

SUMÁRIO:	Pág.
Agradecimentos	3
Parte A - Introdução e justificação do Tema	4
Resumo	6
Abstract	11
REMODELAÇÃO ÓSSEA	13
➤ Objectivos da remodelação óssea	13
• Introdução	13
• Adaptação e reparação da estrutura óssea (Perspectiva mecânica)	14
• Homeostasia do cálcio plasmático (Perspectiva metabólica)	19
BIOLOGIA DA REMODELAÇÃO ÓSSEA	21
➤ Células do tecido ósseo – breves considerações	21
• Células da linha osteoblástica	21
• Osteoclastos e osteoclastogénese	26
➤ Ciclo de remodelação óssea	31
Parte B – Osteoimunologia – Alguns Aspectos	39
METASTASES ÓSSEAS E REMODELAÇÃO ÓSSEA	47
Conclusões Finais	57
Parte C – Bibliografia	58

Agradecimentos

À Senhora Prof.^a Dr.^a Maria Helena Lopes Figueiredo, orientadora científica desta dissertação, agradeço pelo entusiasmo e dedicação sem limites a completa disponibilidade sempre demonstrada, pelo auxílio na realização desta tese, tal como o empenho, as sugestões, os esclarecimentos, os comentários e todo o material que me disponibilizou, sendo pois, indubitavelmente uma referência no ensino desta escola.

Agradeço ainda, pela orientação e apoio incansável, de valor inestimável, tendo sido, mesmo muito importante para mim, as palavras de compreensão, apoio, incentivo e de confiança, pois foram elas que me fizeram chegar aqui.

Parte A - Introdução e justificação do tema

Este trabalho, apresentado sob a forma de artigo de revisão, foi concebido com o objectivo de proporcionar uma panorâmica geral da biologia da remodelação óssea.

Dos vários tecidos duros presentes no organismo humano o tecido ósseo é, de longe, o mais estudado e o mais dinâmico, pelo que nos pareceu pertinente dar-lhe particular desenvolvimento. A este respeito, será importante sublinhar que o processo alveolar, e sobretudo o osso alveolar, parte importante do periodonto, apresenta notáveis capacidades de formação e remodelação, associadas não só ao crescimento radicular e à erupção dentária mas, e sobretudo, como resposta aos constantes requisitos funcionais próprios da mastigação. Por outro lado, e ainda no âmbito da Medicina Dentária, importa referir que o sucesso dos procedimentos e tratamentos realizados na área da Ortodontia e da Implantologia estão altamente dependentes da funcionalidade do tecido ósseo adjacente. Com efeito, a movimentação ortodôntica é possível graças à grande plasticidade do tecido ósseo do processo alveolar/osso alveolar.

Os mecanismos de modelação e remodelação óssea assentam numa complexa maquinaria celular, que por sua vez está sujeita à acção de numerosos factores de regulação. Assim, a constante adaptação da microestrutura óssea às diferentes solicitações, resulta da existência de uma íntima correlação e integração entre estímulos e respostas celulares.

Os processos de remodelação não são mais do que a tradução funcional de diferentes actividades celulares, representando no seu conjunto a mais notável resposta do tecido ósseo.

Por todas estas razões pensamos pertinente e justificado desenvolver alguns conceitos básicos sobre as populações celulares presentes no tecido ósseo e o seu envolvimento na biologia da remodelação. Ainda dentro deste contexto pareceu-nos importante fazer algumas reflexões sobre osteoimunologia.

Em paralelo entendemos descrever alguns aspectos relativos aos processos de metastização óssea, situação patológica muito ligada a alterações dos mecanismos de remodelação.

Este trabalho pretende também dar sequência e continuidade a anteriores estudos nesta área com particular relevo para os trabalhos do Mestre Paulo Palma, Mestre Orlando Martins e da Mestre Mónica Ferreira, que serviram de base de apoio a este conjunto de considerações sobre a biologia da remodelação óssea.

Este trabalho de revisão encontra-se organizado em três partes distintas. Na primeira parte (*Parte A*) após a justificação do tema procede-se a uma breve exposição sobre os objectivos da remodelação óssea, desenvolvendo após algumas considerações sobre as células do tecido ósseo, o processo biológico da remodelação óssea, com especial enfoque para o ciclo de remodelação.

Na segunda parte (*Parte B*) faz-se uma pequena revisão sobre osteoimunologia e descrevem-se alguns mecanismos subjacentes aos processos de metastização óssea, situação que assenta em alterações e desequilíbrios da remodelação óssea.

A terceira e última parte (*Parte C*) engloba toda a bibliografia consultada.

Resumo

A remodelação óssea consiste num mecanismo de substituição, ou reconstrução, de áreas de tecido ósseo de modo a preservar a sua integridade, otimizar a sua função e prevenir a sua degradação.

O objectivo da remodelação parece incluir, duas perspectivas diferentes:

Uma perspectiva mecânica dirigida para a reparação e adaptação da estrutura óssea ao meio e uma perspectiva metabólica, relacionada com a homeostasia do cálcio plasmático.

A aplicação de estímulos mecânicos tem uma profunda influência no metabolismo ósseo, podendo desencadear processos de modelação ou de remodelação. Esta permanente adaptação óssea representa uma constante resposta e interligação deste tecido ao meio, de forma a otimizar o seu desempenho funcional, visando sempre uma maior eficácia sob condições de carga.

Os mecanismos de modelação acompanham geralmente os processos de crescimento e de hipertrofia do sistema músculo-esquelético, modificando estrategicamente o tamanho e a forma das estruturas ósseas. A modelação óssea consiste na formação de tecido ósseo (onde é necessário) sem que tenha ocorrido qualquer reabsorção prévia. Por sua vez, a remodelação implica, a reconstrução de uma área óssea compreendendo sempre um processo de reabsorção antes de qualquer etapa de formação.

Pode afirmar-se, pois, que a modelação (*construção*) está mais relacionada com a prevenção dos danos, enquanto a remodelação (*reconstrução*) está mais ligada com a sua reparação. A modelação e remodelação óssea minimizam o stress alterando a estrutura óssea para evitar a ocorrência de situações de fracturas (falências) ósseas.

De referir, ainda, que a modelação e remodelação óssea permitem o reforço da resistência do osso às cargas mecânicas, sem prejuízo da sua mobilidade (o que é conseguido sem que ocorra aumento da massa óssea).

A principal vantagem conferida pela remodelação óssea em termos de evolução parece ser, a manutenção de um esqueleto substancialmente mais leve. Porém, este facto implica também que os estímulos mecânicos, mesmo os fisiológicos, provoquem deformações que acabam por ser relativamente elevadas necessitando de uma permanente remodelação. Deste modo os danos por fadiga estão sempre presentes, constituindo mesmo uma condição "necessária" à fisiologia óssea (sobrevivência e funcionalidade dos osteócitos) e aos processos de remodelação. A utilização de agentes que bloqueiem ou previnam este processo não será o procedimento mais adequado, pois ao impedir a remoção dos danos, pode acarretar efeitos nefastos.

O processo alveolar e sobretudo o osso alveolar apresenta notáveis capacidades de formação e remodelação (sendo a área óssea com maior ritmo dinâmico de todo o esqueleto). Os pequenos movimentos que experimentam continuamente os dentes são as principais causas (factores locais) de remodelação do osso alveolar.

Também os procedimentos e tratamentos ortodônticos geram pressões que se repercutem no tecido ósseo. Com efeito, a Ortodontia aproveita toda esta plasticidade

que lhe oferece o osso alveolar para, em conjunto com o ligamento periodontal, movimentar o dente sem alterar as suas relações.

O tecido ósseo é, sob um ponto de vista celular, um tecido bastante económico, sendo constituído, apenas, por duas linhas celulares. As populações de células que constituem o tecido ósseo assumem diversas formas e designações, com base na sua diferente morfologia, actividade e localização em relação à matriz calcificada. Estas células podem ser agrupadas em duas séries diferentes: células da linha osteoblástica, responsáveis pelo processo de formação da matriz óssea e células da linha osteoclástica, relacionadas com a sua reabsorção.

As células osteoprogenitoras derivam de células mesenquimatosas pluripotenciais presentes no perióstio e no estroma da medula óssea, originando 4 subpopulações principais: os pré-osteoblastos, os osteoblastos maduros, as células de revestimento ósseo e os osteócitos, sendo todas elas consideradas como diferentes estádios funcionais do mesmo tipo de célula.

Os osteoblastos são responsáveis não só pela formação da matriz óssea mas também pela sua mineralização. Estas células regulam também os processos de reabsorção, funcionando como receptores e transmissores de sinais para a remodelação óssea.

Os osteócitos, devido à sua localização, ao seu elevado número e complexa organização tridimensional, estão numa situação privilegiada para captarem as alterações da matriz óssea e os estímulos mecânicos que sobre ela actuem. Estas informações são depois transmitidas às células de revestimento e aos osteoblastos para que estas possam activar os processos de remodelação, sempre que estes sejam necessários. Assim, os osteócitos parecem estar na base do desencadear de toda a cascata de remodelação óssea, constituindo os principais mecanosensores e transdutores do tecido ósseo e ocupando uma posição central na manutenção da matriz óssea, bem como em todo o metabolismo ósseo.

O mecanismo pelo qual as forças mecânicas conseguem regular processos celulares é designado de uma forma global por mecanotransdução. Assim sendo, a mecanotransdução pode ser entendida como a conversão de um sinal de natureza mecânica (força) numa resposta celular de natureza bioquímica. Por outras palavras, pode considerar-se o mecanismo de transdução como um processo pelo qual certas células (células receptoras) detectam ou "sentem" sinais mecânicos (forças ou tensões aplicadas) gerando uma resposta celular (de natureza bioquímica) dirigida às células alvo (células efectoras). Estas últimas células vão, por sua vez, activar ou modular os processos de remodelação. Os osteócitos constituem nestas circunstâncias as células receptoras ou mecanosensoras, sendo as células de revestimento ósseo, os osteoblastos e os osteoclastos, as células efectoras.

Na série osteoclástica podemos incluir os monócitos circulantes, os monócitos presentes na medula óssea, os pré-osteoclastos e os osteoclastos.

Os osteoclastos são membros da linha celular dos monócitos-macrófagos, podendo a sua diferenciação resultar de precursores mielóides mas também de células macrofágicas já bem diferenciadas.

O processo de diferenciação das células da linha osteoclástica está muito controlado pelas células da linha osteoblástica, através de um eixo de regulação comum, vulgarmente conhecido por RANKL/RANK/OPG. Com efeito, o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea está na dependência das flutuações locais do rácio RANKL/OPG.

A remodelação óssea representa, como já foi referido, a mais notável resposta do tecido ósseo, tendo atrás de si uma complexa maquinaria celular que por sua vez está sujeita à acção de numerosos factores de regulação.

De sublinhar ainda que o mecanismo de remodelação é um processo altamente localizado.

Este fenómeno pressupõe uma completa coordenação e integração de actividades celulares controladas pela interacção de estímulos mecânicos, moléculas circulantes de natureza hormonal (com particular ênfase para a PTH) e factores de crescimento produzidos localmente. Parecem ser no entanto as moléculas produzidas ou libertadas localmente, no micro ambiente ósseo, que constituem os principais agentes moduladores do ciclo celular da remodelação, verificando-se o estabelecimento de vias de comunicação entre as diversas células ósseas que, como veremos, não são de sentido único. Neste processo concorrem/participam também outras populações celulares pertencentes ao sistema imune, sistema vascular, sistema hematopoiético que não terão, certamente, menos importância.

O ciclo celular da remodelação compreende uma série ordenada de eventos que vão converter uma superfície em repouso numa zona em remodelação seguindo uma sequência imutável de activação (**A**) - reabsorção (**R**) - formação (**F**).

As equipas celulares responsáveis por estas múltiplas actividades incluem não só células específicas do tecido ósseo como células do sistema imunitário, *osteomacs* e células endoteliais.

Nesta perspectiva, um mecanismo de tipo inflamatório parece estar na base de todo o processo de remodelação, podendo mesmo considerar-se o próprio processo de remodelação (ele próprio) como sendo uma resposta inflamatória localizada nas áreas de tecido ósseo estrutural ou funcionalmente danificado. Estas áreas podem ser reconhecidas como *non-self* e o processo de reabsorção óssea ser entendido como uma forma altamente especializada e controlada de auto imunidade.

Da comunicação e integração das células do sistema imunitário e do sistema osteoarticular, compartilhando uma base comum, surgiu uma área emergente, de contornos mal definidos, mas de estreita articulação e sincronismo, denominada osteoimunologia.

A osteoimunologia assenta num eixo de regulação comum vulgarmente conhecido por RANKL/RANK/OPG, que constitui uma ponte molecular responsável pelo *crosstalk* e íntima relação entre o sistema imune e o metabolismo ósseo. Em situações patológicas o processo de remodelação óssea sofre quase sempre um desvio para privilegiar a osteoclastogénese, conduzindo a um reforço da reabsorção óssea, relativamente à formação.

As células de natureza imunológica têm origem em células tronco presentes na medula óssea, sendo facilmente compreensível a proximidade e a estreita relação entre células ósseas e células imunitárias.

A activação do sistema imunológico (doenças inflamatórias e auto-imunes) é frequentemente acompanhada por uma perda de massa óssea como resultado de uma estimulação da actividade osteoclástica.

Em casos patológicos como a artrite reumatóide observa-se uma forte participação de linfócitos T no processo de formação dos osteoclastos, traduzindo uma contribuição determinante destas células (estimulando a produção de RANKL) para a perda da massa óssea e conseqüente deformação articular. Pode actualmente considerar-se a artrite reumatóide como uma *RANKL disease*. Uma situação bastante semelhante parece verificar-se também para a doença periodontal.

O tecido ósseo constitui um destino frequente para a instalação e formação de lesões neoplásicas secundárias. Ainda que à primeira vista a natureza mineralizada do tecido ósseo possa parecer uma barreira ao desenvolvimento de grandes formações tumorais, esta circunstância é, no entanto, facilmente contornada e ultrapassada pelas células cancerosas.

O "diálogo" entre as células cancerosas (*seed*) e o micro ambiente existente nos órgãos alvo (*soil*) irá orientar o destino das células metastáticas e a possível existência de condições para a sua proliferação e sobrevivência.

Pode afirmar-se, pois, que o tecido ósseo constitui, um terreno fértil para os processos de metastização tendo em conta que: a) é formado por áreas metabolicamente muito activas e altamente vascularizadas; b) possui um sistema vascular que permite uma fácil entrada e saída das células; c) os normais processos de remodelação óssea (necessários a uma constante adaptação deste tecido ao meio ambiente) fornecem moléculas quimiotácticas e factores de crescimento para o meio ambiente que, por um lado atraem as células cancerosas e por outro suportam o seu crescimento. Com efeito, a matriz óssea constitui um rico "armazém" de factores de crescimento que são libertados durante o *turnover* ósseo. Deste modo, as células cancerosas aí residentes encontram um cocktail de citoquinas e factores favoráveis ao

seu desenvolvimento; d) finalmente, as células cancerosas podem modular a actividade dos osteoblastos e osteoclastos a seu favor, desenvolvendo em paralelo uma rede vascular de suporte.

Como conclusão, pode afirmar-se que o tecido ósseo constitui um notável material de construção, de natureza biológica, com a singular capacidade de edificar estruturas muito resistentes que se remodelam e reparam a si próprias.

O desequilíbrio dos processos de reabsorção óssea parecem assentar sempre numa alteração do eixo RANKL/RANK/OPG.

Abstract

The dynamic nature of the skeleton is achieved by a process called «remodeling», which involves the co-ordinated actions of osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes within the bone matrix and osteoblast-derived lining cells that cover the surface of the bone. The co-ordinated actions of these cells are described as the «Basic Multicellular Unit».

A bone remodeling compartment (BRC) is created beneath the flattened osteoblast lining cells at a location near the damage, so that recruitment of precursor cells designed to become osteoclasts and osteoblasts occurs near the damage to be repaired.

Remodeling starts with signals that initiate osteoclast formation, followed by osteoclast-mediated bone resorption, a reversal period, and then a long period of bone matrix formation mediated by osteoblasts, followed by mineralization of the matrix. Bone remodeling is tightly regulated by central, systemic and local factors. The relative concentration of RANKL and OPG in bone is a major determinant to balance bone formation and resorption.

The bone and immune systems share an abundance of molecules and regulatory mechanisms. The interaction between immune and skeletal systems has long been acknowledged, but research into rheumatoid arthritis has highlighted the importance of the dynamic interplay between the two systems. Osteoimmunology analyses the interactions between bone and immune cells.

In bone destruction associated with RA, IL-17-producing helper T cells (Th 17) play a major role by inducing RANKL, and therefore RA can be considered as a RANKL disease. The same applies to other inflammatory and auto-immune disorders, as well as to cancer.

The skeleton is a common target for many cancer metastases. Several molecular mechanisms bring about cancer cells to metastasize to bone, and osteotropic cancer cells are believed to acquire a bone cell pseudo-phenotype by osteomimicry, which improve homing, adhesion, proliferation and survival in the bone microenvironment. Several microenvironmental factors improve the ability of cancer cells to develop at skeletal sites, and a reciprocal deleterious stimulation generates a vicious cycle between the tumor cells and the cells residing in the bone environment.

In some patients, bone metastases develop many years after surgical removal of the primary tumor, suggesting that the osteotropic malignant cells may have a long period of quiescence before developing a secondary lesion. The osteoblast niche, known to maintain the hematopoietic stem cell population in a quiescent status, is likely to be involved in the development of bone metastases.

Bone tissue is considered a fertile ground for metastasization since: a) it is formed by metabolically active and highly vascularized areas; b) it has a vascular system that enables an easy way-in and way-out for cells; c) normal bone remodeling processes (necessary for a constant adaptation of the tissue to the environment) supply chemotactic molecules and growth factors to the background which, on one side, attract cancer cells and, on the other side, guarantee their growth. In effect, the bone matrix is

like a rich "storehouse" of growth factors that are released during the bone turnover. As such, residing cancer cells find a cytokine and factors cocktail favorable to their development; d) finally, cancer cells can modulate the activity of osteoblasts and osteoclasts in their favor, developing in parallel a supporting vascular network.

In conclusion, it can be stated that bone tissue is a remarkable biological building material with a singular ability to assemble very resistant structures that can be self remodeled and repaired.

REMODELAÇÃO ÓSSEA

➤ Objectivos dos processos de remodelação

• Introdução

A remodelação óssea consiste num mecanismo de substituição, ou reconstrução, de áreas de tecido ósseo de modo a preservar a sua integridade, otimizar a sua função e prevenir a sua degradação.

Registos fósseis mostram a existência de sistemas de Havers e marcas evidentes de processos de reabsorção óssea em vertebrados muito primitivos. Este facto pressupõe que a remodelação óssea é quase tão antiga como o próprio tecido ósseo sendo, por certo, um mecanismo altamente vantajoso. Com efeito, os genes responsáveis pelos processos de remodelação têm conservado a sua expressão ao longo da evolução filogenética, conferindo importantes propriedades com influência determinante na capacidade de sobrevivência dos vertebrados.

A principal vantagem conferida pela remodelação óssea em termos de evolução será a manutenção de um esqueleto substancialmente mais leve e, desta forma, uma maior eficácia e velocidade de movimentos.

O processo de remodelação óssea parece orientar-se fundamentalmente para um objectivo mecânico que engloba não só uma adaptação e optimização da estrutura óssea às solicitações mecânicas, como também a remoção de áreas danificadas.

No entanto, a descoberta da importância da homeostasia dos níveis séricos de cálcio, como um eficaz meio de prevenção da tetania, veio mudar um pouco os conceitos de remodelação, passando então a ser considerados prioritariamente como um mecanismo de gestão do "banco de cálcio" ósseo. Assim, a perspectiva metabólica começou a sobrepor-se às funções mecânicas e nesta ordem de ideias, a remodelação óssea seria mais importante para retirar cálcio do osso para a circulação do que para melhorar as suas propriedades físicas.

Por outro lado, e segundo alguns endocrinologistas, o papel da remodelação óssea poderá não ser tão imprescindível para o transporte de cálcio entre o osso e o sangue, uma vez que este processo pode ser mediado pelas células de revestimento ósseo, ocorrendo assim em superfícies ósseas aparentemente "*inactivas*". Esta afirmação, que de certo modo vem reforçar a natureza mecânica da remodelação, vai certamente levantar grande controvérsia quanto aos conceitos de fisiologia óssea tradicionalmente estabelecidos, necessitando de investigações muito mais aprofundadas.

O objectivo da remodelação parece incluir, pois, duas perspectivas diferentes:

Uma perspectiva mecânica dirigida para a reparação e adaptação da estrutura óssea ao meio e uma perspectiva metabólica, relacionada com a homeostasia do cálcio plasmático.

• **Adaptação e reparação da estrutura óssea (Perspectiva mecânica)**

Uma íntima relação entre forma e função foi, desde há muito, reconhecida na arquitectura óssea. De facto, ao longo da vida, o tecido ósseo possui uma grande capacidade de adaptação aos estímulos mecânicos associados à actividade fisiológica diária. Solicitações mecânicas como as decorrentes da acção da gravidade ou da actividade muscular constituem exemplos de estímulos (estáticos e dinâmicos) fundamentais à preservação da massa óssea. Com efeito, sob condições prolongadas de imponderabilidade e/ou inactividade física, a perda de massa óssea pode ser bastante significativa. Ao invés, a actividade física leva habitualmente ao reforço do tecido ósseo, dependendo o aumento de massa óssea da intensidade e frequência dos esforços realizados.

Uma descrição minuciosa da inter-relação entre a estrutura e a função do tecido ósseo foi pela primeira vez formalmente estabelecida nos finais do século XIX pelo anatomista Júlio Wolff, sendo a partir daí conhecida como lei de Wolff [1]. Wolff afirmava que os elementos trabeculares do esqueleto não foram concebidos apenas para realizar uma função específica de suporte, mas também para responder às forças a que estão sujeitos, alterando constantemente a sua constituição estrutural, durante todo o tempo de vida do indivíduo. De acordo com esta lei, as características geométricas dos ossos e a distribuição dos seus componentes micro estruturais são determinadas pela magnitude e direcção das tensões a que estão submetidas. Assim, as trabéculas ósseas encontram-se preferencialmente alinhadas segundo a direcção das tensões máximas aplicadas, o que origina uma distribuição anisotrópica da resistência e rigidez do osso, ou seja, estas propriedades variam com a direcção considerada. Cada osso constitui, então, uma estrutura tridimensional optimizada e economicamente muito eficaz, para melhor resistir aos esforços mecânicos aplicados. Está mesmo estabelecido como princípio cardinal que o tecido ósseo apresenta sempre "*maximal strength with minimal mass*" [2].

Apesar deste paradigma, no qual a forma está *a priori* relacionada com a função estar actualmente a ser posto em causa, continua a aceitar-se uma relação dinâmica entre a estrutura do tecido ósseo e o meio envolvente. Wolff, Frost e E. Seeman afirmam que "*the structure of bone determines the loads it tolerates. The reverse also applies - the load imposed on bone determines its structure.*" [1,3,4].

De um modo geral, pode afirmar-se que o tecido ósseo é um material duro e particularmente resistente à compressão axial, possuindo ainda um certo grau de flexibilidade e capacidade de absorção de choques (tenacidade). Com efeito, sendo essencialmente constituída por cristais de hidroxiapatite e fibras de colagénio, a matriz óssea combina, num só, as propriedades de ambos os materiais. Isto é, a dureza e rigidez do componente mineral e a elasticidade e flexibilidade das fibras colagénicas. A elasticidade do material significa que este readquire a sua forma inicial, quando cessa a força aplicada. Ao contrário, a plasticidade traduz-se por uma deformação permanente.

Victor Pereira

Quando a extensão da deformação ultrapassa determinado limite, ocorre a ruptura/fractura do material.

Por outro lado, o tecido ósseo, tal como quaisquer outros materiais, pode sofrer e acumular danos estruturais por fadiga (as micro fissuras e danos causadas pelo uso continuado acabam por produzir fadiga). Mas, ao contrário deles, o tecido ósseo possui a capacidade de detectar e localizar a extensão dos danos, bem como mecanismos eficientes para os remover, restaurando o estado inicial, ou seja, possui uma aptidão intrínseca de auto-reparação. Esta constante capacidade de resposta do tecido ósseo é conseguida essencialmente através dos processos de remodelação.

A aplicação de estímulos mecânicos tem uma profunda influência no metabolismo ósseo, podendo desencadear processos de modelação ou de remodelação.

Os mecanismos de modelação acompanham geralmente os processos de crescimento e de hipertrofia do sistema músculo-esquelético, modificando estrategicamente o tamanho e a forma das estruturas ósseas. A modelação óssea consiste na formação de tecido ósseo (onde é necessário) sem que tenha ocorrido qualquer reabsorção prévia e representa não só o resultado do "*blueprint genético do indivíduo*", como também uma resposta adaptativa ao micro-ambiente. Assim sendo, associa factores genéticos a factores epigenéticos. Esta adaptação gradual da estrutura à carga pode ainda ser considerada como um processo de prevenção (antecipada) de danos.

Por sua vez, a remodelação implica, a reconstrução de uma área óssea compreendendo sempre um processo de reabsorção antes de qualquer etapa de formação.

Pode afirmar-se, pois, que a modelação (*construção*) está mais relacionada com a prevenção dos danos, enquanto a remodelação (*reconstrução*) está mais ligada com a sua reparação. A modelação e remodelação óssea minimizam o stress alterando a estrutura óssea para evitar a ocorrência de situações de fracturas (falências) ósseas.

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre formação e reabsorção. No entanto, se os estímulos mecânicos forem muito reduzidos "*disuse*", a reabsorção óssea supera a formação, causando perdas de massa óssea que podem ser bastante significativas. Convém aqui realçar que a falta de estímulos mecânicos tem também uma grande repercussão a nível da patologia dentária. Com efeito, se um dente não é estimulado (dentes inclusos ou que perderam o seu antagonista) apresenta um adelgaçamento das corticais e diminuição da extensão e espessura das trabéculas ósseas adjacentes. De igual modo, a extracção de elementos dentários é geralmente acompanhada do desaparecimento do osso alveolar. Os rebordos alveolares são então reabsorvidos, persistindo apenas o osso basal dos maxilares.

Se, ao invés, os estímulos mecânicos forem intensos e frequentes "*overuse*", o tecido ósseo é habitualmente reforçado pela deposição de novo tecido e aumento da massa óssea (modelação). No entanto, sob condições de excesso de carga pode sofrer e acumular danos estruturais (fadiga) que acabam por estimular também a remodelação. Convém realçar aqui, como será referido mais adiante, que os estímulos mecânicos

fisiológicos possuem intensidade e frequência suficientes para originarem danos por fadiga no tecido ósseo.

Nesta perspectiva, pode entender-se o processo de reabsorção como uma forma, altamente especializada e controlada, de *auto-imunidade* visando substituir uma área de tecido ósseo estrutural ou funcionalmente comprometida ou danificada (reconhecida com *non self*).

Esta permanente adaptação óssea representa uma constante resposta e interligação deste tecido ao meio, de forma a otimizar o seu desempenho funcional, visando sempre uma maior eficácia sob condições de carga. De referir ainda que a modelação e remodelação óssea permitem o reforço da resistência do osso às cargas mecânicas, sem prejuízo da sua mobilidade (o que é conseguido sem que ocorra aumento da massa óssea).

Uma pequena nota para sublinhar mais uma vez que o processo alveolar e sobretudo o osso alveolar apresenta notáveis capacidades de formação e remodelação (sendo a área óssea com maior ritmo dinâmico de todo o esqueleto). Os pequenos movimentos que experimentam continuamente os dentes são as principais causas (factores locais) de remodelação do osso alveolar.

Também os procedimentos e tratamentos ortodônticos geram pressões que se repercutem no tecido ósseo. O osso alveolar (Figura 1) é muito sensível às forças de pressão (provocando áreas de reabsorção) e às forças de tensão (que levam à formação de novo tecido ósseo). Assim, a Ortodontia aproveita toda esta plasticidade que lhe oferece o osso alveolar para, em conjunto com o ligamento periodontal, movimentar o dente sem alterar as suas relações [5].

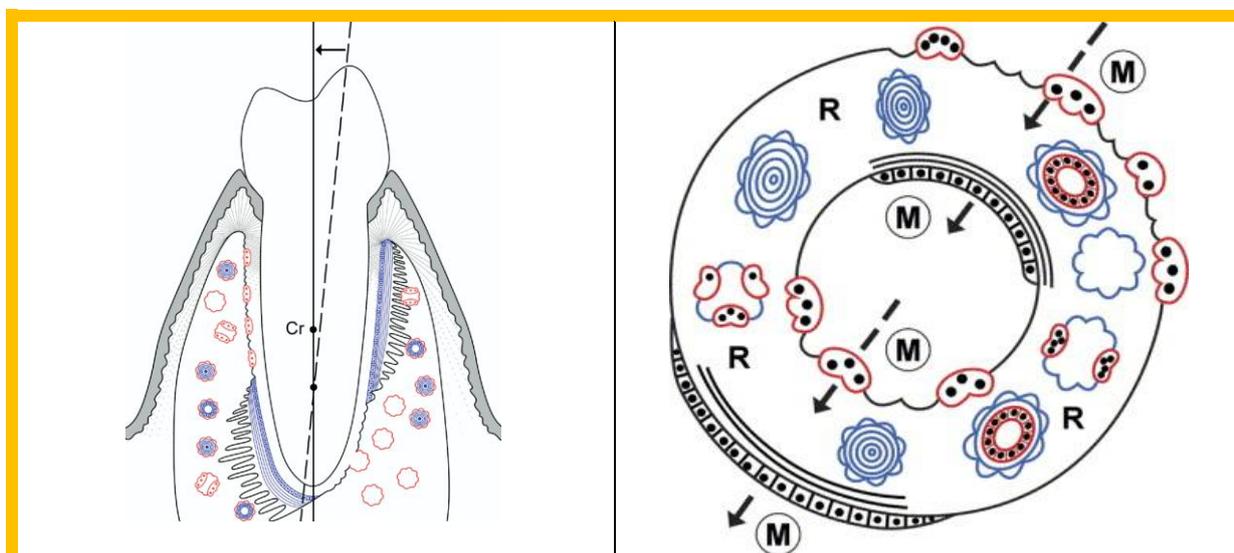


Figura 1 - Representação esquemática da inter-relação e integração da actividade de reabsorção e de formação durante o movimento ortodôntico. Adaptado de Roberts WE, et al (2006) [6,7].

O conhecimento deste jogo de forças, as suas consequências e o mecanismo molecular a elas subjacentes, abre cada vez maiores perspectivas de intervenção e eficácia clínica, na área da Ortodontia e Implantologia.

A principal vantagem conferida pela remodelação óssea em termos de evolução parece ser, como já foi referido, a manutenção de um esqueleto substancialmente mais leve. Os benefícios mais óbvios de um esqueleto leve têm a ver com uma maior eficácia em termos de velocidade, "endurance" e energia, conferindo importantes capacidades de sobrevivência.

No entanto, a relativa leveza do osso pode também estar na origem de uma maior acumulação de danos por fadiga. Mesmo sob condições fisiológicas normais, os esforços podem ser demasiado elevados em relação ao que a estrutura do osso pode suportar. Deste modo, pode ocorrer uma maior propagação de fissuras e assim se compreende que os danos por fadiga possam surgir no decurso da actividade normal de um indivíduo. A fadiga parece ser portanto um fenómeno sempre presente, se não mesmo necessário. De facto, mesmo o *stress* fisiológico do dia-a-dia provoca com o tempo o aparecimento de fadiga na estrutura óssea. Estes danos enfraquecem o tecido ósseo estando associados tanto à apoptose dos osteócitos, como à activação dos fenómenos de remodelação relacionados com a sua reconstrução.

Outra importante vantagem conferida pela remodelação é a maior flexibilidade, menor rigidez e maior tenacidade (maior capacidade de absorção e armazenamento de energia sem fracturar) da estrutura óssea.

Existem algumas vantagens e algumas desvantagens entre rigidez e resistência (conferidas por um maior grau de mineralização) e a tenacidade e capacidade de absorção de energia (associadas a mais baixos teores de mineralização). De facto aumentos relativamente pequenos no conteúdo mineral resultam em grandes aumentos de resistência, mas também em grandes reduções na tenacidade. O equilíbrio ideal entre rigidez e resistência ao choque pode ser muito difícil de estabelecer para qualquer osso em particular, mas os extremos são certamente indesejáveis e situações a evitar. Um tecido ósseo localizado "*in the middle-range*" será regulado maioritariamente pela frequência dos seus processos de remodelação e conseqüente "*turnover*".

Importa acentuar ainda que as forças aplicadas são fundamentais para assegurar a vitalidade das células ósseas. Como estas células se encontram imobilizadas no seio de uma matriz mineralizada, o transporte de nutrientes e oxigénio é feito através dos fluidos que circulam na rede de canaliculos e não por difusão. São as forças mecânicas que, ao originarem deformações na matriz, causam a deslocação destes fluidos.

Assim, a sobrevivência dos osteócitos no interior da matriz óssea depende da capacidade de deformação desta matriz, como resposta aos estímulos mecânicos. Com efeito, os osteócitos necessitam da existência de um fluxo constante e com um certo nível de pressão hidrostática no sistema lacuno-canalicular. Esta interacção, entre o movimento do fluido e os osteócitos, constitui um estímulo poderoso e imprescindível à manutenção da sua actividade celular.

Na verdade parece poder afirmar-se que num tecido ósseo, em condições normais existe um ténue estado de equilíbrio entre rigidez e resistência versus tenacidade e flexibilidade e ainda entre nutrição fisiológica dos osteócitos versus danos por fadiga.

Em síntese, a manutenção de um esqueleto leve tem conferido manifestas vantagens mas, por outro lado, implica também que os estímulos mecânicos, mesmo os fisiológicos, provoquem deformações que acabam por ser relativamente elevadas necessitando de uma permanente remodelação. Deste modo os danos por fadiga estão sempre presentes, constituindo mesmo uma condição "necessária" à fisiologia óssea (sobrevivência e funcionalidade dos osteócitos) e aos processos de remodelação.

Uma pequena nota final para sublinhar que se a actividade diária normal resulta, ao fim de algum tempo, no aparecimento de micro danos e se os processos de remodelação constituem o único meio de os reparar, então todos os mecanismos que inibam a remodelação óssea levam a uma acumulação de micro danos. Este facto está demonstrado experimentalmente em cães tratados com bifosfonatos (residronato e alendroato), sendo o aumento das lesões inversamente proporcional à diminuição da frequência da activação dos processos de remodelação. Assim, pode afirmar-se que os mecanismos de remodelação óssea são necessários não apenas para o normal funcionamento e constante capacidade de adaptação do tecido ósseo, como também para prevenir os micro danos acumulados por fadiga. A utilização de agentes que bloqueiem ou previnam este processo não será o procedimento mais adequado, pois ao impedir a remoção dos danos, pode acarretar efeitos nefastos.

• Homeostasia do cálcio plasmático (Perspectiva metabólica)

O tecido ósseo contém no seu conjunto 99% do cálcio do organismo e funciona como reserva deste ião, cuja concentração no sangue (calcémia) deve ser mantida constante. Por este motivo verifica-se um intercâmbio contínuo entre o plasma sanguíneo e os ossos. O cálcio absorvido (da alimentação) e que faria aumentar a concentração sanguínea deste ião, é rapidamente depositado no tecido ósseo. De uma maneira inversa o cálcio dos ossos é também rapidamente mobilizado, quando diminui a sua concentração no sangue. Tradicionalmente existem dois mecanismos de mobilização do cálcio depositado no tecido ósseo. Ou uma simples transferência dos iões de Ca⁺ directamente dos cristais de hidroxiapatite para o líquido intersticial, ou um mecanismo decorrente da acção da Paratormona (PTH). Enquanto este último processo está associado à actividade dos osteoclastos, o primeiro, é puramente físico, favorecido pelos grandes cristais de hidroxiapatite.

São vários os investigadores que afirmam que uma grande maioria das áreas de reabsorção parece não estar espacialmente relacionada com zonas de micro dano e muitas áreas de micro fissuras não estão associadas a processos de reabsorção. Este facto parece reforçar um antigo conceito de que a maioria dos processos de remodelação

teriam como objectivo primário um propósito metabólico, particularmente relacionado com a homeostasia do cálcio.

A este respeito Parffit et al (1995) [8] referem ainda que o "turnover" do tecido ósseo esponjoso presente nas vértebras é consideravelmente maior do que o necessário para manter uma boa capacidade mecânica. Neste contexto, afirmam também que o "turnover" ósseo é maioritariamente regulado por factores sistémicos (hormonais ou não) que não estão relacionadas com objectivos mecânicos, nem estão orientados para localizações anatómicas precisas. Estes autores descrevem mesmo a remodelação como: "*redundant, surplus, spare or stochastic*".

Onde, quando e como se estabelece a interacção entre o sistema de regulação hormonal e mecânico continua uma questão em aberto. De facto, é ainda difícil de compreender a ligação entre o controlo central do mecanismo de remodelação e a regulação feita a nível regional (visando uma adaptação estratégica e localizada a solicitações mecânicas ou à remoção de danos).

Por outro lado, parece confirmar-se que as células de revestimento ósseo conseguem "manipular" a solubilidade do cálcio sem que haja activação dos característicos e habituais mecanismos de remodelação. Grubb et al (1979) [10] demonstraram a rápida entrada e saída de cálcio do osso como resposta à administração de PTH e Calcitonina, sem qualquer recurso a processos visíveis de reabsorção osteoclástica. Estas observações foram mais tarde confirmadas por outros autores tendo sido atribuído às células de revestimento esta capacidade. Apesar destas evidencias continuam ainda muitas questões em aberto que necessitam de ser esclarecidas, apontando as investigações feitas até ao presente para a existência de proteínas não colagénicas (localizadas entre as células e a superfície da matriz mineralizada) que teriam uma influência determinante na solubilidade dos cristais de hidroxiapatite. Parece, assim, que muito mais cálcio entra e sai do tecido ósseo como consequência da presença destas proteínas e do seu equilíbrio, do que propriamente pelos mecanismos de reabsorção osteoclásticas.

Em síntese:

Considerando a problemática anteriormente descrita e seguindo Parffit et al (1995) [8] pode afirmar-se que apesar de muitas e consideráveis incertezas é possível estabelecerem-se dois conceitos importantes:

a) Muitos processos de remodelação "*Targeted Bone remodelling*" são dirigidos para a remoção e substituição de zonas de fadiga;

b) Muitos outros não parecem satisfazer estes objectivos servindo outros propósitos, metabólicos ou não, através de "*stochastic*" ou "*Nontargeted bone remodelling*".

Em conformidade com esta ideia, estão também muitos outros autores que referem mais uma vez que os processos de remodelação activados por e em estreita proximidade com áreas de micro danos são denominados como "*Targeted Bone remodelling*", em contraposição com uma remodelação aleatória "*Nontargeted bone remodelling*" que presumivelmente serviria outras funções, como a homeostasia do cálcio.

BIOLOGIA DA REMODELAÇÃO ÓSSEA

➤ **Células do tecido ósseo – breves considerações**

O tecido ósseo é, sob um ponto de vista celular, um tecido bastante económico, sendo constituído, apenas, por duas linhas celulares. As populações de células que constituem o tecido ósseo assumem diversas formas e designações, com base na sua diferente morfologia, actividade e localização em relação à matriz calcificada. Estas células podem ser agrupadas em duas séries diferentes: células da linha osteoblástica, responsáveis pelo processo de formação da matriz óssea e células da linha osteoclástica, relacionadas com a sua reabsorção.

• **Células da linha osteoblástica**

As células da linha osteoblástica têm origem nas células mesenquimatosas indiferenciadas e pluripotenciais, tendo sido tradicionalmente consideradas de localização exclusiva no perióstio e no estroma da medula óssea. As células da linha osteoblástica integram quatro subpopulações principais: os **pré-osteoblastos**, os **osteoblastos maduros**, as **células de revestimento ósseo** e os **osteócitos**, sendo todas elas consideradas como diferentes estádios funcionais da mesma célula. Uma série complexa de etapas de proliferação e diferenciação permite que as células mesenquimatosas pluripotenciais se transformem em osteoblastos maduros [11].

Os **pré-osteoblastos** são considerados células precursoras, mas já envolvidas na diferenciação osteoblástica representando um estádio intermédio da diferenciação. Estas células encontram-se geralmente perto das superfícies de formação óssea, sob a forma de células alongadas, apresentando uma reduzida capacidade proliferativa. Por outro lado vão adquirindo progressivamente um fenótipo osteoblástico.

O desenvolvimento embrionário e a diferenciação dos osteoblastos são controlados por factores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), e o factor de crescimento de transformação β (TGF- β) que através de factores de transcrição vão activar genes associados a proteínas específicas dos estádios mais precoces da formação da matriz óssea.

Osteoblastos

Os osteoblastos tornam-se maduros quando atingem a superfície óssea e apresentam-se, então como células cúbicas, altamente polarizadas, dispostas em paliçada (frequentemente designadas por epitélio osteóide), (Figura 2). Entre estas células formam-se junções comunicantes (*gap junctions*), que são fundamentais para a ligação e comunicação entre células adjacentes.

Os **osteoblastos maduros** são células já sem capacidade de divisão mas metabolicamente muito activas.

Entre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão o colagénio tipo I e

diversas proteínas não colagénicas como a osteopontina, a osteocalcina e a sialoproteína óssea entre outras. Estas proteínas não colagénicas têm uma importância fundamental no processo de mineralização, ou seja, na ligação do colagénio aos cristais minerais de hidroxiapatite. Os osteoblastos apresentam uma forte reacção química para a fosfatase alcalina (localizada na membrana celular), que desaparece quando as células se tornam enclausuradas na matriz, como osteócitos. Ainda neste contexto, é necessário sublinhar o facto de os osteoblastos sintetizarem muitos e variados factores de crescimento, que ficam incorporados na matriz óssea, desempenhando um papel determinante, tanto na formação de tecido ósseo como na diferenciação e na actividade dos osteoclastos.

Os osteoblastos são responsáveis não só pela formação de uma matriz orgânica mas, também, pela sua mineralização. De facto, o tecido ósseo é constituído por uma fase mineral, formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatite, que assenta numa organizada matriz colagénica (fase orgânica). A combinação da fase mineral e da fase orgânica confere ao tecido ósseo propriedades biomecânicas únicas.

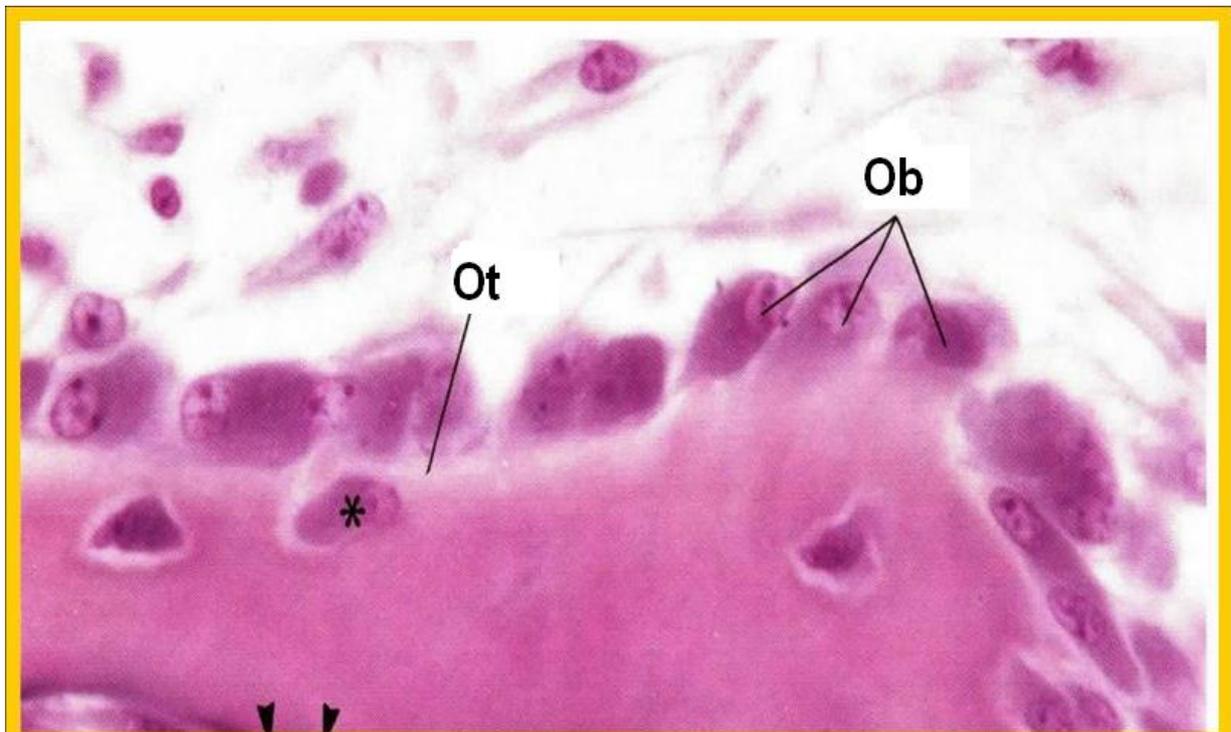


Figura 2 – Osteoblastos (Ob) na periferia de uma trabécula óssea em formação. É visível, também, a presença de osteóide (Ot) e de matriz mineralizada. Adaptado de Palma, P. (2009) [12].

As células osteoblásticas regulam também os processos de remodelação funcionando como receptores e transmissores de sinais para a remodelação óssea. Com efeito, à excepção da calcitonina, todas as hormonas e muitos factores de crescimento e citoquinas que controlam a reabsorção do tecido ósseo, têm receptores nos osteoblastos e não nos osteoclastos. Tudo indica, portanto, que são as células osteoblásticas e não os osteoclastos que desencadeiam o processo de reabsorção óssea.

Terminado o período de secreção activa, os osteoblastos achatam-se e transformam-se em células de revestimento ósseo ou em osteócitos, podendo ainda desaparecer do local de formação óssea, provavelmente por apoptose.

As **células de revestimento ósseo** (lining cells) formam uma camada contínua de células achatadas que reveste a maior parte da matriz calcificada, situando-se ao longo das superfícies do endóstio. Estas células apresentam uma capacidade de síntese reduzida, sendo consideradas quiescente ou de repouso. Porém, podem reconverter-se em células osteoblásticas activas, se devidamente estimuladas, sendo-lhe atribuído um papel cada vez mais relevante nos processos de remodelação óssea (fase de reversão).

O osteoblasto ao envolver-se completamente na matriz óssea calcificada, fica aprisionado em cavidades denominadas por lacunas ou osteoplastos, diferenciando-se deste modo em osteócito.

Osteócitos

Os **osteócitos** apresentam uma morfologia muito típica e uma organização tridimensional muito intrincada, encontrando-se estrategicamente colocados e regularmente espaçados no interior de toda a matriz mineralizada. Neste âmbito, importa referir a existência de dois tipos fundamentais de tecido ósseo: o tecido ósseo esponjoso e o tecido ósseo compacto.

O tecido ósseo esponjoso ou trabecular é caracterizado por estar constituído por trabéculas delimitando amplas cavidades inter-comunicantes contendo medula óssea. O tecido ósseo compacto ou cortical constitui geralmente a imagem de marca deste tecido (Figura 3), apresentando-se composto por lamelas ósseas concêntricas em torno de um canal central formando os conhecidos sistemas de Havers ou osteónios. Cada lamela óssea tem uma orientação aproximadamente perpendicular à lamela consecutiva. A periferia destes sistemas está frequentemente marcada por uma linha hipermineralizada, designada por linha cimentante [13,14]. Esta zona define uma fronteira entre os diversos sistemas de Havers ou entre estes e os restos de antigos sistemas já parcialmente reabsorvidos. Esta organização do tecido ósseo compacto em lamelas representa um compromisso entre a solidez e a resistência deste tecido e a possibilidade das suas células se nutrirem e comunicarem de forma adequada, mesmo quando retidas no interior de uma matriz mineralizada.

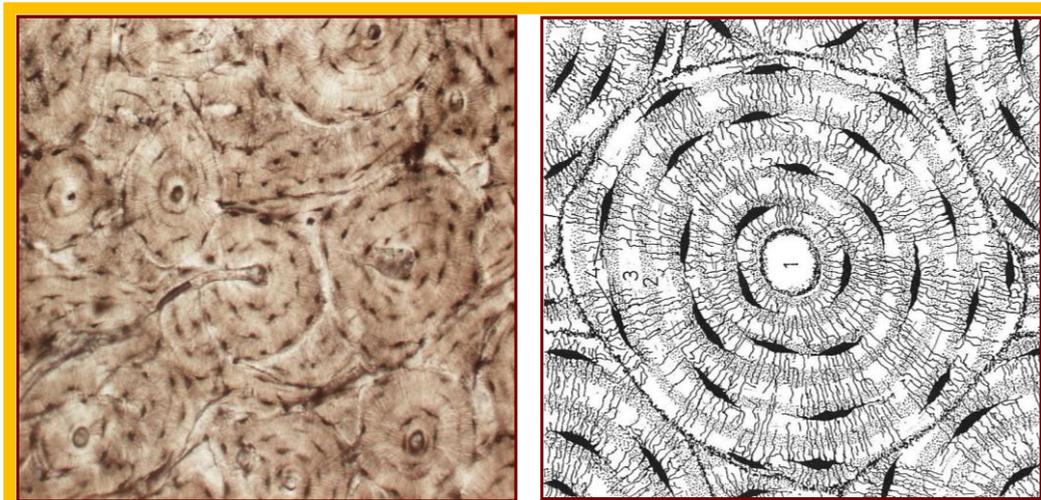


Figura 3 - Corte histológico de um tecido ósseo compacto (obtido por desgaste) pondo em evidência a organização de sistemas de Havers formados por lamelas ósseas concêntricas (2 e 3) em torno de um canal central (1). São também visíveis as lacunas dos osteócitos (4) e uma complexa rede de canalículos ósseos. Imagem gentilmente cedida pelo Instituto de Histologia e Embriologia da FMUC.

Os osteócitos são células altamente ramificadas, localizadas nas suas lacunas ósseas, comunicando entre si e com as células da superfície óssea, através de uma rede de canalículos, que contêm os seus numerosos prolongamentos citoplasmáticos e que permitem a passagem de nutrientes e de muitas outras substâncias. A vida do osteócito depende deste processo de comunicação e de condução de nutrientes e a vida da matriz óssea depende do osteócito.

Os osteócitos constituem, as células mais numerosas (existem aproximadamente 10 vezes mais osteócitos do que osteoblastos) e com maior tempo de sobrevivência do tecido ósseo.

Os prolongamentos celulares dos osteócitos situados no interior dos canalículos encontram-se, também, interligados por junções comunicantes (*gap junctions*), formando uma rede que é conhecida como *spider's web of bone* [4], apresentando uma profunda analogia com a rede «neuronal» que se observa no tecido nervoso. Perante esta observação Nijweide et al (2002) [13]. Chega mesmo a colocar esta interessante questão: «*Are the osteocytes the nerve cells of the mineralized bone matrix?*».

Com efeito, os osteócitos formam uma fantástica e complexa rede celular que põe em comunicação não só os osteócitos entre si, como também estabelecem uma íntima ligação às células presentes nas superfícies de revestimento interno e externo das estruturas ósseas (endóstio e perióstio).

Facilmente se compreende que estas células se encontrem numa situação privilegiada para captar e transmitir quaisquer alterações existentes na matriz óssea, formando uma rede interna capaz de "sentir" toda a estrutura óssea como uma única entidade. É já hoje, por demais evidente o papel dos osteócitos no desencadear dos processos de remodelação, constituindo os principais mecanosensores e transdutores do tecido ósseo.

Seeman E. (2006) [4] descreve desta forma interessante o papel do osteócito no desencadear de toda a cascata de remodelação: *"in the cellular symphony of bone remodelling the osteocytes is one the most important members of the orchestra, if not the first violinist or conductor"* [4].

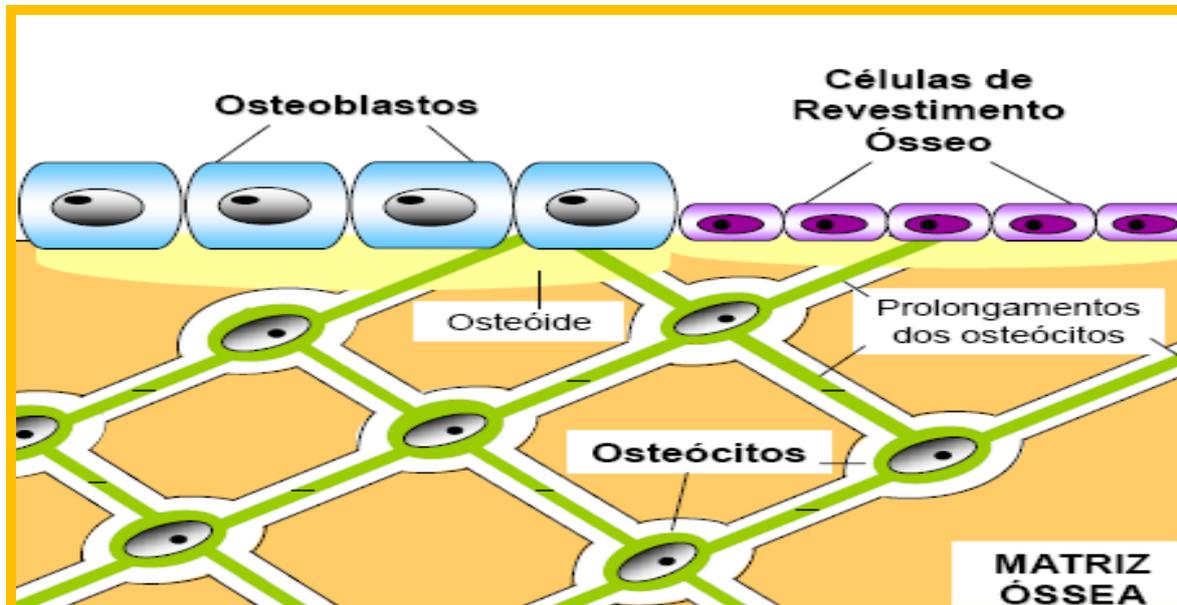


Figura 4 - Esquema representativo da distribuição e localização na matriz óssea das células da linha osteoblástica. Os osteoblastos e as células de revestimento ósseo encontram-se dispostos numa camada contínua, à superfície da matriz óssea (uma zona de matriz orgânica não calcificada, denominada por osteóide, separa estas células da matriz calcificada). Os osteócitos encontram-se situados no interior de lacunas existentes na matriz óssea. Por sua vez, uma profusa rede de canalículos interligam as lacunas entre si e alojam os prolongamentos dos osteócitos. Este conjunto (osteócitos e sistema lacuno-canalicular) forma uma complexa rede que põe em comunicação os osteócitos, os osteoblastos e as células de revestimento ósseo. Adaptado de Faloni APS (2006) [15].

Parece oportuno fazer aqui algumas considerações sobre a actividade de mecanotransdução dos osteócitos.

A mecanotransdução pode ser entendida como a conversão de um sinal de natureza mecânica (força) numa resposta celular de natureza bioquímica. Por outras palavras, pode considerar-se o mecanismo de transdução como um processo pelo qual certas células (células receptoras) detectam ou "sentem" certos sinais mecânicos (forças ou tensões aplicadas) gerando uma resposta celular (de natureza bioquímica) dirigida às células alvo (células efectoras). Estas últimas células vão, por sua vez, activar ou modular os processos de remodelação. Os osteócitos constituem nestas circunstâncias as células receptoras ou mecanosensoras, sendo as células de revestimento ósseo, os osteoblastos e os osteoclastos, as células efectoras.

De realçar, porém, que os osteócitos não respondem directamente aos estímulos mecânicos que atingem a matriz mineralizada mas respondem (indirectamente) às alterações e deformações do fluido extra celular existente no sistema lacuno-canalicular. Assim, a deformação da matriz óssea (que ocorre pela aplicação de uma determinada força) pode causar diferenças de pressão no fluido que preenche os canalículos,

alterando o seu fluxo (isto é, a sua velocidade). É nesta interacção, entre o movimento do fluido e os osteócitos, que reside a chave da mecanotransdução. Estas alterações do meio extra celular (variações de pressão e velocidade dos fluidos) são, pois, captadas pelos osteócitos que as convertem em sinais e mensagens moleculares, que serão transmitidas, às células efectoras quer através dos prolongamentos celulares e *gap junctions* (activando a rede intracelular de comunicação) quer por difusão no fluido extra celular. É cada vez mais consensual que estes mecanismos não actuam de forma isolada, mas sim em sinergia, observando-se diversas vias alternativas em simultâneo.

Importa acentuar, como já foi referido, que as forças mecânicas aplicadas na matriz óssea são fundamentais para assegurar a vitalidade das células ósseas. Com efeito, a falta de estímulos mecânicos conduz sempre e a curto prazo à apoptose dos osteócitos (a apoptose dos osteócitos pode ocorrer em apenas três dias de imobilização) e à perda de massa óssea.

Assim a sobrevivência dos osteócitos no interior da matriz óssea depende da capacidade de deformação desta matriz, como resposta às forças mecânicas. Esta interacção, entre o movimento do fluido e os osteócitos, constitui um estímulo poderoso e imprescindível à manutenção da sua actividade celular, desencadeando também mecanismos que aumentam a resistência mecânica do osso.

Por outro lado, a presença de áreas de matriz danificada ou comprometida (pela presença de micro fissuras) ao provocar uma restrição na acessibilidade dos osteócitos aos nutrientes e oxigénio, leva também à sua apoptose. A apoptose dos osteócitos desencadeia quase sempre processos de remodelação óssea, verificando-se geralmente uma forte associação, no tempo e no espaço, entre micro fissuras, apoptose dos osteócitos e remodelação óssea [16].

Em síntese: em condições fisiológicas existe, no tecido ósseo, uma íntima relação e integração entre estímulos mecânicos e respostas celulares, visando para além da sobrevivência e funcionalidade dos osteócitos, uma constante adaptação ou reparação da micro estrutura óssea. Os processos de remodelação são a tradução funcional destas respostas celulares, sendo os osteócitos os principais "guardiães" do tecido ósseo.

• Osteoclastos e osteoclastogénese

Osteoclastos

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas (Figura 5 e 6) altamente especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea, desenvolvendo, para este fim, uma eficaz e complexa maquinaria (que lhes confere características e capacidades únicas). Podem ser observados nas superfícies ósseas, principalmente no endóstio e, ocasionalmente, na superfície do perióstio. A região óssea que está a ser reabsorvida apresenta a forma de uma cripta ou lacuna recebendo a designação de lacuna de Howship.

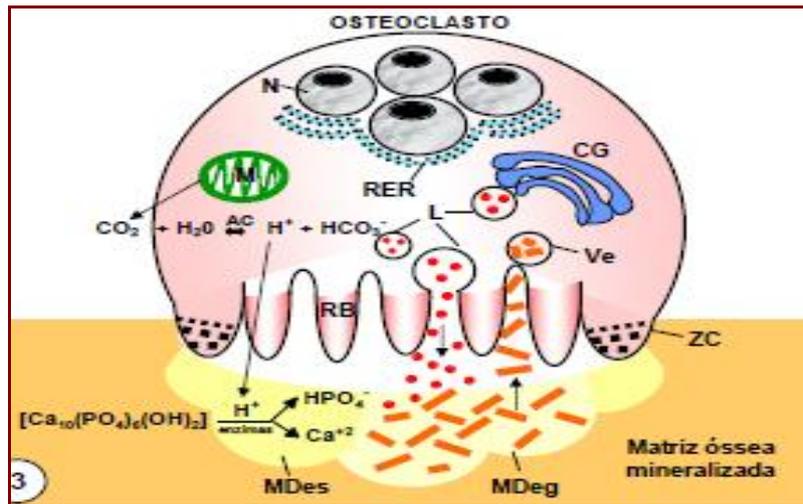


Figura 5 – Osteoclasto em actividade de reabsorção. O compartimento imediatamente subjacente à bordadura em escova (RB) constitui o local onde ocorre a reabsorção óssea. No interior do osteoclasto, a anidrase carbónica (AC) promove a conversão de gás carbónico (CO_2) e água (H_2O) em iões hidrogénio (H^+) e bicarbonato (HCO_3^-): A bomba de prótons, localizada na membrana da RB, promove a libertação dos iões H^+ para o micro ambiente onde se processa a reabsorção óssea. A acidificação, promovida pelos iões H^+ , contribui para a desmineralização da matriz óssea, ocorrendo a dissolução dos cristais de hidroxiapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] e consequente libertação de cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (HPO_4^-). Segue-se, então, a secreção de enzimas lisossomais. Estas enzimas são responsáveis pela degradação das proteínas colagénicas e não-colagénicas da matriz. Os produtos da degradação da matriz orgânica são internalizados na RB, por meio de vesículas (Ve) e transportados para o interior do osteoclasto, sendo posteriormente, conduzidos para o meio extra celular. N, núcleos; M, mitocôndria; L, lisossomos; RER, retículo endoplasmático rugoso; CG, complexo de Golgi; MDes, matriz óssea desmineralizada; MDeg, matriz óssea parcialmente degradada. Adaptado de Faloni APS (2006) [15].

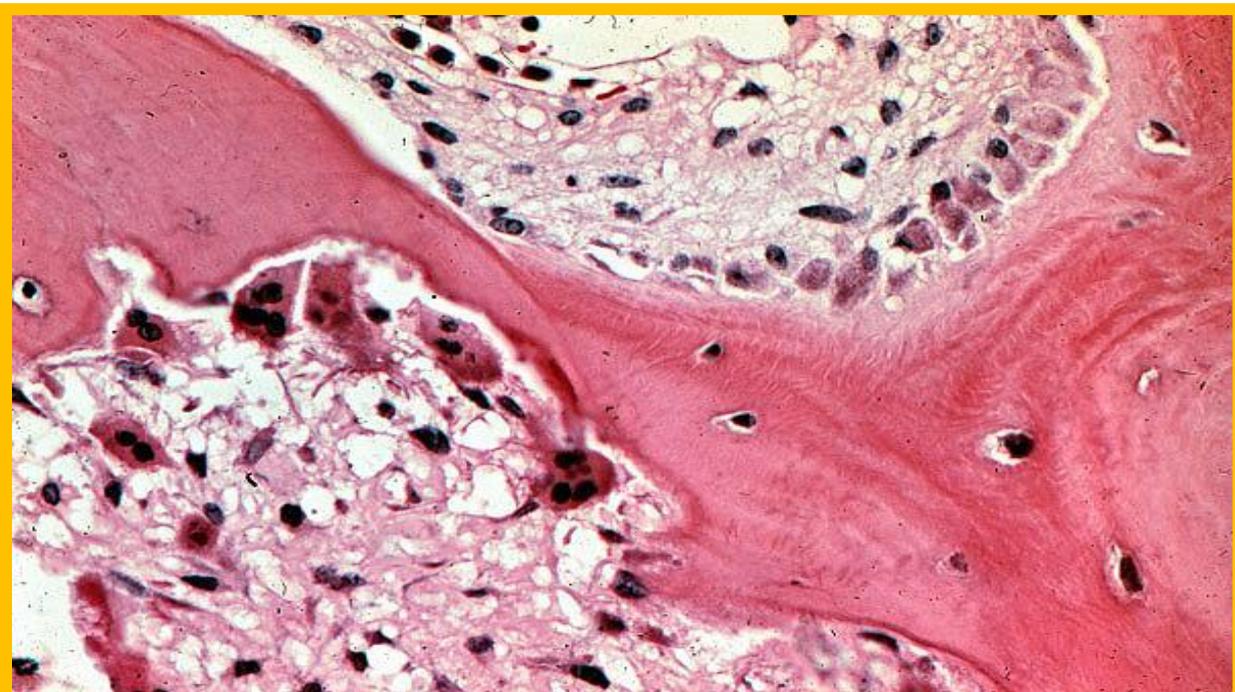


Figura 6 – Aspecto em microscopia de luz de osteoclastos (células multinucleadas) presentes em lacunas de Howship na superfície de uma trabécula óssea. É também visível a presença de osteoblastos (células mononucleadas) formando um epitélio osteóide. Corte histológico de material descalcificado corado com HE. Adaptado de Palma, P. (2009) [12].

A reabsorção propriamente dita é um processo altamente organizado e sequencial (levado a cabo na lacuna de reabsorção) constituído por duas fases consecutivas. A primeira fase consiste num processo de acidificação do compartimento atrás mencionado (através da produção de protões H^+ e aniões Cl^-), provocando a dissolução dos cristais de hidroxiapatite, constituintes da fase mineral da matriz óssea. Numa segunda fase, tem lugar a degradação completa da fase orgânica por acção de numerosas enzimas proteolíticas (catepsinas e metaloproteínas da matriz) [17].

Na série osteoclástica podemos incluir os monócitos circulantes, os monócitos presentes na medula óssea, os pré-osteoclastos e os osteoclastos. Os osteoclastos são membros da linha celular dos monócitos-macrófagos, podendo a sua diferenciação resultar de precursores mielóides (medula óssea – série hematopoiética) mas também de células macrofágicas já bem diferenciadas. Assim sendo, pode considerar-se que o osteoclasto não será uma verdadeira célula óssea, mas sim uma célula sanguínea altamente especializada que possui muitas características imunológicas.

A semelhança filogenética entre o sistema imunológico e o osteoarticular resulta numa forte comunicação e integração entre estes dois sistemas, ocupando o osteoclasto uma posição chave [17].

Com efeito, os osteoclastos são geralmente células com uma má “reputação” estando, quase sempre, associadas a desequilíbrios e situações patológicas. Schilling et al (2006) [18], num artigo muito original e interessante a propósito de osteoclastos, colocam a seguinte questão: “*Why does bone in contrast to all other tissues entertain a cell to destruct itself?*” respondendo logo a seguir que “*the reason may be that the osteoclast is not a true bone cell, but rather a highly specialized blood cell*”. A este respeito referem, ainda, que “*bone resorption can be viewed as a fight between bone marrow and bone for the bone marrow space*”.

Parece importante sublinhar, mais uma vez, que os osteoclastos são as células com maior responsabilidade na dinâmica dos processos de remodelação dos tecidos duros.

Osteoclastogénese

O processo de formação, desenvolvimento e maturação dos osteoclastos engloba múltiplas etapas.

Para iniciar o seu processo de diferenciação, os osteoclastos necessitam da presença de células osteoblásticas (ou de células mesenquimatosas do estroma da medula óssea) capazes de produzir factores de diferenciação e activação, que incluem, entre outros, o factor estimulador de colónias de macrófagos (*macrophage colony stimulating Factor* – M-CSF).

Os osteoblastos expressam ainda (e na sua superfície) uma outra proteína transmembranar conhecida por RANKL (ligando para o receptor de activação do factor nuclear kappa B). Para que possa dar-se a activação das células osteoclásticas é necessário que estas desenvolvam entretanto (também na sua superfície) um receptor transmembranar designado por RANK.

A interacção do RANKL (presente na superfície dos osteoblastos) com o RANK (presente na superfície dos pré-osteoclastos) leva à maturação dos osteoclastos sendo um dos principais "motores de arranque" da osteoclastogénese. Na verdade, está hoje bem estabelecido que o contacto célula-a-célula entre células da linha osteoblástica e osteoclástica constitui um pré-requisito necessário e, até há bem pouco tempo essencial, para a maturação e activação dos osteoclastos. De facto, os osteoblastos, através de um mecanismo que envolve o contacto entre estas células e os precursores osteoclásticos, constituem um dos principais indutores da osteoclastogénese (Figura 7).

Os osteoblastos sintetizam ainda uma outra proteína, neste caso solúvel, a osteoprotegerina (OPG), com uma alta afinidade para o RANKL, impedindo ou bloqueando a ligação do RANKL ao seu receptor RANK. Por este mecanismo, a OPG regula a população funcional dos osteoclastos, actuando localmente como um "travão" à osteoclastogénese, reduzindo, deste modo, a reabsorção óssea (Figura 7).

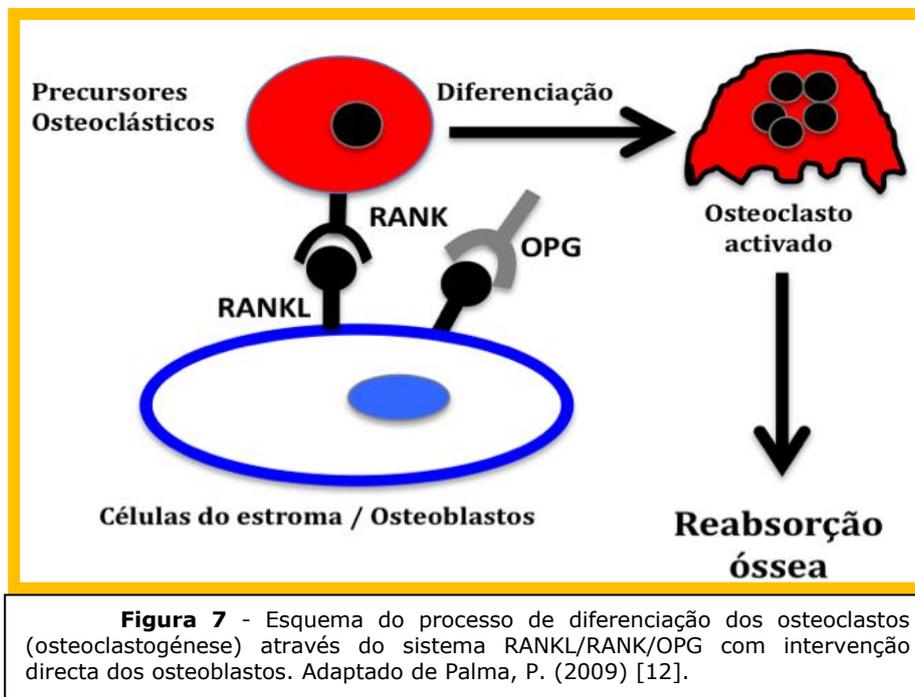


Figura 7 - Esquema do processo de diferenciação dos osteoclastos (osteoclastogénese) através do sistema RANKL/RANK/OPG com intervenção directa dos osteoblastos. Adaptado de Palma, P. (2009) [12].

Com efeito, as células da linha osteoblástica podem controlar o desenvolvimento e a actividade osteoclástica (em resposta a diferentes estímulos mecânicos, hormonais e inflamatórios) ajustando os níveis de expressão do RANKL e de OPG [19]. A presença de altos níveis de RANKL promove a osteoclastogénese, enquanto uma maior expressão de OPG resulta numa diminuição da osteoclastogénese, ou mesmo na apoptose dos osteoclastos. Assim, as células da linha osteoblástica podem funcionar como um reóstato (Figura 8) do processo de reabsorção óssea [19].

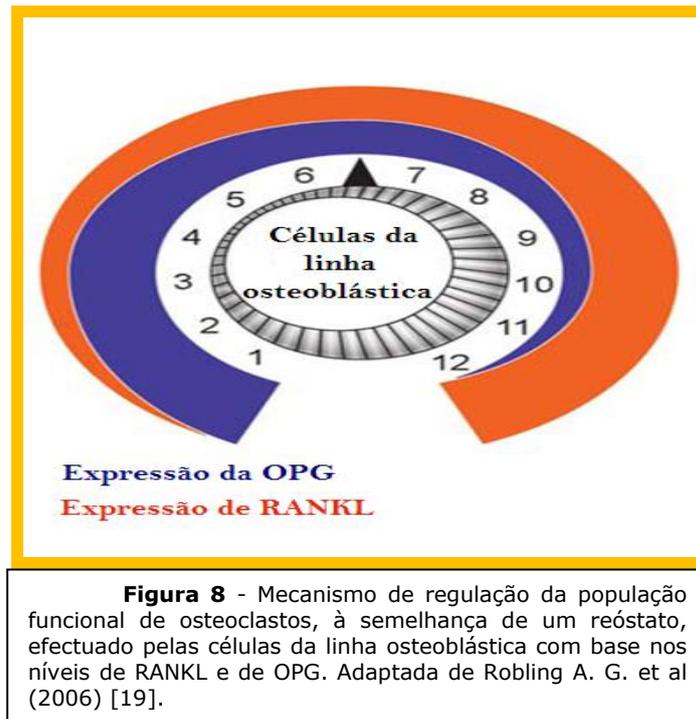


Figura 8 - Mecanismo de regulação da população funcional de osteoclastos, à semelhança de um reóstato, efectuado pelas células da linha osteoblástica com base nos níveis de RANKL e de OPG. Adaptada de Robling A. G. et al (2006) [19].

Em síntese, pode afirmar-se que o processo de diferenciação das células da linha osteoclástica está muito controlado pelas células da linha osteoblástica, através de um eixo de regulação comum, vulgarmente conhecido por RANKL/RANK/OPG. Porém e como veremos posteriormente, também os osteoclastos condicionam e modulam muitas das actividades osteoblásticas.

O sistema de citocinas RANKL/RANK/OPG constitui um eixo fundamental na regulação da massa óssea. O equilíbrio entre formação e reabsorção óssea está na dependência das flutuações locais do rácio RANKL/OPG.

➤ **Ciclo de Remodelação óssea**

A remodelação óssea consiste num mecanismo de substituição ou reconstrução de áreas de tecido ósseo de modo a preservar e otimizar a sua função e prevenir a sua degradação. A substituição óssea é iniciada por uma fase de reabsorção osteoclástica, logo seguida por uma etapa de formação osteoblástica. Este processo intimamente associado no tempo e no espaço constitui entidades anatómicas temporárias que Frost (2001) [20] denominou de "*basic metabolizing units*", um termo que ele próprio reformulou mais tarde para "*basic multicellular units*," usualmente abreviado para BMUs.

As BMUs são estruturas tridimensionais formando no tecido cortical verdadeiros túneis de reabsorção que serão prontamente mas lentamente preenchidos por novo tecido ósseo conhecidos como "*cuttings / filling cones*". Nas trabéculas do tecido ósseo esponjoso, os locais em reabsorção apresentam-se como escavações ou lacunas (lacunas de Howship).

O conjunto de células responsáveis por estas actividades multidisciplinares é também colectivamente designado por BMU e reúne uma equipa de células osteoclásticas e uma outra de células osteoblásticas. Destas unidades fazem também parte outras populações celulares, consideradas por vezes como células não BMU, que incluem células mesenquimatosas e células do tecido conjuntivo, muitas delas pertencentes ao sistema imunitário, sistema hematopoiético, bem como um elemento vascular especializado para o efeito.

Cada "*Remodeling Project*" começa com o reconhecimento de uma área alvo definindo uma região onde "*bone needing to be replaced*". Frost denominou esta etapa (que assinala e define o local de nascimento de uma nova BMU) como fase de activação sendo mais recentemente redefinida como a conversão duma superfície óssea de um estado quiescente para um estado activo. Este processo requer uma alteração de comportamento das células de revestimento ósseo "*lining cells*", bem como o recrutamento e migração de células da linha osteoclástica para o local e o reforço dos mecanismos de osteoclastogénese. Este "acontecimento" envolve a digestão da fina membrana de endóstio por enzimas produzidas pelas células de revestimento conduzindo a uma fácil exposição da matriz óssea mineralizada. A superfície de matriz óssea desnudada e exposta atrai os pré-osteoclastos presentes da circulação, sanguínea contribuindo também para a sua maturação e activação.

Todo este processo é acompanhado por mecanismos de neoangiogénese.

O ciclo de remodelação óssea compreende uma série ordenada de eventos (Figura 9) que vão converter uma superfície em repouso numa zona em remodelação seguindo uma sequência imutável de activação (**A**) → reabsorção (**R**) → formação (**F**). A remodelação óssea consiste, pois, num processo pelo qual é eliminado uma área de tecido ósseo que será substituída por outra, com pouca ou nenhuma alteração da massa óssea. Este fenómeno pode verificar-se igualmente (e seguindo a mesma ordenação) noutros tecidos duros [21,22,23].

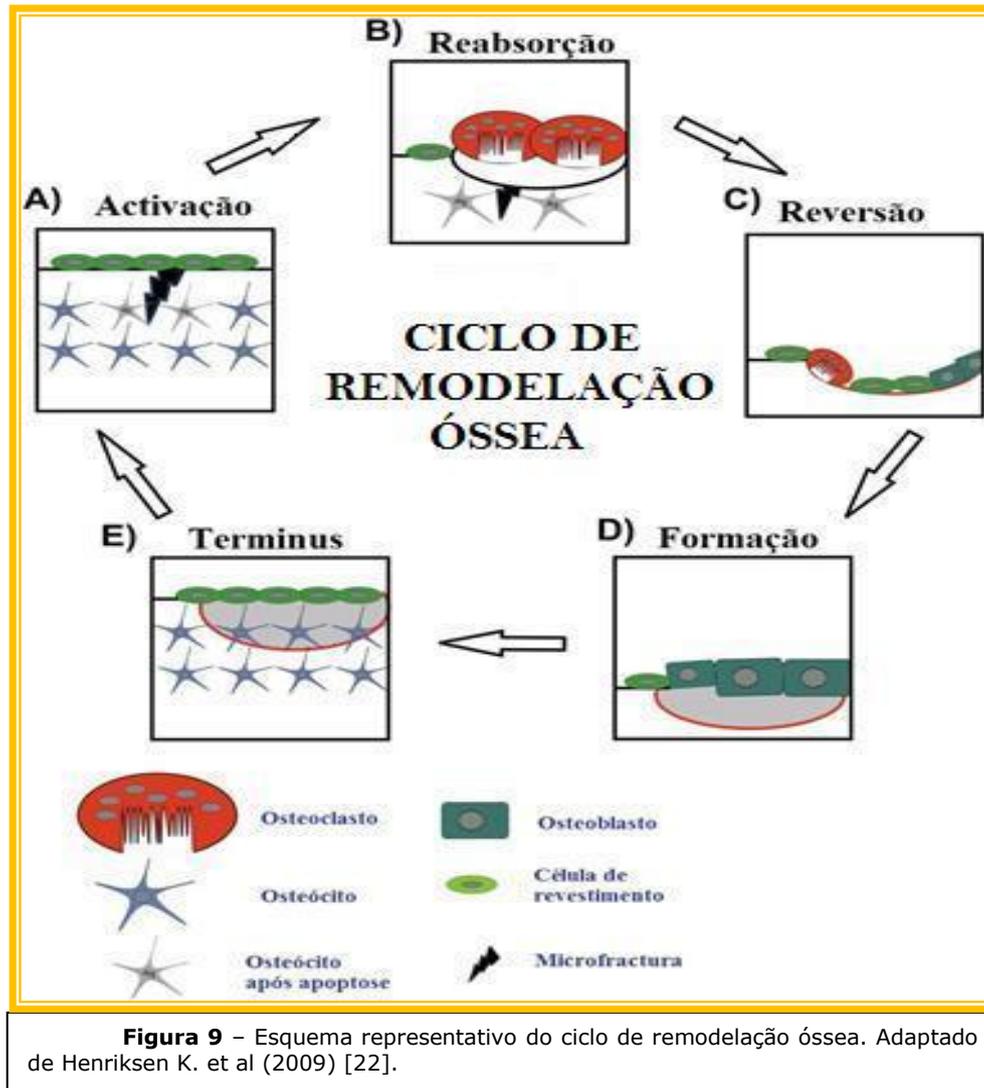


Figura 9 – Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea. Adaptado de Henriksen K. et al (2009) [22].

A **fase de activação (A)** compreende, como já foi referido, o reconhecimento de uma área precisa da superfície óssea e a sua preparação para o processo de remodelação. O início desta fase parece ser da responsabilidade de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos osteócitos em “sofrimento” ou em apoptose, localizados na área que irá ser sujeita a remodelação. Esta situação leva ao recrutamento e migração dos precursores mononucleados osteoclásticos e ao reforço dos mecanismos da osteoclastogénese, subjacente aos quais está normalmente o eixo RANKL/RANK/OPG com particular destaque para os elevados teores de RANKL em relação aos de OPG.

Está ainda por esclarecer para além das células linfocitárias, quais as células ósseas que, sob estímulos activadores, aumentam a expressão de RANKL, se apenas os pré-osteoblastos presentes no micro-ambiente ósseo, se também as células de revestimento ósseo.

Na **fase de reabsorção (R)** os osteoclastos cavam no osso esponjoso lacunas de contornos muito irregulares (lacunas howship) e no osso cortical, cavidades cilíndricas designadas por cones de reabsorção (*cutting cones*).

No final desta etapa, verifica-se uma inversão/reversão nesta sequência iniciando-se o processo de reparação, observando-se desta vez uma chamada de células osteoprogenitoras para este local. Nesta altura observa-se também o aparecimento de uma linha cimentante que define uma nítida fronteira entre áreas de tecido ósseo formadas por diferentes gerações de osteoblastos. As linhas cimentantes são verdadeiras estruturas morfológicas cuja composição se desvia da restante matriz, sendo pobres em colagénio. Estas linhas assinalam deste modo uma reversão da fase de reabsorção para o início do processo de reparação. As linhas de reversão são marcas indeléveis na estrutura óssea traduzindo a intensa e constante remodelação que caracteriza este tecido.

Será nesta fase de reversão que se dá o *coupling* entre osteoclastos e osteoblastos, verificando-se uma complexa comunicação bi-direccional (*complex forward-reverse signaling system*) que vai inibir a actividade dos osteoclastos e promover a dos osteoblastos.

Convém referir neste âmbito a intervenção do sistema *Ephrin-Eph* como mediador da interacção entre osteoclastos e osteoblastos. A expressão de EphrinB2 (nos osteoclastos) leva à activação de EphB4 (nos osteoblastos) e ao início da formação da matriz óssea. Por sua vez, a expressão de EphB4 (nos osteoblastos) vai inibir a diferenciação osteoclástica via EphrinB2. Uma vez que estas moléculas são proteínas transmembranares, a activação deste sistema requer um contacto célula a célula regulando, ao mesmo tempo, a actividade de cada uma delas. Deste modo, os osteoclastos poderão desencadear a diferenciação dos osteoblastos (muitos deles certamente resultantes da conversão das células de revestimento em células osteoblásticas activas), representando a presença de osteoclastos um factor essencial para a diferenciação dos osteoblastos [22, 24].

Uma das mais fortes evidências neste sentido resulta do facto de se observar sempre uma fase de reabsorção antes da fase de formação e o aparecimento de novo osso preferencialmente em locais onde previamente se verificou um processo de reabsorção. Também em estudos *in vitro* [22, 25 e 26] se observou que os osteoblastos em cultura elegem as superfícies côncavas e as lacunas de reabsorção para o seu desenvolvimento. Estes aspectos pressupõem a existência nas lacunas de reabsorção de condições ideais para a osteogénese. Neste âmbito convém não esquecer a influência que podem ter as superfícies ósseas, particularmente a sua geometria de concavidade, no sentido de estimular e modular as respostas osteogénicas.

De facto, as lacunas de Howship, concavidades escavadas pelos osteoclastos, constituem locais estratégicos e privilegiados para a formação de matriz osteóide e sua posterior mineralização. A geometria conformacional, dimensão, composição, microarquitECTURA e ainda a nanoestrutura de superfície destas cavidades criam um micro-ambiente que propícia o aparecimento de um fenótipo osteoblástico. Estas lacunas parecem favorecer, ou mesmo contribuir, para uma sequestração de iões e de factores de crescimento ou outras proteínas com efeitos osteoindutores, estimulando ao mesmo tempo o processo de angiogénese, pré-requisito essencial para a osteogénese. Compreende-se facilmente que os osteoclastos, na sua actividade de reabsorção de

matriz mineralizada, para além do seu directo envolvimento na reparação de áreas ósseas danificadas e no equilíbrio homeostático do cálcio, estejam também e sobretudo a preparar estas superfícies e a criar condições para uma posterior e eficaz colonização pelas células da linha osteoblástica. Esta dinâmica osteoclástica está na base do característico processo de *creeping substitution* dos materiais do enxerto ósseo.

O *footprint* deixado pela actividade osteoclástica, terá uma micro, sub-micro e nanotopografia de excelência para a indução de um fenótipo osteoblástico. Esta marca estrutural na superfície óssea será sempre de considerar nos processos biomiméticos de fabricação de materiais de substituição óssea, seguindo, deste modo, os ensinamentos da natureza.

O preenchimento da cavidade de reabsorção é naturalmente da responsabilidade das células da linha osteoblástica). Esta **fase de formação (F)** consiste, pois, na síntese de matriz osteóide e na sua posterior mineralização, tendo como resultado final a reconstrução da lacuna óssea (de Howship) ou de um cone de reabsorção (*cutting filling cone*) com novo tecido ósseo.

Tecido Ósseo Esponjoso

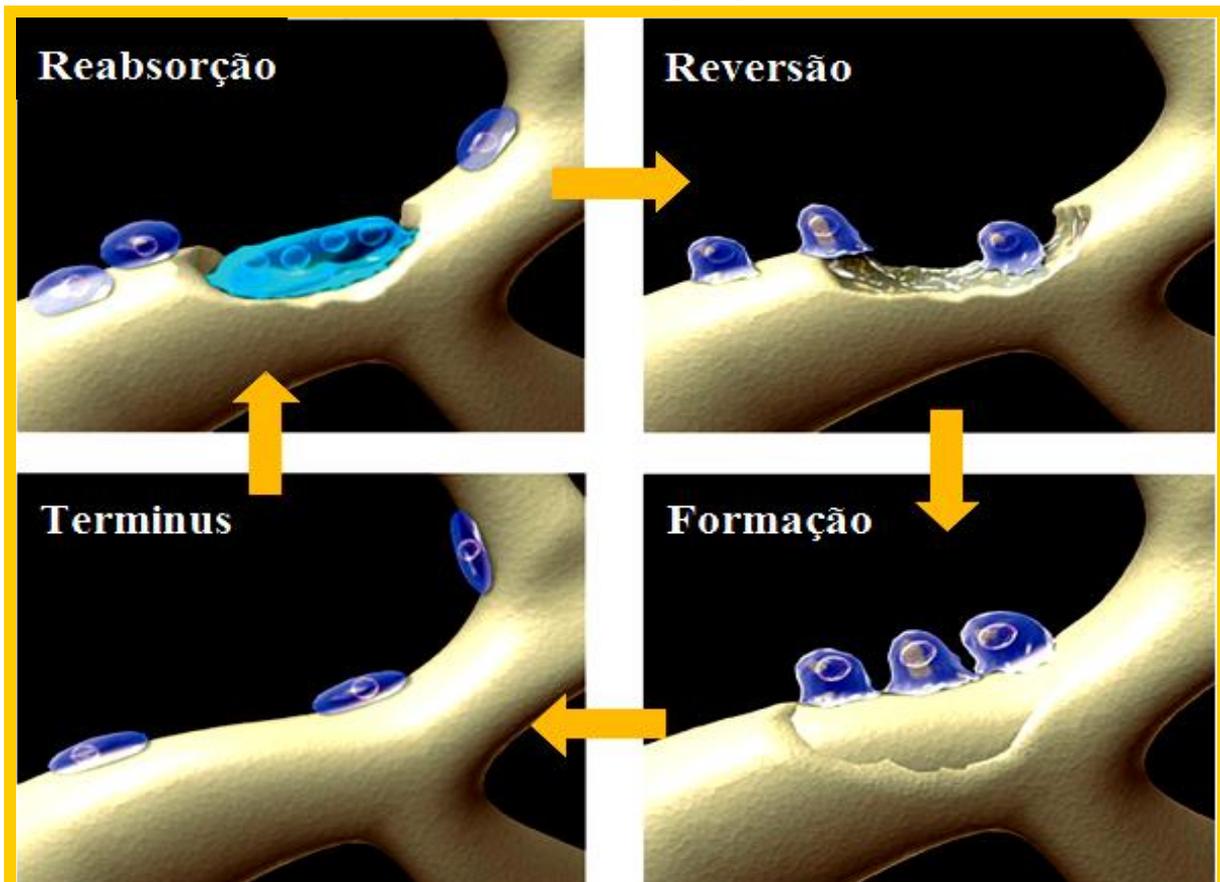


Figura 10 - Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea observado no tecido ósseo esponjoso. Adaptado de Coxon, J.P. (2004) [27].

Tecido Ósseo Cortical

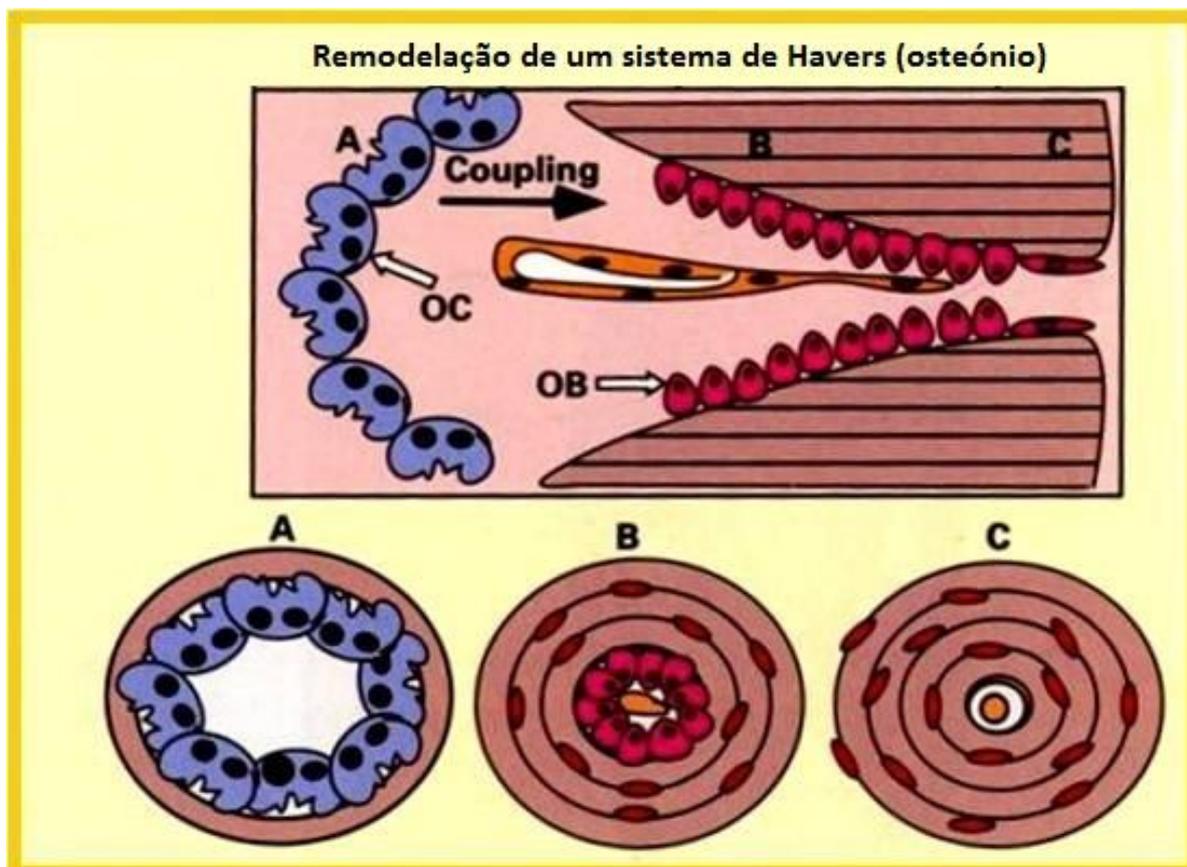


Figura 11 – Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea observado no tecido ósseo compacto. Constituindo um *cutting filling cone*. Adaptado de Garante P.R. (2003) [14].

A – Fase de Reabsorção (osteoclastica).

B – Fase inicial de formação um sistema de Havers (Osteoblastica).

C – Fase terminal - Terminus do processo de remodelação de um sistema de Havers.

OC – Osteoclastos.

OB – Osteoblastos.

Durante este período de reconstrução, várias são as moléculas que podem ser consideradas como osteoindutoras sendo muitas delas produzidas localmente enquanto outras estavam presentes na matriz óssea sob uma forma inactiva (TGF, IGF-1, PDGF) mas que entretanto foram libertadas e activadas na sequência do processo de degradação osteoclastica [28, 29].

Nesta fase, convém acentuar mais uma vez a importância da presença de osteoclastos para o processo de formação óssea. Henriksen et al (2009) [22] afirmam que a simples presença de osteoclastos, independentemente da sua capacidade de reabsorção é essencial para os mecanismos de osteogénese, secretando factores activadores dos osteoblastos. Neste âmbito, é impossível deixar de referir que as terapêuticas mais utilizadas na osteoporose, e em outras doenças acompanhadas de perda de massa óssea, consistem em fármacos exclusivamente anti-osteoclasticos. Este procedimento não será certamente o mais recomendado, uma vez que vai diminuir a presença de osteoclastos e, deste modo, o estímulo principal para a formação óssea.

Victor Pereira

O **terminus** da sequência de remodelação parece ser também, tal como o seu início, da responsabilidade dos osteócitos. Foi já demonstrado que os osteócitos presentes na matriz óssea mineralizada estão envolvidos num processo de regulação (através da síntese de diversas moléculas como a esclerostina) que determina a diferenciação dos osteoblastos secretores em células de revestimento ósseo, pondo fim ao ciclo de remodelação.

De realçar que no ciclo de remodelação a fase de reabsorção é bem mais rápida do que a de formação. Normalmente, a quantidade de tecido ósseo reabsorvido num período de 3 semanas leva aproximadamente 3 meses a ser substituído [21].

Por outro lado, a velocidade da remodelação do osso esponjoso ou trabecular é muito maior que a do osso cortical. Este aspecto está intimamente relacionado com a sua grande área de superfície de contacto com o meio envolvente. Deste modo, pode responder com mais facilidade às várias solicitações, apresentando uma maior capacidade metabólica e uma maior actividade de remodelação do que o osso cortical. Encontramos, pois, por este facto, uma maior incidência de patologia (osteoporose, metástases, osteomielites), nesta variedade de tecido ósseo [30].

De referir por último alguns dos efeitos da PTH nas diversas fases do ciclo de remodelação ósseo.

Qualquer elevação dos níveis de PTH provoca nos osteoblastos uma maior expressão de RANKL induzindo, ainda que de uma forma transitória, uma onda de RANKL importante na activação dos processos de reabsorção.

Esta hormona vai também estimular a conversão das células de revestimento ósseo que se encontram numa fase quiescente, justificando o rápido aparecimento de osteoblastos em resposta à PTH. De facto, a administração intermitente de PTH aumenta o número de osteoblastos presentes na superfície das trabéculas ósseas (anteriormente em repouso) e diminui o número de células de revestimento. Se esta administração cessar verifica-se um declínio nos osteoblastos e um aumento nas células de revestimento. A PTH vai também induzir a expressão de EphrinB2 podendo mais uma vez estar envolvida na conversão das células de revestimento em osteoblastos. Todos estes efeitos assumem uma extrema importância na fase de reversão e no início da fase de formação óssea.

Por fim, está também já confirmado que a PTH reduz a expressão de esclerostina levando a uma maior formação de matriz óssea e conseqüentemente a um aumento da massa óssea. Por outro lado, a administração de PTH prolonga a sobrevivência dos osteócitos (acção anti-apoptótica) reforçando também a sua resposta às forças mecânicas.

Em síntese a PTH parece desempenhar um papel central no ciclo de remodelação estando envolvida quer na fase de activação (via RANKL), quer na fase de reversão (via osteoclastos e Ephrin B2) quer ainda no terminus do ciclo (redução da esclerostina). Até ao presente a PTH constitui a única terapêutica anabólica capaz de induzir a formação de novo osso. Porém, devido ao seu efeito na produção de RANKL pode secundariamente activar os processos de reabsorção. A combinação da PTH com terapias anti-reabsorção pode parecer aconselhável. No entanto, esta conjugação parece anular grande parte da

resposta anabólica da PTH, acentuando o papel central dos osteoclastos nos processos anabólicos de osteogénese [21,22,29].

Ainda que a associação e alinhamento sequencial entre reabsorção (osteoclástica) e formação (osteoblástica) raramente esteja afectada o balanço final em termos de massa óssea pode variar consideravelmente. A maior parte das doenças metabólicas e inflamatórias que atingem o tecido ósseo manifestam-se geralmente por perturbações na dinâmica da remodelação resultando quase invariavelmente, num decréscimo da massa óssea.

A reabsorção e a formação são fenómenos que estão intimamente acoplados, visto que o início da primeira estimula a actividade reparadora da segunda, de modo a que a reabsorção de uma certa quantidade de tecido ósseo seja (em princípio) substituído pela mesma quantidade de novo osso.

A actividade das células participantes no processo de remodelação (BMUs) para além de uma regulação sistémica apresentam, como já foi descrito, uma importante regulação local. Com efeito, verifica-se a existência de um conjunto de sinais e mensagens intercelulares estabelecendo um constante diálogo entre osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Este sistema de sinalização e comunicação local será o maior responsável pela acção concertada de todas estas células e pela coordenação e transição equilibrada das diferentes etapas da remodelação. Também é provável que toda esta actividade tenha que ser de certo modo "protegida" de interferências estranhas, tendo sido mesmo descrita a existência de um compartimento de remodelação óssea designado por BRC (*bone remodeling compartment*) que seria delimitado externamente por células de revestimento ósseo, visando proteger e abrigar todo este complexo e delicado conjunto de células e actividades [21,29,31,32].

As BRCs são compartimentos especializados que envolvem microcapilares e medeiam a comunicação entre a medula óssea e as superfícies ósseas em remodelação [31,32,33,34]. Estas estruturas, (figura 12) são delimitadas externamente por uma camada externa de células que apresentam marcações imunohistoquímicas da linhagem osteoblástica (fosfatase alcalina, osteocalcina, osteonectina, colagénio do tipo I, IGFs, TGF β , BMPs) assim como da linhagem osteoclástica, não se sabendo com segurança se são mesmo células de revestimento (*lining cells*), se células endoteliais transformadas, se pericitos ou mesmo células da linhagem macrofágica [31,35,36].

Compartimento de Remodelação

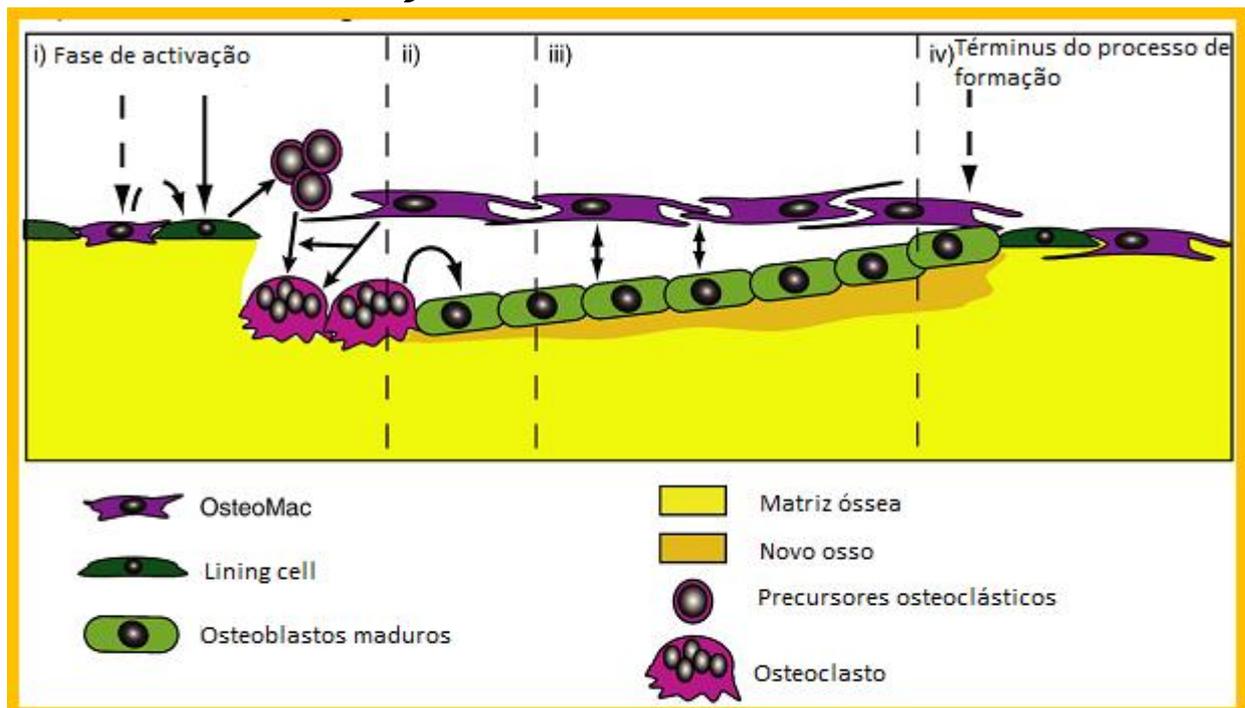


Figura 12 - Esquema representativo de um hipotético modelo para um compartimento de reabsorção óssea (BRC). A fase de activação seria desencadeada pelas *lining cells* que em coordenação com os *osteomacs* participariam na detecção de sinais desencadeantes do processo de reabsorção óssea. Os *osteomacs* parecem também estabelecer uma comunicação *coupling* com as células da linha osteoblástica no sentido de dar início à fase de formação óssea. Esta comunicação bidireccional entre osteoblastos e *osteomacs* pode estar subjacente ao equilíbrio de todo o mecanismo de remodelação. Adaptado de Allison R. e tal (2008) [37].

Neste âmbito pode ser incluída uma população de macrófagos “residentes” no tecido ósseo designadas por “*osteomacs*”. Os *osteomacs* em conjunto com as *lining cells* parecem participar na detecção de pelo menos alguns sinais promotores da remodelação óssea, activando a expressão (por parte dos osteoblastos) de moléculas osteoclastogénicas. Os *osteomacs* parecem estar também estrategicamente posicionados de forma a estabelecer uma comunicação privilegiada (*coupling*) com os osteoblastos contribuindo deste modo para uma coordenação entre reabsorção e formação óssea.

Em síntese pode confirmar-se que nas áreas de remodelação (BRC) temos, a considerar não só as células específicas do tecido ósseo, que podem ser designadas por células BMUs, como as células não BMUs que incluem, entre outras, *osteomacs*, células dendríticas, linfócitos T e B (populações celulares pertencentes ao sistema imunitário) e ainda células endoteliais.

Parte B - Osteoimunologia – Alguns aspectos

Tradicionalmente, o osteoblasto tem sido considerado uma "master cell" na regulação do processo de diferenciação, maturação e activação dos osteoclastos e, deste modo, no mecanismo de reabsorção óssea. Porém, a chegada de um cada vez maior número de informações e pesquisas (demonstrando a íntima e complexa inter-relação entre células ósseas e células do sistema imunológico) leva-nos a repensar certos conceitos, já há muito estabelecidos, sobre os processos de regulação do *turnover* ósseo.

Da comunicação e integração das células do sistema imunitário e do sistema osteoarticular, compartilhando uma base comum, surgiu uma área emergente, de contornos mal definidos, mas de estreita articulação e sincronismo, denominada osteoimunologia. Acredita-se que estes sistemas tenham tido um desenvolvimento paralelo no processo de evolução. A semelhança filogenética e proximidade topográfica entre o sistema imunológico e osteoarticular resulta numa grande simbiose entre os dois, sendo até regulados por mecanismos comuns.

Com efeito, as células de natureza imunológica têm a sua origem em células tronco presentes na medula óssea desenvolvendo-se, portanto, no mesmo micro-ambiente que os osteoclastos e osteoblastos. Assim sendo, o tecido ósseo parece ocupar uma posição crucial neste sistema, podendo mesmo ser considerado como um órgão imunológico. De facto, Lorenzo et al. (2008) [38] afirmam que a medula óssea pode ser encarada como um «*loosely compartmentalized lymphoid organ*», não sendo, pois, difícil de entender a estreita relação entre células ósseas e células imunitárias.

Não será, também, de admirar que uma excessiva activação do sistema imunológico (como é o caso de certas doenças inflamatórias e auto-imunes) seja frequentemente acompanhada por uma perda de massa óssea, como resultado de uma sobre-estimulação da diferenciação e actividade osteoclástica.

A osteoimunologia assenta num eixo de regulação comum vulgarmente conhecido por RANKL/RANK/OPG, já anteriormente descrito, que constitui uma ponte molecular responsável pelo *crosstalk* e íntima relação entre o sistema imune e o metabolismo ósseo. Em situações patológicas o processo de remodelação óssea sofre, quase sempre, um desvio para privilegiar a osteoclastogénese, conduzindo a um reforço da reabsorção óssea, relativamente à formação. Na verdade, um facto que contribuiu enormemente para o desenvolvimento da osteoimunologia foi a constatação de uma acelerada perda de massa óssea associada a certos processos inflamatórios. Uma excessiva perda óssea observa-se não só nas doenças inflamatórias, mas também nas doenças auto-imunes e neoplásicas.

A inflamação ou resposta inflamatória é uma resposta biológica e fisiológica dos tecidos vivos a uma agressão e que direcciona os meios de resposta (predominantemente células) para o local onde se processou a agressão. Compreende-se, pois que a activação do sistema imune seja essencial para a nossa própria defesa. Porém, sob condições patológicas, a prolongada ou aberrante activação das células efectoras pode resultar em alterações tecidulares importantes. Nestes casos, o constante

diálogo e comunicação entre os diferentes tipos de populações celulares envolvidos adquire especial significado, observando-se geralmente um desequilíbrio do eixo RANKL/RANK/OPG. Em condições patológicas, de natureza inflamatória as células T activadas expressam altos teores de RANKL (quer na forma transmembranar, quer solúvel), sendo capazes de induzir directamente (sem intervenção dos osteoblastos) os mecanismos de osteoclastogénese e de diferenciação osteoclástica.

Muitos são também os trabalhos que têm vindo a demonstrar [39] que algumas citocinas pró-inflamatórias e os LPSs (lipopolissacarídeos componentes da superfície da parede de algumas bactérias Gram negativas) podem estar envolvidos na diferenciação terminal dos osteoclastos (Figura 13), de uma forma independente dos osteoblastos (ou seja, sem a necessidade do contacto directo com estas células). Tanto a Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) como o factor de necrose tumoral α (*tumoral necrose factor* α – TNF- α) podem estimular por si só a osteoclastogénese, sem recurso ao eixo RANKL/RANK [39].

Estes processos estão muitas vezes subjacentes à actividade e progressão de certas doenças, como é o caso da doença periodontal, podendo afectar seriamente o osso alveolar, ao provocar grandes áreas de reabsorção óssea. De facto, os níveis de RANKL (quer induzidos directamente ou indirectamente) estão sempre bastante altos neste tipo de doença.

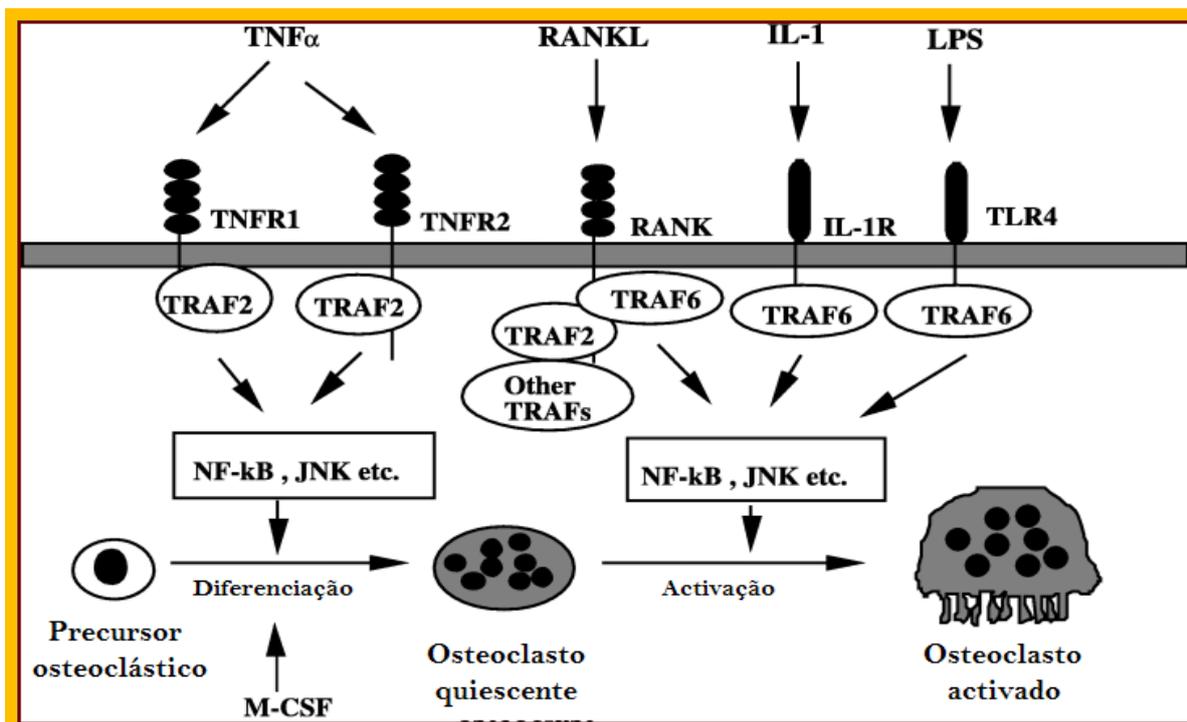


Figura 13 – Representação esquemática do processo de diferenciação e activação das células osteoclásticas sob o efeito do TNF- α , RANKL, IL-1 e LPS. A presença de M-CSF é indispensável a todo este processo. De notar, porém, que as citocinas TNF- α , IL-1 e LPS actuam de forma independente do eixo RANKL/RANK. O conjunto dos TRAFs representa um mecanismo de transdução intracelular que leva à activação de factores de transcrição (NF-kB, JNK) que regulam a diferenciação e maturação final dos osteoclastos. Adaptado de Katagiri T. et al (2002) [39].

A placa bacteriana e particularmente os LPSs constituem potentes endotoxinas que estimulam por si só (de uma forma directa), ou através da expressão de citocinas pró-inflamatórias, a actividade osteoclástica. A perda da radiopacidade típica da lâmina dura é muitas vezes interpretada como uma imagem de marca da doença periodontal crónica, traduzindo uma resposta inflamatória associada aos processos de reabsorção óssea. Uma proteína reconhecida como sendo um potente factor de estimulação osteoclástica foi recentemente isolada da *Porphyromona gingivalis* [7,40].

Tendo em consideração o actual desenvolvimento da osteoimunologia e a comunicação e integração das células do sistema imunitário e do sistema osteoarticular, pode afirmar-se que a dinâmica da remodelação parece desenvolver-se tendo como ponto de partida e base de sustentação o sistema imunológico.

Com efeito, um mecanismo de tipo inflamatório pode estar na base de todo o processo de remodelação, podendo mesmo considerar-se o próprio processo de remodelação (ele próprio) como sendo uma resposta inflamatória localizada nas áreas de tecido ósseo estruturalmente ou funcionalmente danificado. Estas áreas podem ser reconhecidas como *non-self* sendo o processo de reabsorção óssea entendido, nesta perspectiva, como uma forma altamente especializada e controlada de auto imunidade.

O início deste processo é induzido por citocinas inflamatórias (prostaglandinas, IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , TNF- β e outras) produzidas não só pelos osteócitos comprometidos ou danificados como por células (activadas) do sistema imune, presentes no micro ambiente ósseo. Todos estes factores estimulam, no seu conjunto, a produção de RANKL, desencadeando e/ou reforçando, através do sistema RANKL/RANK/OPG, os processos de osteoclastogénese e, conseqüentemente, os mecanismos de reabsorção e remodelação óssea.

Os procedimentos e tratamentos realizados na área da ortodontia assentam essencialmente em mecanismos que envolvem este sistema de citocinas. Com efeito durante os movimentos ortodônticos verifica-se, no osso alveolar e no lado onde se exerce a compressão uma maior expressão de RANKL e conseqüentemente uma activação da osteoclastogénese. Pelo contrário, no lado que sofre tensão existe uma maior síntese de OPG. Estas forças de tensão parecem provocar, paralelamente, uma diminuição da síntese do RANKL. Importa ainda referir que também as próprias células do ligamento periodontal são sensíveis às forças de tensão e de compressão, apresentando uma capacidade de resposta em termos de produção de OPG/RANKL bastante semelhante à do tecido ósseo.

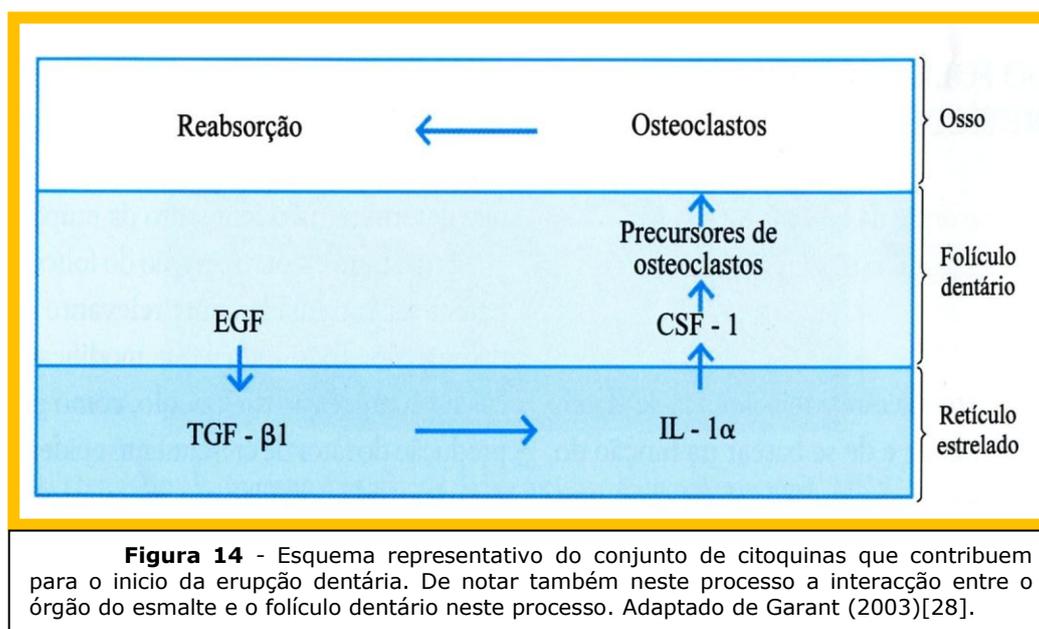
Assim, pode concluir-se que subjacente à estratégia da movimentação associada aos tratamentos ortodônticos está um processo inflamatório relacionado com diferentes níveis de RANKL e OPG (que reúne um complexo e coordenado sistema de citocinas e de células ósseas e inflamatórias), induzido por estímulos mecânicos cuidadosamente planeados e controlados.

Victor Pereira

Ainda dentro deste contexto é quase imperdoável deixar de referir os processos de erupção dentária.

Os mecanismos de erupção dentária são o resultado de um fenómeno multifactorial onde intervêm tanto (factores sistémicos) de natureza hormonal como factores de crescimento (com uma acção localizada). Tudo indica também que a participação do folículo dentário se apresenta bastante relevante neste processo. Entre os factores de crescimento destaca-se o factor de crescimento epidérmico (EGF) que directamente ou através do factor transformador do crescimento (TGF- β 1) inicia uma cascata de sinais moleculares, que estimulam, o começo da erupção dentária. Estes compostos activam concretamente a expressão e secreção de IL-1 pelas células do reticulo estrelado. A IL-1 vai induzir, posteriormente, nas células do folículo dentário a expressão de CSF-1 (factor estimulante de colónias de macrófagos), elemento fundamental, como já foi referido, para os mecanismos de osteoclastogénese. Por sua vez a IL-1 activa por si só ou com recurso a estimulação de RANKL os mecanismos de reabsorção osteoclastica [41].

Todo este conjunto de citoquinas envolve sempre uma activação do eixo RANK/RANKL.



Os osteoclastos ocupam uma posição *pivot* nestes processos e constituem, de longe, as células com maior responsabilidade no potencial dinâmico dos tecidos duros.

Em jeito de conclusão, a (figura 15), pretende ilustrar e fazer uma pequena sinopse do processo molecular e celular da reabsorção óssea "vivido" na frente de reabsorção de um cutting / filling cone, seguindo a tradicional sequência de activação – reabsorção – formação, via RANKL/RANK/OPG. O início e localização deste processo é induzido pelas citoquinas inflamatórias produzidas pelos osteócitos lesados. Estas citoquinas (PGE-2, IL-1, por exemplo) atraem, entre outras células do sistema imune, os

Victor Pereira

linfócitos T e estimulam a produção de RANKL (tanto pelas células imunitárias como pelas células de revestimento e osteoblastos). Entretanto as células da linha osteoclástica, também provenientes da corrente sanguínea, chegam à frente de remodelação (atraídas pela situação criada) e começam a desenvolver os receptores RANK. O RANKL ao ligar-se ao seu receptor RANK desencadeia a maturação e activação dos osteoclastos que iniciam e caracterizam a fase de reabsorção. Como consequência da actividade dos osteoclastos começam a libertar-se (da matriz óssea reabsorvida), vários factores de crescimento responsáveis pela proliferação e diferenciação dos pré-osteoblastos (que migram das zonas perivasculares ou mesmo da corrente sanguínea para esta área de baixa densidade celular). Neste processo parecem também estar envolvidas as células de revestimento ósseo adjacentes aos locais de reabsorção, sendo imprescindível ainda a presença de osteoclastos, funcionantes ou não (através da síntese de factores parácrinos ou mesmo de contactos celulares).

Entretanto os pré-osteoblastos vão produzindo OPG (com grande afinidade para o RANKL) que ao ligar-se ao RANKL desactiva os osteoclastos, pondo termo à fase de reabsorção. Os osteoblastos entretanto diferenciados iniciam a formação e mineralização de novo tecido ósseo, completando-se, assim, o processo de *turnover* ósseo.

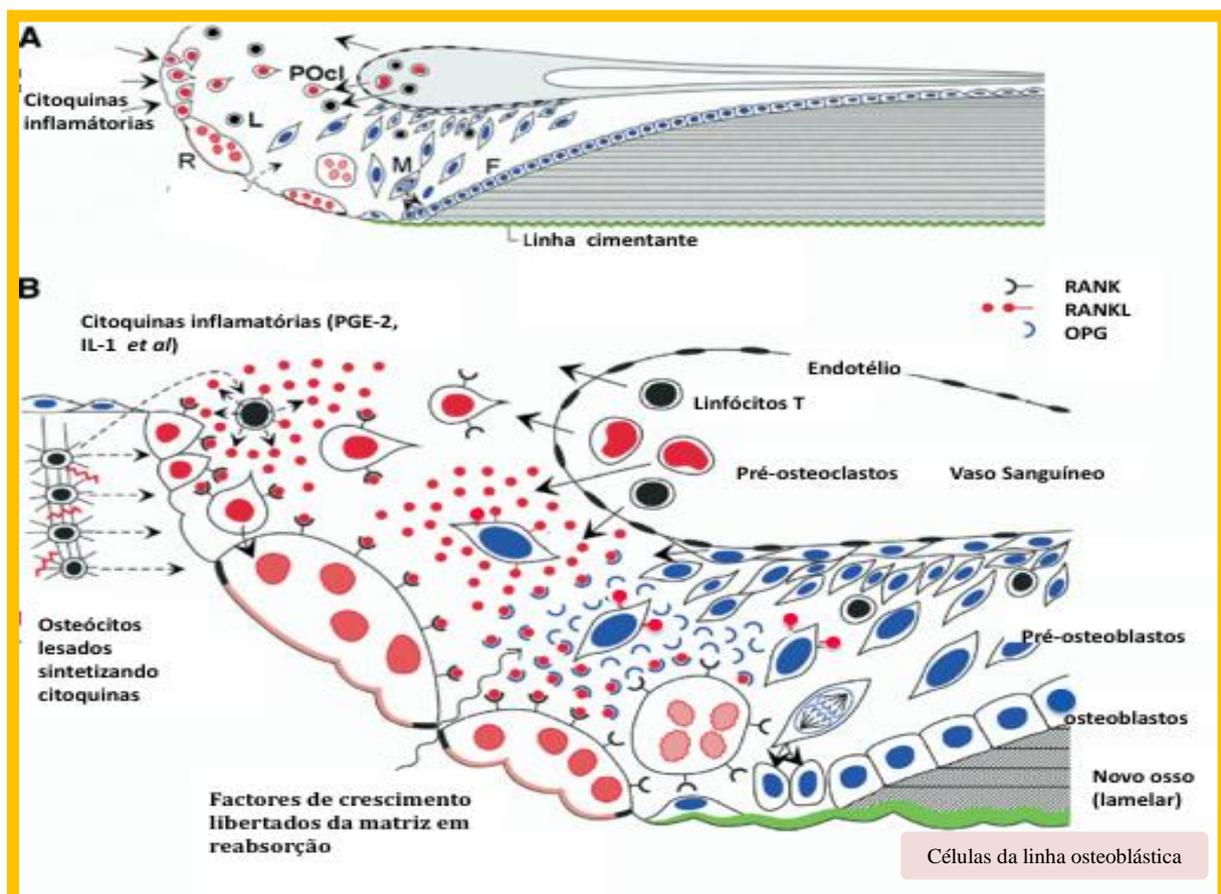


Figura 15 - A) Hemi-corte de um *cutting / filling cone* ilustrando a actividade celular associada ao processo de remodelação óssea; B) maior ampliação da frente de reabsorção do *cutting / filling cone* A, esquematizando o mecanismo molecular e celular (descrito no texto) envolvido na sequência de activação (A) reabsorção (R) formação (F) via RANKL/RANK/OPG. Linfócitos T (preto), células da linha osteoclástica (vermelho) e células da linha osteoblástica (azul). Adaptado de Roberts, W.E. (2006) [42].

Tomemos agora como exemplo de uma situação patológica, a problemática associada à artrite reumatóide (AR), doença inflamatória acompanhada de alterações na reabsorção óssea que assentam num desvio do eixo RANKL/RANK/OPG. Na artrite reumatóide foi possível verificar em culturas de células sinoviais (obtidas de pacientes com AR) uma associação entre os altos níveis de expressão de RANKL nestas células e o aumento dos processos de osteoclastogénese.

Nestas situações, (Figura 16) foi recentemente identificado, dentro da população celular de linfócitos T, um subgrupo de *TH-cells* (*T Helper*) responsável pelos processos de reabsorção óssea, sendo designado por *TH-17 cells* (por constituírem *TH cells* que produzem interleucina 17 - IL-17). Esta interleucina induz nos fibroblastos sinoviais a produção de RANKL. A IL-17 estimula, também, nos macrófagos sinoviais a secreção de proteínas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6). Estas citocinas vão, por sua vez, activar, ainda, mais os mecanismos osteoclastogénicos, quer actuando directamente nos precursores dos osteoclastos, quer indirectamente através dos fibroblastos sinoviais (estimulando a produção de RANKL). As *TH 17 cells* podem também exprimir RANKL (na sua forma transmembranar), contribuindo para um aumento ainda maior dos processos da osteoclastogénese.

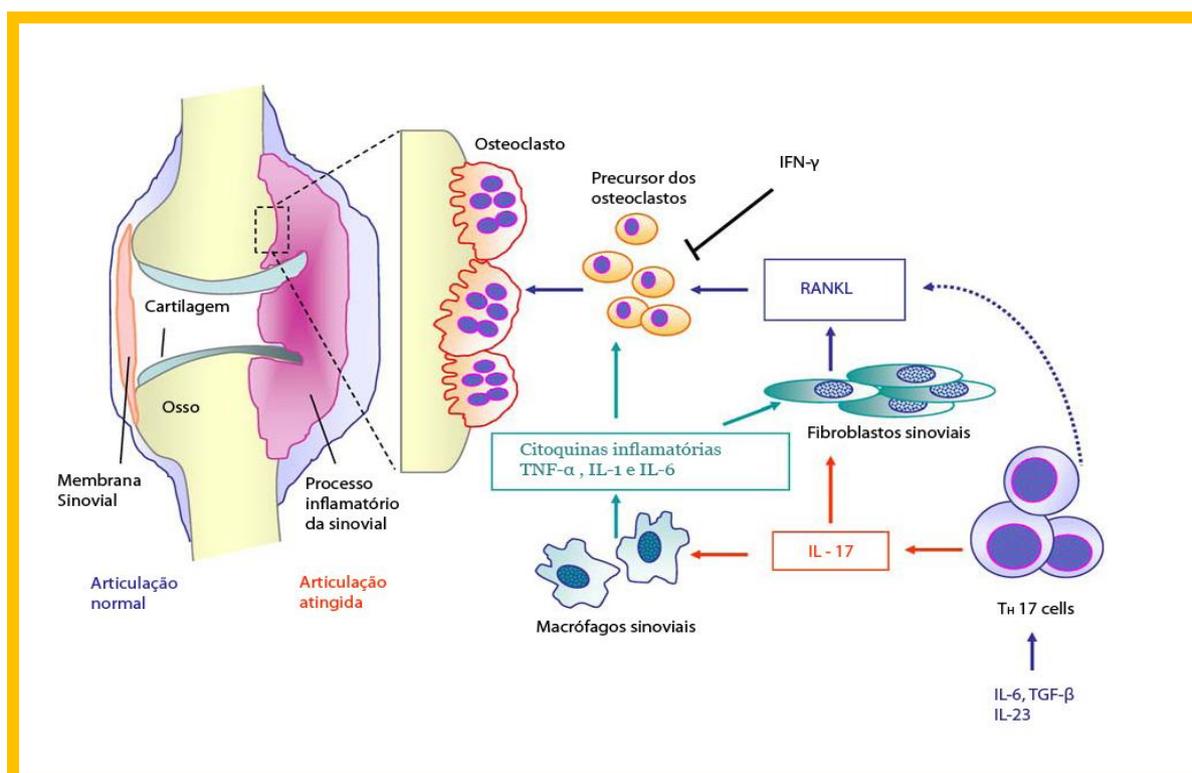


Figura 16 - Mecanismo da destruição óssea associada à artrite reumatóide. A articulação atingida para além de macrófagos e fibroblastos sinoviais contém células T (*TH 17 cells*) com efeitos osteoclastogénicos devido à produção de grandes quantidades de IL-17. Esta interleucina induz nos fibroblastos sinoviais a produção de RANKL. A IL-17 estimula, também, nos macrófagos sinoviais a secreção de proteínas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6). Estas citocinas vão, por sua vez, activar os mecanismos osteoclastogénicos, quer actuando directamente nos precursores dos osteoclastos, quer indirectamente através dos fibroblastos sinoviais (estimulando a produção de RANKL). As *TH 17 cells* podem também exprimir RANKL (na sua forma transmembranar), contribuindo para um aumento ainda maior dos processos da osteoclastogénese. Adaptado de Nakashima T. (2009) [43].

Toda esta situação de carácter inflamatório resulta numa grande perda de massa óssea com profundas deformações articulares. Pode actualmente considerar-se a artrite reumatóide como um exemplo de uma *RANKL disease*, designação que demonstra bem a íntima ligação entre o sistema imunológico e o metabolismo ósseo, fundamento da osteimunologia.

Bloqueando a acção do RANKL (através da administração de OPG ou de um anti-corpo anti-RANKL) consegue prevenir-se a severa destruição óssea, sempre associada à artrite, ainda que se mantenham os mesmos níveis de inflamação. Uma terapia anti RANKL apresenta-se, por este motivo, bastante promissora para o tratamento de situações deste tipo.

Uma pequena nota final para referir que mecanismos de natureza inflamatória, alterações do eixo RANKL/RANK/OPG e da remodelação óssea em si mesma, podem também estar na base da etiopatogenia dos processos de osteoporose. Com efeito, a deficiência de estrogénios registada na menopausa conduz à sobre-regulação de RANKL nas células da medula óssea, facto que é determinante para reabsorção óssea. Por sua vez os estrogénios estimulam directamente a produção de OPG pelos osteoblastos, tendo dessa forma efeitos anti-reabsortivos no tecido ósseo. [41].

Porém importa sublinhar que os efeitos indirectos principais dos estrogénios ou deficiência de estrogénios são mediados por células do sistema imunitário. Desde 1989 que se conhecem algumas correlações entre tratamento estrogénico e libertação sistémica de citocinas, sendo entretanto reconhecido o envolvimento de várias citocinas e outros mediadores inflamatórios, como as interleucinas IL-1, IL-6, TNF α e prostaglandina E2 na patogénese da osteoporose.

Estudos recentes relacionados com os efeitos da deficiência em estrogénios na função das células T, reconhecem o seu papel fundamental no estado pró-inflamatório progressivo que acompanha a osteoporose e o envelhecimento em geral, (caracterizado por um aumento de IL-1, IL-6, e TNF- α), sendo este processo denominado por «**inflamm-aging**».

Está já demonstrado que a ablação de estrogénios resulta num aumento de IL-7, o que conduz à activação das células T e a uma estimulação na produção de IFN- γ e TNF- α , por estas células T. Uma das principais acções do IFN- γ é a sobre-regulação do complexo major de histocompatibilidade (MHC) tipo II nas células apresentadoras de antigénios, como os macrófagos da medula óssea e as células dendríticas. Este facto leva a um aumento da activação das células T que vão produzir ainda mais RANKL e TNF- α , ambas citocinas com uma actividade osteoclastogénica marcada.

Esta «**Inflamm-aging**» é específica do género, de facto nas mulheres idosas as células T produzem mais IFN- γ comparativamente com as mulheres mais jovens. O envelhecimento dos homens parece não ter grande efeito na produção de IFN- γ .

Considerando que:

a) a osteoporose constitui o maior problema de saúde pública para adultos saudáveis acima dos 55 anos b) uma em duas mulheres vai desenvolver uma fractura osteoporótica (comparativamente com um em quatro homens) e que, c) o número de

peessoas com osteoporose vai provavelmente sofrer um aumento (3 vezes) nos próximos 25 anos, devido ao envelhecimento da população; Torna-se urgente a criação de uma estratégia eficaz e interventiva para fazer face a esta situação.

Uma visão interdisciplinar dos mecanismos que conduzem à perda de massa óssea e às fracturas osteoporóticas será imprescindível para a elaboração de propostas terapêuticas baseadas em alvos moleculares, visando um maior sucesso na resolução destes problemas.

Metástases Ósseas e Remodelação Óssea

O tecido ósseo constitui um destino frequente para a instalação e formação de lesões neoplásicas secundárias. As metástases ósseas são, de longe, mais frequentes do que os tumores ósseos primitivos. De facto, os ossos reúnem um conjunto de características que faz deles um local privilegiado para a migração e colonização de células neoplásicas [45,46].

Ainda que à primeira vista a natureza mineralizada do tecido ósseo possa parecer uma barreira ao desenvolvimento de grandes formações tumorais, esta circunstância é, no entanto, facilmente contornada e ultrapassada pelas células cancerosas. Com efeito, estas células conseguem estabelecer uma estreita relação com as células ósseas, criando uma plataforma de "entendimento", de forma a conseguir boas condições e mais espaço disponível para o seu crescimento.

A este respeito Mundy (2009) [47] refere uma interessante analogia entre esta situação e a presença de um exército de ocupação verificando-se sempre um certo grau de reactividade pela população e a criação de novas estratégias de sobrevivência e organização. Este investigador afirma: "*When cancer metastasizes to distant sites, it essentially forms an army of occupation. Just as the presence of an army of occupation alters the behavior of the preexisting resident population, the resident host cells react in a variety of ways to the presence of the metastatic cancer cells.*"

Em paralelo, certas particularidades da anatomia e fisiologia óssea podem constituir entradas fáceis e terrenos favoráveis aos processos de metastização. De facto, as características topográficas e hemodinâmicas existentes nas regiões metafisárias dos ossos longos transformam-nas frequentemente em locais atractivos para este fim. O grande calibre, a lenta velocidade de fluxo e a natureza peculiar das paredes dos sinusóides, presentes na esponjosa primária e secundária das metáfises, permitem uma fácil entrada e saída de células, proporcionando assim uma estrutura altamente vantajosa para a circulação e migração das células neoplásicas, circunstância que este tipo de células sabe aproveitar muito bem [48].

No entanto, está também demonstrado que a entrada das células nos sinusóides e posterior chegada à medula óssea não é suficiente para assegurar uma colonização metastática, sendo muito mais as células cancerosas que transitam nas cavidades medulares, do que as que efectivamente se instalam e progridem no sentido de uma lesão secundária. Por outro lado, as células endoteliais que revestem estes sinusóides podem desenvolver particulares afinidades (expressando, por exemplo, diversas proteínas de adesão), de modo a estabelecer ligações específicas com as células tumorais, contribuindo em certas regiões (alvo) para uma adesão entre as células tumorais circulantes e as células endoteliais da micro circulação presente na medula óssea.

Pode afirmar-se, pois, que a arquitectura óssea e particularmente a estrutura dos vasos sanguíneos (sinusóides) da medula óssea facilitam imenso a circulação e transmigração das células neoplásicas. Em geral, áreas bem vascularizadas contendo abundante medula óssea constituem quase sempre locais privilegiados para a

colonização metastática. Assim, e como sabemos, nem todos os ossos que compõem o esqueleto são igualmente atingidos, constituindo destinos preferenciais para a metastização, as vértebras, as costelas e as extremidades dos ossos longos, tudo regiões altamente vascularizadas e ricas em medula óssea vermelha. [48]

Importa considerar, ainda, que a metastização óssea é bem mais frequente para certas neoplasias do que para outras, sendo particularmente elevada nas neoplasias da mama, próstata, pulmão e tiróide. Estas células neoplásicas deverão pois apresentar certas características e propriedades que as dirigem preferencialmente para o tecido ósseo.

Um outro aspecto interessante reside no facto de muitos doentes desenvolverem metástases ósseas activas muitos anos após a remoção cirúrgica do tumor primitivo, sugerindo que as células malignas osteotrópicas podem ter um longo período de quiescência, antes de desenvolverem lesões secundárias. Esta circunstância parece estar relacionada com alteração das condições do micro-ambiente em que se encontravam "adormecidas", levando ao desencadear à sua activação.

Mecanismos de Metastização Óssea

O processo de metastização óssea compreende um conjunto de etapas interrelacionadas que começa com uma migração dirigida ou "**tropismo**" das células cancerígenas para certas áreas do tecido ósseo. Para que estas células possam sobreviver, crescer e proliferar na matriz óssea desenvolvem certas propriedades osteomiméticas ou "**osteomimetismo**", adquirindo assim características "*bone like*", de modo a poderem ser consideradas como células ósseas. Finalmente, estabelecem com os osteoblastos e os osteoclastos um "**ciclo vicioso**" que desenvolvem a seu favor.

A complexidade destes processos é enorme, pois, envolve não só células ósseas, como células hematopoiéticas (série mielóide, linfóide e eritrocitária), células de natureza inflamatória e ainda células endoteliais, para além das células cancerosas.

O "**osteotropismo**" das células cancerosas pode ficar a dever-se a diversos e diferentes mecanismos. No caso do cancro da mama, por exemplo, as células cancerosas desenvolvem um receptor CXCR4 (Chemokine C-X-C motif receptor 4) que controla o destino destas células para certos órgãos como a medula óssea, onde o seu ligando CXCL12 (Chemokine C-X-C motif ligand 12) é produzido em altas concentrações. Este facto foi claramente demonstrado quando se procedeu ao bloqueio experimental do CXCR4 (com anticorpos ou antagonistas), reduzindo notoriamente a incidência de metástases.

O sistema RANKL/RANK/OPG parece estar também muito envolvido, exercendo frequentemente uma posição central na migração de células cancerosas que expressam RANK. Chega mesmo a existir um trabalho de investigação com um título sugestivo que fala por si: "*RANKL Acts Directly on RANK-expressing Prostate Tumor Cells and Mediates Migration and Expression of Tumor Metastasis Genes*". Neste estudo, a utilização de OPG

(inibidor natural da interacção RANK/RANKL) apresentou-se bastante eficaz, bloqueando o tropismo ósseo destas células [49].

Foi, ainda, demonstrado que uma maior incidência de metastização óssea do cancro da mama e do cancro da próstata podia estar relacionada com o aumento da expressão, pelas células cancerosas, de certas integrinas que medeiam a sua ligação à matriz óssea ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$ para a mama e $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ para a próstata). Esta conclusão foi também confirmada quando se observou uma redução acentuada do processo metastático com a utilização de antagonistas específicos destas integrinas.

Assim, dentro do osteotropismo característico das células metastáticas é possível que certas quimioquinas (CXCR4 e RANKL) e certas integrinas ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{2}\beta\text{1}$) possam interagir, em sinergia, como receptores/ligandos promovendo a migração e colonização óssea.

A aquisição pelas células tumorais de um pseudofenótipo de células ósseas "**osteomimetismo**" pode facilitar, em muito, a sua migração e posterior adesão e sobrevivência num micro-ambiente ósseo. A expressão, por parte das células cancerosas, de características e propriedades osteomiméticas parece constituir um evento chave que favorece a formação e manutenção de lesões secundárias. As células cancerosas da mama ou da próstata que expressam altos teores de osteopontina, osteocalcina e sialoproteínas ósseas (fenótipo osteoblástico) apresentam uma muito maior probabilidade de metastização óssea. Tomemos ainda o exemplo da sialoproteína II. Esta proteína apresenta uma expressão cem vezes maior nas células que metastizam para os ossos, do que para uma metastização visceral.

De notar, ainda, que as propriedades osteomiméticas das células cancerosas podem estender-se também ao fenótipo osteoclástico.

Como já foi referido, os factores moleculares presentes no micro-ambiente ósseo têm um papel determinante na formação de um micro-ambiente capaz de favorecer o desenvolvimento de lesões secundárias. A este respeito, Stefan Paget (1889) [53] propôs uma teoria conhecida por teoria do «*seed and soil*», afirmando que certos micro-ambientes, como o que se encontra no tecido ósseo, proporcionam um terreno fértil onde as células cancerosas podem crescer. Em paralelo, os mecanismos de remodelação óssea contribuem para uma renovação constante deste *soil*, desempenhando os osteoclastos um papel crucial neste processo. Roodman G.D. et al (2004) [50]. Refere que «*the osteoclasts act as plows to break up the "soil" and release its nutrients*», mantendo deste modo um ambiente muito "hospitaleiro" para as células tumorais.

Parece cada vez mais evidente que as células tumorais, ao chegarem à medula óssea, desencadeiam uma resposta inflamatória (estimulando a produção de RANKL pelas células osteoblásticas e células inflamatórias) que leva ao recrutamento e activação das células da linha osteoclástica e conseqüentemente a uma reabsorção óssea, criando um **ciclo vicioso** (Figura 17), entre as células ósseas e as células tumorais, reconhecido há já alguns anos por Roodman G.D. et al (2004) [50]. Estes investigadores reconhecem, assim, a existência de uma interacção bi-direccional entre células tumorais e células ósseas, admitindo que o *turnover* ósseo vai «abrigar e alimentar» as células cancerosas.

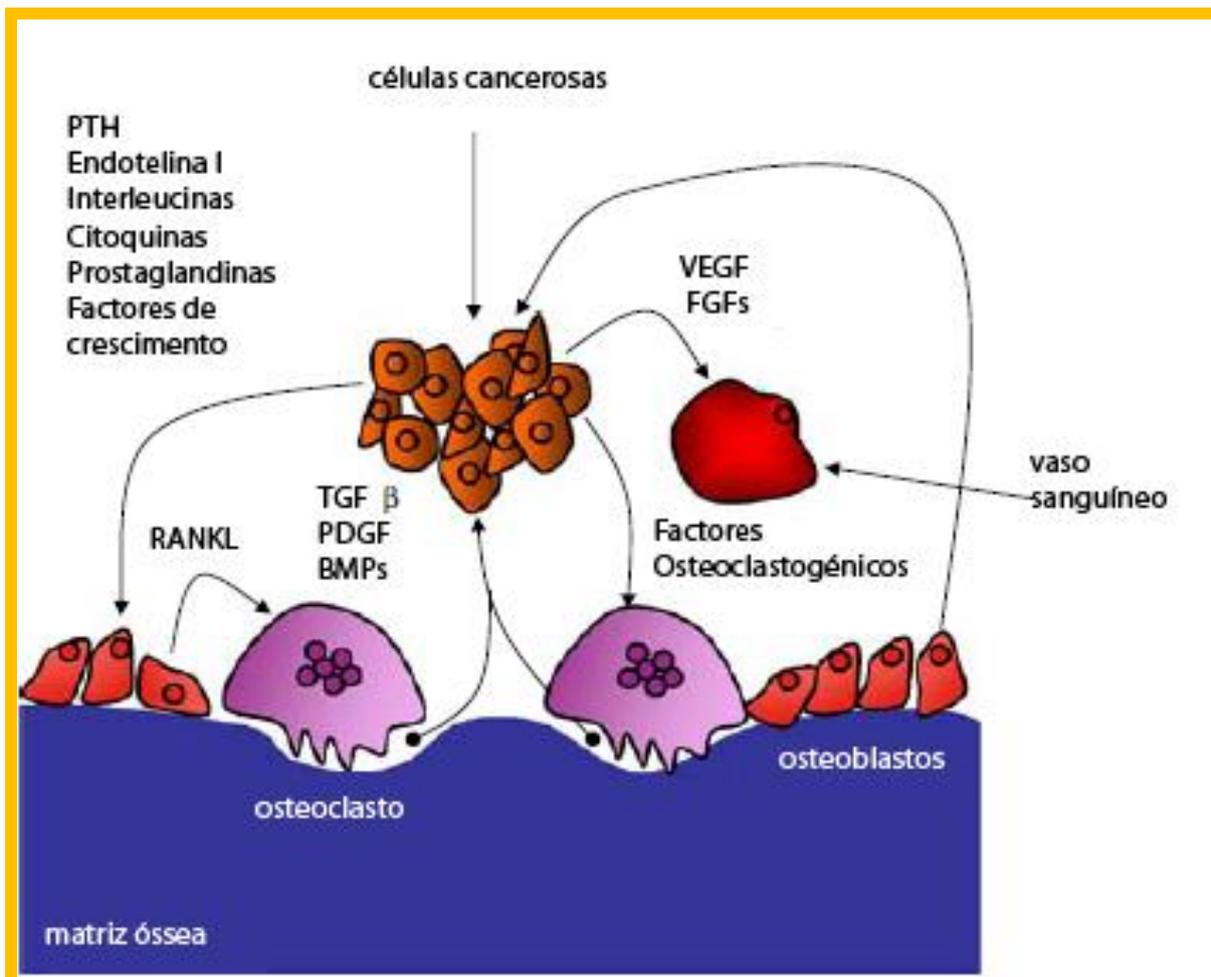


Figura 17 - Representação esquemática do “ciclo vicioso” estabelecido entre as células cancerosas, os osteoblastos e os osteoclastos. As células cancerosas pela produção de certos factores (PTH, endotelina 1, interleucinas, citoquinas, prostaglandinas e factores de crescimento) estimulam nos osteoblastos a síntese de RANKL, induzindo a formação de osteoclastos. A reabsorção da matriz (pelos osteoclastos) conduz à libertação de TGFβ, PDGF e BMPs, factores que vão contribuir para o crescimento e proliferação das células cancerosas. Estas células expressam também VEGF e FGFs, factores angiogénicos responsáveis pelo desenvolvimento de uma rede vascular de suporte. Adaptado de Clezardin P. (2007) [46].

Muitos dos factores libertados, através do processo de reabsorção óssea, nomeadamente o (TGFβ) são capazes de induzir uma transdiferenciação das células cancerosas (geralmente de natureza epitelial), provocando a transição de um fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimatoso. Esta circunstância aumenta consideravelmente a sua malignidade.

Com efeito, as células cancerosas estimuladas pelo TGFβ produzem mais factores osteolíticos (como a PTHrP, IL6, IL8 e IL11) que, por sua vez, vão incentivar ainda mais o processo de reabsorção e a libertação de mais TGFβ. Segundo certos autores o TGFβ parece ocupar uma posição central nestas situações, estando actualmente em investigação algumas maneiras de bloquear a sua acção. Neste âmbito a BMP7 (conhecida como uma proteína osteogénica) aparece bem posicionada, como antagonista

do mecanismo desencadeado pela TGF β , podendo inibir experimentalmente a acção osteolítica metastática do cancro da próstata.

O TGF β apresenta uma grande complexidade nos processos de malignização. Por um lado é considerado um agente supressor tumoral, inibindo o crescimento das células epiteliais. Mas, por outro lado, promove a invasão e metastização de células transformadas. Assim, apresenta uma funcionalidade diferente se considerada no início ou no final dos processos patológicos de malignização e metastização.

O destacamento das células tumorais, de origem epitelial, é considerado como a primeira etapa de uma complexa cascata de metastização e parece contribuir para a transição entre um fenótipo epitelial e mesenquimatoso. Neste processo de transformação as células perdem as suas características epiteliais (como a polaridade e a coesão) sofrem um re-arranjo do seu citoesqueleto e vão adquirindo um fenótipo de células conjuntivas com uma grande capacidade invasiva. Este desenvolvimento está associado a uma diminuição de expressão de marcadores epiteliais (como a caderina-E) e a um aumento dos marcadores mesenquimatosos (como a caderina-N e a vimentina). A função primária da caderina-E consiste na adesão célula a célula, típica das células epiteliais. A perda das caderinas-E pode contribuir para a invasibilidade das células.

Fournier P. G. et al. (2007) [51] descreve um modelo experimental de cancro da prostata no qual a BMP7 ao induzir (no tumor primitivo) a expressão de caderinas-E e reprimir a expressão de caderinas-N consegue contrariar ou impedir a transformação epitélio-mesenquima das células da prostata, prevenindo assim o desenvolvimento de metástases. Buijs et al (2007) [54] atribuem também à BMP7 um papel na manutenção do comportamento epitelial das células da prostata. Assim, parecem abrir-se perspectivas interessantes e clinicamente relevantes para o uso terapêutico de BMP7 no tratamento de certas neoplasias, como o cancro da prostata.

O efeito da BMP7, como antagonista do TGF β apresenta-se bastante promissor não só no tratamento de metástases osteolíticas do cancro da prostata, como também no cancro da mama e nos melanomas.

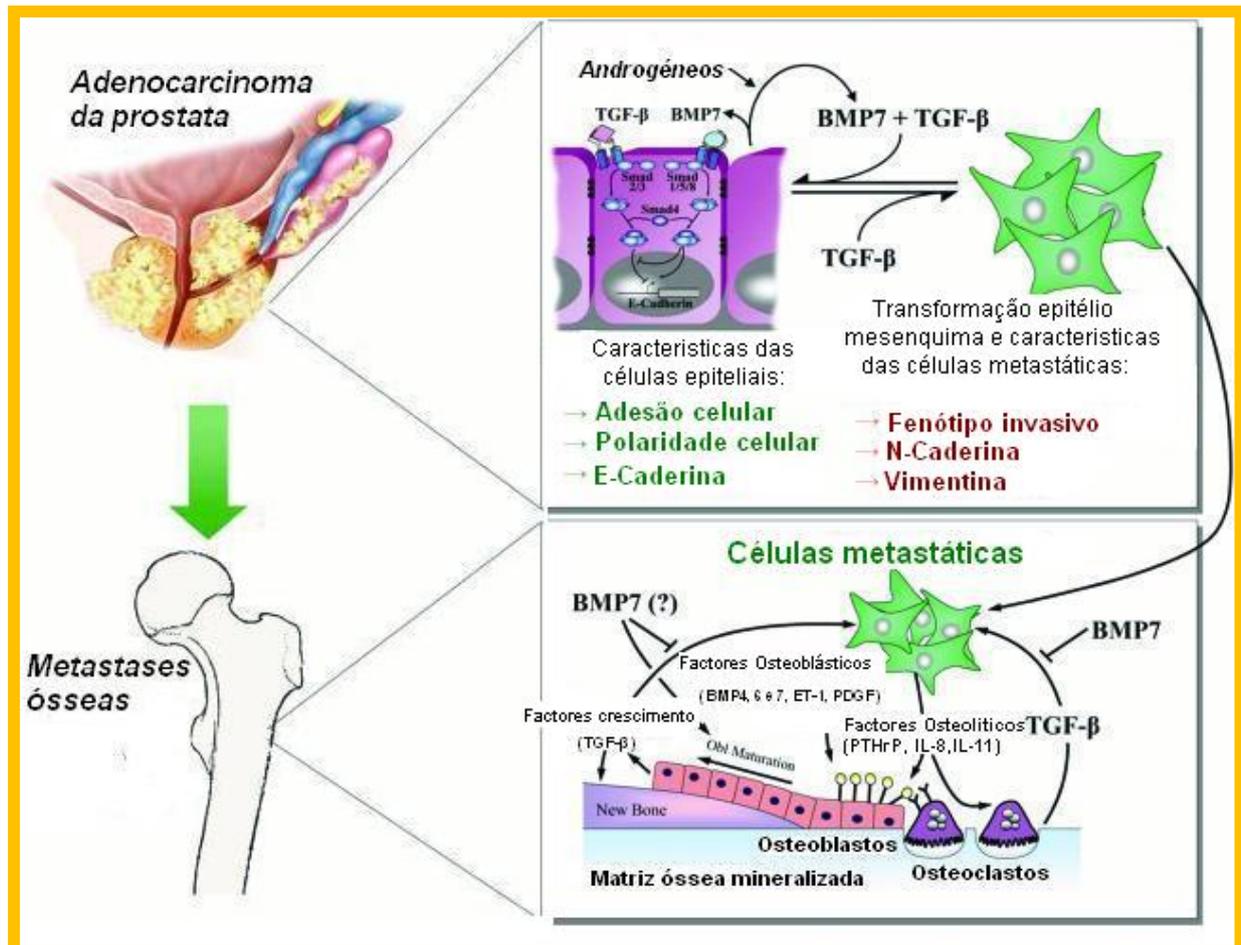


Figura 18 - Papel da BMP7 na metastização do cancro da próstata. **A** - Na próstata, os andrógenos estimulam a produção de BMP7 pelas células epiteliais. A BMP7 em conjunto com a TGF-β impede a transformação epitélio mesenquimal, através de diferentes mecanismos que incluem a manutenção da expressão da E-caderinas, da polaridade, e da coesão celular (características das células epiteliais) e previne o processo de metastização. A terapia anti-andrónica vai levar a uma perda deste mecanismo, facilitando o efeito do TGF-β na aquisição de um potencial metastático pelas células cancerosas (características mesenquimatosas, fenótipo invasivo e expressão de N-Caderina e Vimentina). **B** - Lesão neoplásica secundária - as células cancerosas metastáticas produzem factores osteolítica (PTHrP, IL-8, ou IL-11) que aumentam a reabsorção óssea quer directamente via osteoclastos quer via osteoblastos (através da produção de RANKL). Os factores de crescimento libertados pela matriz óssea, (TGF-β), suportam o crescimento das células cancerosas, aumentando a produção de factores (PTHrP, IL8, IL11) que estimulam a reabsorção óssea ou formação óssea (BMP4, 6, 7, ET1, PDGF). A BMP7, utilizada como agente terapêutico, pode inibir a manutenção e progressão deste ciclo vicioso (via TGF-β), o crescimento do tumor e a metastização óssea. Adaptado de Fournier P. G. et al. (2007) [51].

Para além de tudo isto, importa referir que as células cancerosas conseguem estimular os osteoblastos para a secreção de citocinas que alteram o micro-ambiente ósseo a seu favor. De facto, verificou-se que podem inibir o processo de diferenciação dos osteoblastos, desviando-os da sua normal capacidade para a síntese e mineralização da matriz óssea. Deste modo, a presença de células cancerosas pode impedir os osteoblastos de sintetizarem os factores de diferenciação necessários ao seu próprio desenvolvimento e maturação, chegando, mesmo, a influencia-los (pondo-os ao seu serviço) no sentido de secretarem moléculas que vão contribuir para a progressão do processo de metastização. Integram-se, ainda, neste âmbito certos factores angiogénicos

subjacentes ao desenvolvimento de uma rede vascular cada vez mais eficaz. Como tem vindo a ser demonstrado, existe uma estreita relação entre células endoteliais, células osteoblásticas e células osteoclásticas. Factores responsáveis pelos mecanismos angiogénicos com a endotelina 1 e o VEGF (Factor de crescimento endotelial vascular) parecem desempenhar um papel regulador nos fenómenos de remodelação óssea e no incremento e progressão das metástases.

Em paralelo e para manterem esta situação, as células cancerosas podem activar directamente os osteoclastos, contribuindo para o aumento das lesões osteolíticas e, deste modo, irem ganhando espaço (roubado à matriz óssea) para o seu desenvolvimento. De facto, e como já foi referido, as células tumorais podem expressar uma forma solúvel de RANKL provocando um acentuado desequilíbrio do eixo RANKL/RANK/OPG. O ratio RANKL/OPG pode, mesmo, apresentar um valor predictivo do processo evolutivo e da taxa de sobrevivência de certas neoplasias.

Em síntese, o micro ambiente exerce uma influência extraordinária no processo de localização e desenvolvimento das metástases ósseas. O "diálogo" entre as células cancerosas (*seed*) e o micro ambiente existente nos órgãos alvo (*soil*) irá orientar o destino das células metastáticas e a possível existência de condições para a sua proliferação e sobrevivência.

Pode afirmar-se, pois, que o tecido ósseo constitui, um terreno fértil para os processos de metastização tendo em conta que: a) é formado por áreas metabolicamente muito activas e altamente vascularizadas; b) possui um sistema vascular que permite uma fácil entrada e saída das células; c) os normais processos de remodelação óssea (necessários a uma constante adaptação deste tecido ao meio ambiente) fornecem moléculas quimiotácticas e factores de crescimento para o meio ambiente que, por um lado atraem as células cancerosas e por outro suportam o seu crescimento (com efeito, a matriz óssea constitui um rico "armazém" de factores de crescimento que são libertados durante o *turnover* ósseo; deste modo, as células cancerosas aí residentes encontram um "cocktail" de citocinas e factores favoráveis ao seu desenvolvimento); d) finalmente, as células cancerosas podem modular a actividade dos osteoblastos e osteoclastos a seu favor, desenvolvendo em paralelo uma rede vascular de suporte.

Uma pequena nota para sublinhar que as células metastáticas que alcançam a medula óssea podem manter-se num estado quiescente, durante vários anos antes de formarem metástases ósseas activas. Este facto pode justificar o aparecimento de metástases ósseas muito tempo após a remoção cirúrgica do tumor primitivo. É neste âmbito que os nichos endosteais ou osteoblásticos podem ter grandes implicações, parecendo-nos vantajoso fazer algumas considerações a este respeito.

Nichos Osteoblásticos

Os **nichos osteoblásticos**, também designados como nichos endosteais, são considerados compartimentos, existentes na medula óssea, anatômica e fisiologicamente muito importantes, que exercem uma influência determinante na biologia do desenvolvimento das células hematopoiéticas.

Está hoje confirmada a importância exercida pelas células da linha osteoblástica (pertencentes e localizadas no estroma da medula óssea) na proteção, retenção e regulação das células tronco da série hematopoiética, mantendo-as num estado quiescente (impedindo a sua diferenciação e mobilização). Com efeito, estas células osteoprogenitoras expressam certas citocinas que têm particular relevância na quimiotaxia, *homing*, retenção e sobrevivência das células hematopoiéticas. De facto, podem estabelecer-se íntimas ligações entre estas duas linhas celulares, atribuindo-se às células osteoblásticas uma grande responsabilidade na criação de um micro ambiente que condiciona a sequestração das células hematopoiéticas, inibindo a sua diferenciação e conservando a sua capacidade de auto-renovação (mantendo assim as suas propriedades de células tronco).

De facto, o micro-ambiente aí gerado regula e condiciona o seu destino. Qualquer ruptura ou desequilíbrio neste micro-ambiente pode conduzir a graves alterações do comportamento biológico e destino das células tronco da linha hematopoiética, provocando a sua diferenciação e mobilização. Este aspecto assume particular relevância nos processos mieloproliferativos e na metastização óssea.

Recentemente (Fig. 19) foi identificada, nestes nichos, a existência de células da linhagem osteoblástica com fenótipo fibroblástico designadas por Spindle-shaped, *N-cadherin osteoblasts (SNO)* que seriam responsáveis pela quiescência das células hematopoiéticas, impedindo, como já foi referido, a sua diferenciação e mobilização. Por este motivo, suspeita-se que são células como estas que mantêm as células cancerosas «sequestradas» durante longos períodos de tempo impedindo-as de proliferar até que modificações ambientais possam desencadear e estimular a suas capacidades proliferativas. É por este motivo tentador admitir que células deste tipo (*SNO ou SNO-like*) possam manter a quiescência das células tumorais.

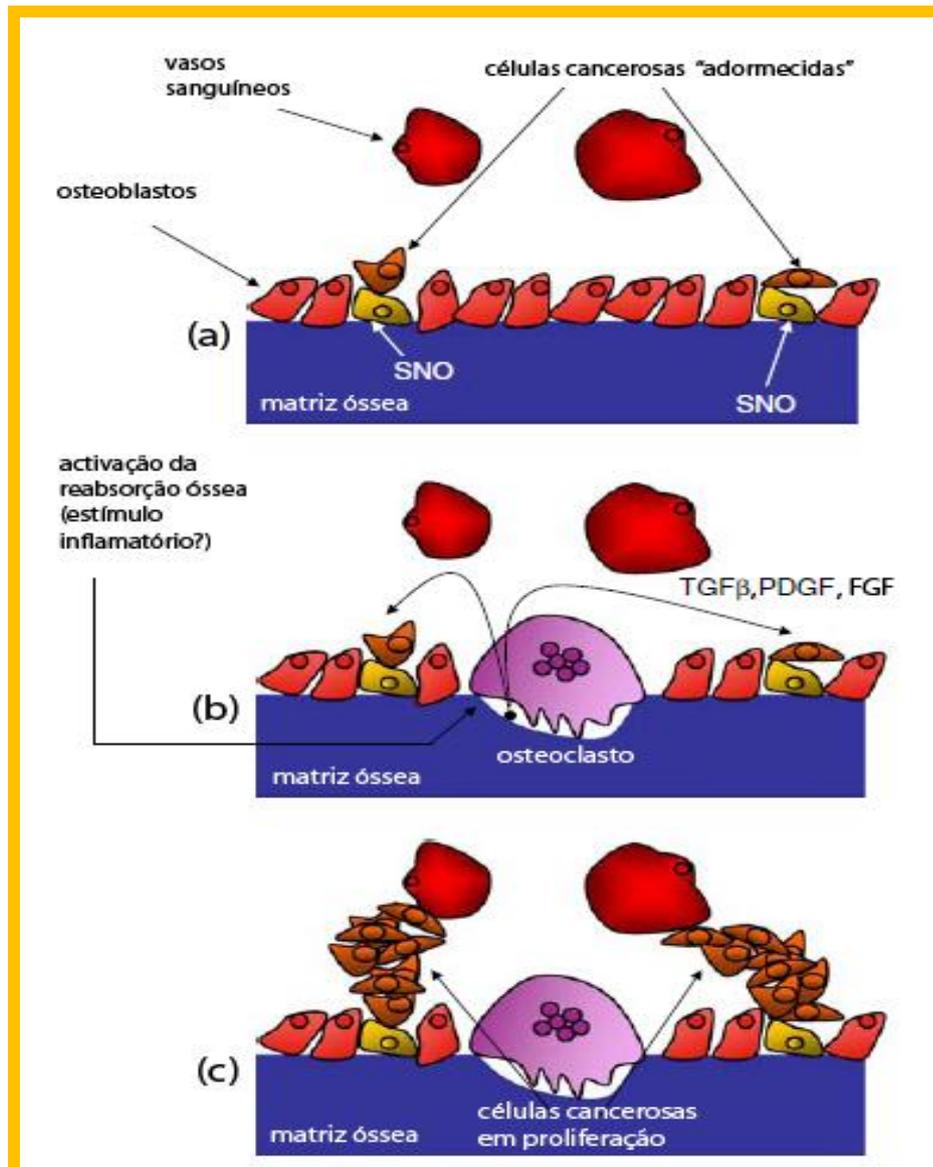


Figura 19 - Papel do nicho osteoblástico na regulação das células cancerosas. (a) Entre as células osteoblásticas que revestem a superfície óssea encontram-se algumas *Spindle-shaped, N-cadherin osteoblasts (SNO)*, responsáveis pela sequestração e manutenção das células cancerosas "adormecidas". (b) Qualquer alteração das condições do micro ambiente ósseo pode estimular os processos de reabsorção óssea (pelos osteoclastos), levando à libertação de TGFβ, PDGF, FGF, factores que, por sua vez, desencadeiam a activação das células cancerosas "adormecidas". (c) As células cancerosas, uma vez activadas, proliferam activamente, levando ao aparecimento de lesões metastáticas activas. Adaptado de Clezardin P. (2007) [46].

São várias as circunstâncias que podem desencadear a activação osteoclástica, levando à libertação dos factores de crescimento existentes na matriz óssea para o micro-ambiente medular e deste modo «despertar» as células tumorais «adormecidas». Os mecanismos inflamatórios aparecem como os principais candidatos responsáveis pela activação dos osteoclastos, desencadeando toda esta cascata de eventos. Esta problemática foi muito bem sintetizada por Lu H.(2006) [52] que intitulou desta forma

um dos seus trabalhos de investigação: «*Inflammation, a key event in cancer development*».

A este respeito convém acentuar que também as células tumorais secretam citocinas e quimioquinas pró inflamatórias, activando as células do estroma da medula óssea a fazer o mesmo. Estas citocinas e quimioquinas actuam quer directamente, quer indirectamente (através do endotélio vascular) no recrutamento de leucócitos. Em muitas situações mais de 70% da massa tumoral é constituída por leucócitos. Quando activados, estes leucócitos (*tumor associated leucocytes*) produzem factores angiogénicos, mitogénicos, enzimas proteolíticos e factores quimiotáticos que por sua vez vão recrutar mais células inflamatórias, contribuindo para o crescimento e invasão tumoral e ainda, e sobretudo, para um incremento dos processos de angiogénese.

Perante esta panóplia de mediadores pró inflamatórios, envolvidos nos processos de metastização óssea, está em pleno desenvolvimento uma nova geração de terapêuticas "revolucionárias" anti-citocinas, anti-quimioquinas e anti-angiogénias visando inibir os processos de metastização.

Entre os agentes anti-reabsortivos da matriz óssea estão os anti-corpos monoclonais para o RANKL, tendo um mecanismo de acção bastante semelhante à OPG. Estes anticorpos impedem a ligação do RANKL ao RANK, inibindo a formação de osteoclastos e reduzindo a incidência de metástases osteolíticas.

Os inibidores de TGF β , como a BMP7 estão também a ser estudados no tratamento de doenças neoplásicas, distrofia muscular, obesidade e outras doenças ósseas com desregulação de TGF β .

Os agentes anti-angiogénicas têm como destino as células endoteliais, alvos fáceis de atingir através de um tratamento sistémico. Estes compostos têm efeitos secundários discretos, uma vez que a angiogénese fisiológica no adulto está restringida ao ciclo menstrual e à regeneração de fracturas, sendo ainda bastante improvável o desenvolvimento de resistências à terapêutica (devido à estabilidade das células endoteliais).

Antagonistas dos receptores de endotelina 1 estão também em fase experimental visando o tratamento de tumores sólidos. No cancro da prostata sabe-se que a endotelina1 é um dos indutores mais importantes das metástases osteoclásticas, estimulando os osteoblastos e potenciando o efeito de factores de crescimento.

Estas novas estratégias terapêuticas, dirigem-se mais para o micro-ambiente ósseo do que propriamente para as células tumorais demonstrando, pela sua eficácia, a cumplicidade existente entre as células do tecido ósseo, as células tumorais, as células endoteliais e as células do tecido imunitário.

Os mecanismos de remodelação óssea envolvem todos estes elementos celulares ocupando, por certo, um papel determinante nos processos de metastização óssea.

Conclusões finais

Apesar de uma aparência inerte, os ossos são **estruturas plásticas**, altamente dinâmicas, em permanente remodelação durante toda a vida.

O **osso alveolar** é a área do esqueleto com maior ritmo dinâmico.

O tecido ósseo quando lesado, tem notáveis capacidades regenerativas, isto é, o seu processo de **auto-reparação** é efectuado através da **formação de novo osso** e não de uma cicatriz de tecido fibroso.

A **remodelação óssea** pode ser considerada (ela própria) um **processo inflamatório** ou uma forma altamente controlada e especializada de auto-imunidade (as áreas de tecido ósseo danificadas podem ser reconhecidas como "non-self").

No contexto da **osteimunologia**, a artrite reumatóide e a doença periodontal são consideradas como uma "**RANKL disease**" e a osteoporose é encarada como uma "**inflamm-aging**".

Os processos de **metastização** óssea têm muitas vezes como base um mecanismo inflamatório responsável por um desequilíbrio na reabsorção óssea. A reabsorção óssea vai por sua vez "alimentar" e "abrigar" as células neoplásicas, criando-se um "ciclo vicioso".

Por detrás de toda esta problemática parece estar um alteração do eixo **RANKL/RANK/OPG**.

Parte C – Bibliografia

1. Wolff, J. 1986. The law of bone remodeling [translated from the 1892 original, *Das Gesetz der Transformation der Knochen*, by P. Maquet and R. Furlong]. Berlin: Springer Verlag.
2. Currey JD: The mechanical adaptations of bones. Princeton, NJ, 1984, Princeton University Press.
3. Frost HM, 1990. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU). *Anat Rec* 226:403-422.
4. Seeman E. (2006). Osteocytes-martyrs for integrity of bone strength. *Osteoporos Int* 17:1443-1448.
5. Graber TM, et al. *Orthodontics: Current Principles & Techniques*. Elsevier Mosby, 4th Edition, 2005; 6:229-292.
6. Roberts WE, Bruce NE, David BB, James KH, Jeffery AR. Remodeling of Mineralized Tissues, Part II: Control and Pathophysiology. *Seminars in orthodontics* 2006; 12(4):238-53.
7. Roberts WE, Jeffery AR, Bruce NE, David BB, James KH. Remodeling of Mineralized Tissues, Part I: The Frost Legacy. *Seminars in orthodontics* 2006; 12(4):216-37.
8. Parfitt AM. Bone remodeling, normal and abnormal: a biological basis for the understanding of cancer-related bone disease and its treatment. *Can J Oncol* 1995; 5 Suppl 1:1-10.
9. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994; 55(3):273-286.
10. Grubb SA, Markam TC, Talmage RV. Effect of salmon calcitonin infusion on plasma concentrations of recently administered Ca. *Calcif tissue Res* 1979; 24:201-208.
11. Kierszenbaum Al. *Histologia e biologia celular*. In: Kierszenbaum AL, Editor. Tradução da 2^a edição ed: Mosby-Elsevier 2008.p.136-59.
12. Palma, P. (2009). Estudo de novas formulações para a regeneração óssea em defeitos de dimensão crítica [Tese de mestrado apresentada à FMUC], Coimbra: Universidade de Coimbra.
13. Nijweide P.J. et al (2002). The osteocyte in Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan. *Principles of bone biology*. Second edition, Academic Press 2002; 6:93-107.
14. Garant PR. *Oral Cells and Tissues*: Quintessence Publishing (IL) 2003.p. 195-238.
15. Faloni APS. Morte celular de osteoclastos do osso alveolar de ratas tratadas com estrogênio. [Tese de Mestrado em Ciências], São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2006.
16. Nulend J (2005). Mechanobiology of Bone Tissue. *Pathologie Biologie* S3 (2005) 576-580.
17. Väänänen H K, e tal. (2008). Osteoclast lineage and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473: 132-138.

18. Schilling et al (2006). Osteoclasts and biomaterials. *European Journal of trauma* 2006, vol 1, p.107-113.
19. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006; 8:455-498.
20. Frost HM. From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec* 2001; 262(4):398-419.
21. Martin T J, et al. Bone remodeling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Practice & Clinical Endocrinology & Metabolism*; vol 22, N 5; pp 701-722, 2008.
22. Henriksen K. et al (2009). Local communication on and within bone controls bone remodelling. *Elsevier Bone* 44:1026-1033.
23. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(5):444-51.
24. Pasquale E. B. (2008). Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133(1):38-52.
25. Everts V. et al (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 17:77-90.
26. Schwartz Z. et al (2000). Osteoblast proliferation and differentiation on dentin slices are modulated by pretreatment of the surface with tetracycline or osteoclasts. *J. Periodontol* 71:586-97.
27. Coxon J.P. e tal (2004). Advances in the use of bisphosphonates in the prostate cancer setting. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* - 7, 99-104.
28. Boyce B (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modelling and remodelling. *Arch Biochem Biophys.* 473(2):139-146.
29. Sims N. et al (2008). Bone remodelling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell & Developmental biology* 19: 444-451.
30. Szule et al (2009). Thinking inside and outside the envelopes of bone. *Osteoporos Int* 20:1281-1288.
31. Eriksen E (2007). Perspective remodelling and vascular spaces in Bone. *Journal of bone and mineral research*, vol 22, 1-6.
32. Andersen T. et al (2009). A physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. *The American Journal of Pathology*, vol.174: 239-247.
33. Mødder U. (2008). Skeletal Stem/Osteoprogenitor Cells: Current Concepts, alternate hypotheses and relationship to the Bone Remodeling Compartment. *Journal of Cellular Biochemistry* 103: 393-400.
34. Grellier M. (2009). Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *cell*.
35. Pettit A. et al (2008). Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. *Elsevier Bone*, 43: 976-982.

36. Chang M. et al (2008). Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and Mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology* 181:1232-1244.
37. Allison R. et al (2008). Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/bone.
38. Lourenzo J. (2008). Osteoimmunology: interactions of the bone and Immune System. *Endocrine Reviews* 29: 403-440.
39. Katagiri T., Takahashi N. (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 8(3): 147-159.
40. Tyrovola, J B, et al. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *Journal of Oral Science*, vol. 50, N. 4, 367-376, 2008.
41. Cohen M. (2006). The new Bone Biology: pathologic, Molecular and clinical correlates; *American Journal of Medical Genetics Part A*. 140A:2646-2706.
42. Roberts WE, Simmons KE, Garetto LP, DeCastro RA. Bone physiology and metabolism in dental implantology: risk factors for osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Implant Dent* 2006; 1(1):11-21.
43. Nakashima T. (2009). Osteoclasts and the immune system. *J. bone mineral Metab* 27:519-529.
44. Sipos W. et al (2009). Pathophysiology of osteoporosis. *Wien. Med. Wochenschr.* 159/9-10: 230-234.
45. Martin T. (2008). Regulatory pathways revealing new approaches to the development of anabolic drugs for osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 19:1125-1138.
46. Clezardin P. (2007). Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications *Clin Exp. Metastasis* 24: 599-608.
47. Mundy R. Gregory (2009). Endothelin-1 and osteoblastic metastasis. Departments of Cellular and Structural Biology and Orthopedics, University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX 78229.
48. Bussard K. (2008). The bone microenvironment in metastasis: what is special about bone?. *Cancer metastasis Rev* (2008) 27: 41-55.
49. Armstrong A.P. et al (2008). RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate* 2008 Jan 1; 68(1): 92-104.
50. Roodman, G.D. (2004). Mechanisms of bone metastasis. *New England Journal of Medicine*, 350, 1655-1664.
51. Fournier Pierrick G.J. e tal. (2007). BMP7: A New Bone Metastases Prevention? Department of Internal Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, University of Virginia, Charlottesville, Virginia. *Am J Pathol.* 171 (3): 739 – 743.
52. Lu H. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Mol. Cancer Res.* 4:221-233.
53. Stefan Paget (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1:571-573.

54. Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G, van Overveld PGM, Schwaninger R, Henriquez NV, Papapoulos SE, Pelger RCM, Vukicevic S, Cecchini MG, Löwik CWGM, van der Pluijm G: BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *Am J Pathol* 2007, 171:1047-1057.