fos in rat mandibular molars: implications for tooth eruption. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 284, n. 1, p. 1-7, Apr. 1996.

YANG, J.; PHAM, C. M.; CRABBE, D. L. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. **Dentomaxillofac Radiol.**, Erlangen, v. 32, n. 4, p. 247-251, July. 2003.

YAO, S. et al. Effect of vascular endothelial growth factor on RANK gene expression in osteoclast precursors and on osteoclastogenesis. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 51, n. 7, p. 596-602, Jul 2006.

YAO, S.; PAN, F.; WISE, G. E. Chronological gene expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the stellate reticulum of the rat: implications for tooth eruption. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 228-232, Mar. 2007.

YAO, S. et al. In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 451-456, Jun. 2004.

YASUDA, H. et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 95, p. 3597-3602, Mar. 1998.

YOO, H. I. et al. Differential expression of cxcl-14 during eruptive movement of rat molar germs. **J Exp Zool B Mol Dev Evol.**, Hoboken, v. 316, n. 6, p. 418-426, 2011.