

Dissertação de candidatura ao grau de mestre
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e a forma desta dissertação (Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art. 108, & único).

Orientadores:

Professora Doutora Maria Helena Figueiredo

Professor Doutor Francisco do Vale

*“Não andes apenas pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os outros já foram.”*

Alexander Graham Bell

Agradecimentos

À Professora Doutora Helena Figueiredo, pela sua constante disponibilidade, pelo seu empenho categórico apesar de todas as adversidades (que apenas aos grandes Homens são impostas), pela motivação e entusiasmo contagiantes que demonstrou sempre no decorrer da elaboração deste trabalho. A realização desta tese não teria sido possível sem a sua ajuda, orientação e partilha de conhecimento científico. Agradeço também os enormes contributos que me deu ao longo da realização deste trabalho, fomentando sempre o rigor e o raciocínio científico. Agradeço-lhe toda a disponibilidade para me guiar no meu percurso académico, primeiro por acreditar em mim enquanto aluno, e durante os anos seguintes como investigador e docente. As horas passadas ao microscópio, nunca perdidas, mas sempre cheias de partilha de saber fizeram de mim, sem dúvida, um profissional muito mais preenchido. Não é fácil agradecer a quem, além de Professora e orientadora, se tornou acima de tudo família – a “mãe histológica”.

Ao senhor Prof. Francisco do Vale, co-orientador deste trabalho, pela cedência dos materiais de experiência, pelos conselhos dispensados e pela preciosa ajuda facultada, e ainda por todo o incentivo e orientação científica, que só me fez crescer ao longo deste trabalho.

Ao Senhor Prof. Paulo Palma que desde cedo me tem acompanhado na minha caminhada não só pela investigação mas também pela área clínica e cuja amizade, escuta ativa e crítica permitiu a abertura de caminhos na reflexão e aprofundamento das metas a que me propus. Agradeço também a prontidão em ceder-me parte dos seus materiais da tese de doutoramento para que pudesse levar a cabo o estudo a que me propus. Além disso, agradeço-lhe pela forma como, nos momentos chave, me motivou, de forma entusiasmada e genuína, perante cada obstáculo ou sucesso alcançado.

À Dr. Catarina Cortez Vaz, pela amizade e pela preciosa disponibilidade com que me agraciou na realização de algumas tarefas sem a qual não seria possível levar a cabo o término deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer, numa nota mais pessoal, à minha família (em especial à minha mãe), pilares inabaláveis da minha motivação, pelo apoio incondicional com o qual sei que posso sempre contar.

Agradecimentos

I – Introdução

1. Justificação do tema
 - 1.2 Planificação do trabalho
2. Ciclo de Remodelação óssea (alguns aspetos)

II – Compartimento de Remodelação Óssea (CRO) - estudo experimental em modelo animal

1. Objetivo
2. Materiais e Métodos
 - 2.1 Animal de experimentação
 - 2.2 Manutenção e bem-estar animal
 - 2.3 Colheita do material
 - 2.4 Processamento histológico de material descalcificado
 - 2.5 Processamento histológico de material não descalcificado
3. Resultados
 - 3.1 Detecção de CRO no tecido ósseo alveolar
 - 3.2 Identificação de diferentes etapas do ciclo de remodelação óssea
 - 3.3 Detecção de compartimentos de remodelação no cimento e dentina
4. Discussão e conclusões

III – Resumo

IV – Summary

V – Bibliografia

VI – Índice

VII- Anexos

I. Introdução

1. Justificação do tema

Apesar de uma aparência inerte, quando considerados macroscopicamente, os ossos são, sob um ponto de vista microscópico, estruturas plásticas, altamente dinâmicas, em permanente remodelação (1). A sua grande dinâmica funcional é conseguida sobretudo através de processos de remodelação.

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, visando não só uma adaptação da estrutura óssea às solicitações mecânicas, como também a remoção de áreas danificadas (2).

Por outro lado, a matriz óssea constitui um importante reservatório de iões minerais (cálcio e fósforo), verificando-se um intercâmbio contínuo entre o cálcio plasmático e o cálcio ósseo. Com efeito, a importância da homeostasia dos níveis séricos de cálcio vem considerar o processo de remodelação como um mecanismo de gestão do banco de cálcio ósseo.

Deste modo, o objetivo da remodelação óssea parece incluir não só uma perspetiva mecânica, dirigida para a reparação e adaptação da estrutura óssea ao meio, como uma perspetiva metabólica relacionada com a homeostasia do cálcio plasmático.

É importante referir que, em condições fisiológicas, as funções de suporte e de reserva metabólica apresentam-se num equilíbrio estável. Porém, em situações de desequilíbrio, a função estrutural é sempre sacrificada em favor da metabólica (3-5).

A remodelação óssea consiste num processo pelo qual é eliminada uma área de tecido ósseo que será substituída por outra, com pouca ou nenhuma alteração da massa óssea, constituindo a mais notável resposta do tecido ósseo ao seu meio envolvente. Qualquer ciclo de remodelação compreende uma sequência ordenada e imutável de eventos que se inicia por uma fase de reabsorção óssea e termina com uma etapa reparadora de formação óssea.

O conjunto de células responsáveis por estas diferentes atividades é coletivamente designado por Unidades Multicelulares Básicas (*Basic Multicellular Units*) (11,12,13), vulgarmente conhecidas pela sua abreviatura, BMU, e reúne uma equipa de células osteoclásticas e uma outra de células osteoblásticas (6-8). Desta unidade fazem também parte outras populações celulares que incluem células mesenquimatosas indiferenciadas e células do tecido conjuntivo, muitas delas pertencentes ao sistema imunitário, bem como um suplemento vascular especializado para o efeito.

De facto, a remodelação óssea tem atrás de si uma complexa maquinaria celular que, por sua vez, está sujeita à ação de numerosos fatores de regulação, que exigem um rigoroso e apertado sistema de sinalização e comunicação, responsável pela ação concertada de todas estas células e pela coordenação e transição equilibrada das diferentes etapas da remodelação (1).

Era, pois, previsível que toda esta atividade celular tivesse que ser, de certo modo, “protegida” de interferências estranhas, vindo em 2001 a ser descrita a existência de uma estrutura visando

proteger e abrigar este complexo e delicado conjunto celular responsável pelos processos de remodelação. Com efeito, *Hauge et al. (2001) (9)* foram os primeiros investigadores a apontar para a presença de um compartimento de remodelação óssea, como uma entidade real, ainda que transitória, demonstrando histologicamente a sua existência. De facto, os trabalhos de *Hauge et al (2001)* concluíram que as células constituintes das *BMU's* (mesmo no caso do tecido ósseo esponjoso), não estão em contacto direto com o tecido conjuntivo em seu redor, mas reunidas num espaço fechado, separado do exterior por um conjunto de células que formam uma cúpula (habitualmente conhecida por *canopy*), que constitui o limite externo de uma estrutura especializada (9). Esta estrutura foi então designada por *Compartimento de Remodelação Óssea (BRC)*.

Se a remodelação óssea se processasse num espaço amplamente aberto, seria difícil o controlo dos numerosos e importantes fatores de crescimento e de regulação, necessários aos processos de diferenciação e maturação das células das linhas osteoclástica e osteoblástica. Com efeito, a concentração atingida por estes fatores no interior de um espaço confinado irá facilitar a boa prossecução dos mecanismos de remodelação óssea.

Pode considerar-se, assim, que o BRC constitui um microambiente ideal para o desempenho da intensa atividade celular que caracteriza uma *BMU*, permitindo encontrar no seu interior um apropriado gradiente de citoquinas e outros fatores moleculares capazes de recrutar as populações celulares necessárias, permitir a sua diferenciação e, deste modo, modular a ligação entre a fase de reabsorção e a fase de formação óssea.

O aparecimento destes *BRCs*, nos locais de remodelação óssea, coincide sempre com a fase de ativação e início da fase de reabsorção do processo de remodelação. Por outro lado, o seu desaparecimento observa-se apenas quando já estiver completa a etapa de formação óssea. Está também confirmado que as situações de baixo *turnover* ósseo estão associadas a um decréscimo do número de *BRCs*, enquanto os casos de elevado *turnover* ósseo, são acompanhados por um aumento do número de *BRCs* (10). De referir ainda que a perda de integridade de qualquer dos componentes anatómicos constituintes destas estruturas, nomeadamente da *canopy*, está sempre relacionada com uma paragem no processo de reconstrução óssea. Estes factos reforçam bem a íntima relação entre *BRCs* e remodelação óssea, apontando mais uma vez para a importância crucial que esta estrutura representa nos mecanismos de regulação coordenação e integração dos processos de recrutamento e diferenciação das células da linha osteoclástica e osteoblástica.

Dos trabalhos de investigação realizados no âmbito da remodelação óssea, os estudos de carácter histológico são escassos e surgem quase sempre numa posição secundária, como uma base morfológica de apoio necessária à elaboração e justificação de teorias de cariz bioquímico, conducentes ao desenvolvimento e otimização de soluções terapêuticas relacionadas com o metabolismo ósseo. De facto, devido ao demasiado enfoque dado à atividade das células da série

osteoblástica ou osteoclástica *de per si* (assente em técnicas de isolamento e culturas celulares cada vez mais sofisticadas) foi-se perdendo uma perspetiva global da micro anatomia e constituição histológica, no seu todo, da região onde se desenrola o processo de remodelação óssea.

É realmente de espantar como só recentemente foi detetada a existência de um compartimento de remodelação óssea e reconhecida a importância que a constituição e preservação desta estrutura anatómica, e suas relações topográficas, com o microambiente em seu redor, nomeadamente os vasos sanguíneos, representa na funcionalidade do ciclo de remodelação óssea.

Todo o esforço que tem sido despendido visando aumentar a eficácia dos processos de formação óssea com base em agentes anabólicos nunca será bem-sucedido se não se verificarem as condições logísticas necessárias que assegurem o recrutamento e proteção das células osteoprogenitoras e dos seus fatores de regulação, ou seja, a integridade do BRC.

Assim, o trabalho aqui apresentado pretende contribuir para um melhor conhecimento da constituição histológica do compartimento de remodelação óssea, tendo por base uma análise em microscopia de luz de material incluído em parafina e em metilmetacrilato.

Uma vez que pretendemos integrar este estudo no âmbito da medicina dentária, e considerando que a atividade de remodelação óssea atinge no osso alveolar uma frequência notável, incidimos os trabalhos experimentais no tecido ósseo esponjoso e no tecido ósseo compacto que formam o osso alveolar. Decidimos também estender as observações para a dentina e para o cimento, uma vez que são tecidos mineralizados capazes de sofrer processos de remodelação.

1.2 Planificação e apresentação do trabalho

Este trabalho encontra-se organizado em três partes distintas. Na primeira parte (*Parte A*), após a introdução e justificação do tema, procedemos a uma breve revisão sobre os elementos celulares que constituem o tecido ósseo e traçamos uma perspetiva global do ciclo de remodelação óssea. Pretende-se com esta revisão proporcionar uma base geral de apoio indispensável para uma melhor compreensão dos trabalhos experimentais

Na segunda parte (*Parte B*), após uma descrição dos materiais utilizados e das metodologias aplicadas, procedemos à apresentação pormenorizada das características histológicas dos compartimentos de remodelação observados em trabéculas do tecido ósseo esponjoso, em cones de reabsorção do tecido ósseo compacto e em áreas de reabsorção de cimento e dentina. Finalmente apresenta-se uma discussão e interpretação global dos resultados.

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

2. Ciclo de remodelação óssea (alguns aspetos)

A remodelação óssea compreende uma série ordenada de eventos (Figura 1) que vão converter uma superfície em repouso numa zona em remodelação seguindo uma sequência imutável de ativação (**A**) → reabsorção (**R**) → formação (**F**) (11,14). 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 (15). Este fenómeno pode verificar-se igualmente noutros tecidos mineralizados, seguindo a mesma sequência.

Este processo pressupõe também uma perfeita coordenação e integração de atividades celulares, controladas pela interação de estímulos mecânicos, moléculas circulantes (de natureza hormonal e não-hormonal) e fatores de crescimento produzidos localmente (16). Parecem ser no entanto as moléculas produzidas ou libertadas localmente, no compartimento de reabsorção óssea, que constituem os principais agentes moduladores do ciclo celular da remodelação (16,17).

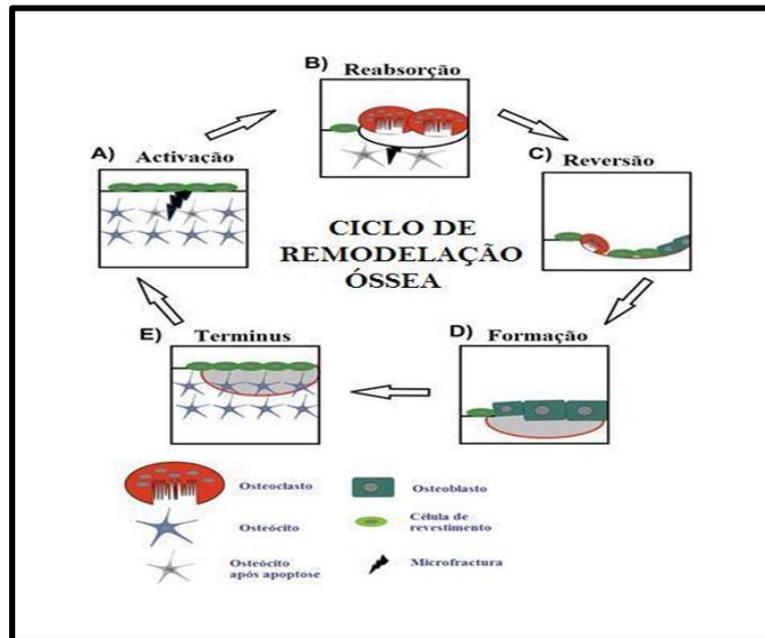


Figura 1 - Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea. Adaptado de Pereira (2010)

A fase de ativação (**A**) compreende o reconhecimento de uma área precisa da superfície óssea e a sua preparação para o processo de remodelação. O início desta fase parece ser, como será descrito mais adiante, da responsabilidade de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos osteócitos em “sofrimento” ou em apoptose, localizados na área que irá ser sujeita a remodelação (2,11,14). Esta situação leva à formação de um compartimento de remodelação óssea, ao

recrutamento e migração dos precursores osteoclásticos e ao reforço dos mecanismos da osteoclastogênese.

Com efeito, a fase de ativação do ciclo de remodelação óssea (definida como a conversão de uma superfície óssea de um estado quiescente para um estado ativo) é tradicionalmente caracterizada pela digestão da fina camada de endóstio, conduzindo a uma mais fácil exposição da matriz mineralizada (18). Deste modo, as células de revestimento destacam-se da matriz mineralizada, localizando e confinando a área a ser remodelada, constituindo a parede externa ou *canopy* do compartimento de remodelação óssea. Estas células, por sua vez, têm também uma participação ativa no recrutamento dos osteoclastos e, deste modo, no desencadear do processo de remodelação (19).

Será pertinente referir a intervenção dos capilares sanguíneos e sua provável adesão a estas células, como uma parte integrante e importante desta etapa inicial da ativação. Além disso, e como será referido posteriormente existe, de facto, durante todas as fases do ciclo de remodelação óssea um íntimo contacto dos componentes vasculares com o compartimento de remodelação óssea (20,21). O esquema da figura 2 demonstra a estreita relação espacial e funcional quer no tecido ósseo esponjoso quer no tecido ósseo compacto dos vasos sanguíneos com o BRC.

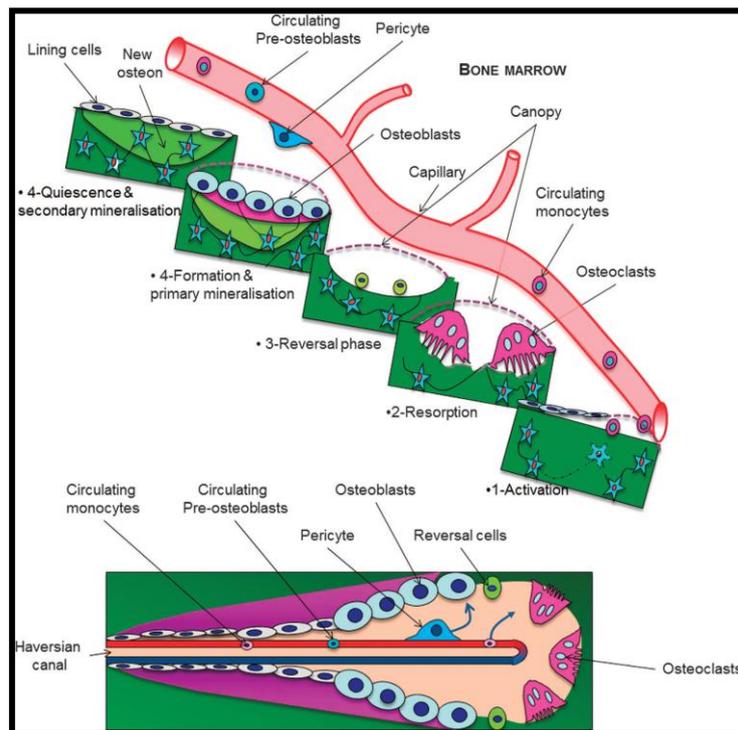


Figura 2 - Ilustração das relações espaciais e funcionais entre capilares sanguíneos e do compartimento de remodelação óssea no tecido ósseo trabecular (topo) e tecido ósseo cortical (em baixo). Células precursoras de osteoclastos provenientes da circulação sanguínea chegam à superfície do tecido ósseo após atravessarem a parede do vaso e a canopy, onde a unidade de remodelação óssea irá ocorrer. Esta proximidade vascular permite ainda a diferenciação quer dos pericitos quer de células circulantes em células da linha osteoblástica. (Adaptado de Lafage-Proust et al. 2015).

Na fase de reabsorção (**R**) os osteoclastos cavam, no tecido ósseo esponjoso, lacunas de contornos muito irregulares denominadas por lacunas de Howship e no tecido ósseo compacto cavidades cilíndricas designadas por cones de reabsorção (22,23). De facto, tal como referenciado por Eriksen (2007) o CRO foi até agora detalhadamente descrito no tecido ósseo esponjoso apesar de que uma estrutura semelhante deva existir no tecido ósseo compacto (24).

No final desta etapa observa-se uma inversão ou reversão nesta sequência, verificando-se um conjunto de condições responsáveis pela chamada de células osteoprogenitoras e sua diferenciação, dando início ao processo de reparação óssea (23).

Esta estimulação da atividade osteoblástica, como resposta ao processo de reabsorção osteoclástica, é habitualmente conhecido por *coupling*.

Ainda que o processo de diferenciação e ativação das células da linha osteoclástica esteja, como já foi referido, muito controlado pelas células da linha osteoblástica (pré-osteoblastos, osteoblastos, osteócitos e células de revestimento), através do eixo de regulação *RANKL/RANK/OPG* (25), esta via não é de sentido único, uma vez que também os osteoclastos condicionam e modulam muitas das atividades osteoblásticas. Nesta fase estabelece-se também uma complexa comunicação bi-direccional que vai inibir a atividade dos osteoclastos e promover a dos osteoblastos.

Parecem verificar-se pelo menos quatro classes de sistemas de sinalização derivados dos osteoclastos, ou da sua atividade, responsáveis pelo início e desenvolvimento da etapa de formação óssea mas que começam a manifestar-se na fase de reversão: a) fatores de crescimento e citocinas com efeito osteogénico contidos na matriz óssea e libertados durante o processo de reabsorção osteoclástica; b) fatores de crescimento sintetizados e secretados pelos próprios osteoclastos, exercendo um efeito parácrino nos osteoblastos; c) um contacto direto célula-célula entre osteoclastos e osteoblastos; e d) alterações deixadas pelos osteoclastos na nanotopografia da superfície óssea reabsorvida com reconhecida ação osteoindutora.

Com efeito, e de acordo com a alínea a), a matriz óssea representa um verdadeiro armazém de citocinas e fatores de crescimento em fase latente, produzidos pelos osteoblastos que são libertados e ativados na sequência do processo de degradação osteoclástica. Neste âmbito podemos referir, entre muitos, o fator de transformação β ($TGF\beta$), os fatores de crescimento insulino-aparentados (*IGF I e II*), o factor de crescimento fibroblático (FGF), o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), e as proteínas morfogenéticas ósseas (*BMPs*).

Entre os fatores de crescimento sintetizados diretamente pelos osteoclastos, e referidos na alínea b), estão mais uma vez as $TGF\beta$ s e as PDGFs. Também o fator osteoclástico *esfingosina 1-fosfato (SIP)* parece desempenhar um papel importante na fase de reversão (26). A síntese de *SIP* pelos

osteoclastos estimula o recrutamento, migração e sobrevivência das células da linha osteoblástica (27).

Por outro lado, e em concordância com a alínea c) está já confirmada uma sinalização direta bidireccional entre osteoblastos e osteoclastos através de proteínas transmembranares presentes nestas células, regulando simultaneamente a atividade de cada uma delas. Neste âmbito, encontramos o sistema *Ephrin-Eph* como mediador da interação entre osteoclastos e osteoblastos (2,28,29).

A interação entre as *ephrin B2* (expressas nas membranas dos osteoblastos) e os seus recetores *EphB4* (presentes nos osteoclastos) requer um contacto físico directo célula-célula (30), que promove a diferenciação osteoblástica e, ao mesmo tempo, inibe a atividade osteoclástica.

Pode pois afirmar-se que os osteoclastos serão responsáveis, através da secreção de clastoquinas, como a *SIP*, pelo recrutamento das células osteoprogenitoras para os locais de reabsorção, estimulando ao mesmo tempo a sua diferenciação através do sistema de *Ehprinas* (29).

Compreende-se, pois, que a simples presença de osteoclastos, independentemente da sua capacidade de reabsorção, constitua um fator essencial nos mecanismos de osteogénese, produzindo fatores ativadores da função osteoblástica. A nova geração de agentes anti-reabsorção (muito utilizada nas situações de osteoporose) começa a ter em conta este facto, tentando não atingir a sobrevivência dos osteoclastos, ainda que bloqueiem a sua atividade reabsortiva (31).

Por fim, as alterações na nanotopografia da superfície óssea, efetuadas pelos osteoclastos, e referidas na alínea d), parecem ter uma importância determinante nos processos de adesão e diferenciação das células da linha osteoblástica (32). A este respeito, é impossível deixar de referir que as concavidades escavadas pelos osteoclastos constituem locais estratégicos e privilegiados para a formação da matriz osteóide e sua posterior mineralização. A geometria conformacional, dimensão, composição, microarquitetura e ainda a nanoestrutura de superfície destas cavidades criam um microambiente propício ao aparecimento de um fenótipo osteoblástico. Estas lacunas parecem favorecer, ou mesmo contribuir, para uma sequestração de iões (nomeadamente cálcio) e de fatores de crescimento e outras proteínas com efeitos osteoindutores, estimulando ao mesmo tempo os processos de angiogénese (33). Todos estes fatores terão uma influência determinante na coordenação e transição equilibrada entre a fase de reabsorção e formação óssea.

Importa salientar que as células que caracterizam a fase de reversão e que vão beneficiar da ação osteo-indutora dos factores atrás mencionados, resultantes da atividade das células osteoclásticas, não são osteoblastos maduros mas sim percursores de osteoblastos que colonizam as superfícies ósseas após o desaparecimento dos osteoclastos. A origem das células que revestem o compartimento de reabsorção não está ainda esclarecida, podendo estas serem células endoteliais transformadas (*transformed endothelial cells*) ou pericitos vascular (24). Ainda assim, a hipótese mais aceite parece ser a de que as células da cúpula sejam derivadas das células de revestimento ósseo, que parecem encontrar-se, no entanto, num estadio muito precoce de desenvolvimento, podendo

dar origem a grande parte das células que nesta fase vão diferenciar-se em osteoblastos. Para além disto, é também de considerar a forte presença de células osteoprogenitoras que chegam, nesta altura, ao compartimento de reabsorção provenientes de outras origens. Na verdade, no interior do BRC parece existir uma grande proliferação celular na região entre a superfície óssea e a cúpula do compartimento (34-36), atingindo nesta fase o seu maior pico (37), e a sua ausência é coincidente com a não progressão para a fase de formação (9,38-40).

A fase de reversão parece constituir uma das etapas mais delicadas do ciclo de remodelação pois qualquer perturbação poderá provocar um desequilíbrio que, apesar de ténue, colocará em causa a integridade do BRC.

Por último, o preenchimento e reparação da cavidade de reabsorção é naturalmente da responsabilidade de osteoblastos maduros com origem nas células observadas durante a fase de reversão e que, entretanto, beneficiaram de um processo de maturação e ativação.

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 de Howship com novo tecido ósseo ou de um cone de reabsorção, dando origem ao aparecimento de um novo sistema de *Havers*.

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 recém sintetizada e mineralizada estão também envolvidos no processo de regulação da fase de formação (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 (29).

Pode, pois, afirmar-se que a reabsorção e a formação óssea são fenómenos que estão intimamente acoplados, visto que o início da primeira estimula a atividade 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 (41).

Porém, ainda hoje, grande parte dos investigadores que se dedicam ao estudo do tecido ósseo continua a considerar o processo de reabsorção e formação óssea, como se de mecanismos separados se tratasse. Ainda que a associação e alinhamento sequencial entre reabsorção (osteoclástica) e formação (osteoblástica) raramente esteja afetada, o balanço final em termos de massa óssea pode variar consideravelmente. Como é sobejamente conhecido com o avançar da idade e, sobretudo, em situações de osteoporose obtém-se um balanço final (entre formação e reabsorção) negativo. Estas situações repercutem-se também ao nível do osso alveolar bem como no tecido ósseo esponjoso da mandíbula. Com efeito, durante a menopausa observa-se um aumento da reabsorção dos processos alveolares e uma diminuição da espessura da cortical, sobretudo a nível do ângulo mandibular (42).

De igual modo, 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, associada a processos de reabsorção osteoclástica.

A este respeito importa referir que os processos de reabsorção osteoclástica estão muitas vezes associados à atividade e progressão de certas doenças, como é o caso da doença periodontal, podendo afetar seriamente o osso alveolar, ao provocar grandes áreas de reabsorção óssea (43). A placa bacteriana e particularmente os LPSs (lipopolissacarídeos componentes da superfície da parede de algumas bactérias Gram negativas) constituem potentes endotoxinas que estimulam por si só (de uma forma direta), ou através da expressão de citocinas pró-inflamatórias (de uma forma indirecta) a atividade osteoclástica. A perda da radiopacidade típica da lâmina dura é muitas vezes interpretada como uma imagem de marca da doença periodontal crónica, traduzindo processos de reabsorção óssea, associados a uma resposta inflamatória.

Em síntese, pode afirmar-se que no processo de remodelação óssea intervêm duas atividades opostas mas complementares, a reabsorção, a cargo das células da linha osteoclástica, e a formação do tecido ósseo, a cargo das células da linha osteoblástica, funcionando em estreita coordenação e integração (44).

O tecido ósseo constitui, pois, um notável material de construção, de natureza biológica, com a singular capacidade de edificar estruturas muito resistentes que se remodelam e repara a si próprias.

II. Compartimento de Remodelação óssea – estudo experimental em modelo animal

1. Objetivo

Tendo em conta a contínua colaboração que desenvolvemos nos estudos essencialmente de índole morfológica no âmbito de diversos trabalhos experimentais realizados para obtenção de teses de mestrado integrado, mestrado e doutoramento e, dadas as limitações económicas prementes para levar a cabo um novo estudo experimental, decidimos observar com mais pormenor algumas das lâminas dos trabalhos acima referidos. De facto, a existência do compartimento de remodelação óssea já tinha sido por nós detetada aquando a observação cuidadosa dos cortes histológicos sem contudo ter sido descrita pois encontrava-se fora do âmbito dos estudos em questão.

Assim, a análise qualitativa dos cortes histológicos teve como objetivo a deteção e identificação do compartimento de remodelação óssea (BRC) nas áreas de tecido ósseo alveolar mandibular incidindo fundamentalmente na observação e registo das suas características histomorfológicas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animal de experimentação

Foram utilizados quatro cães (*Canis familiaris*) da raça Beagle de origem pura, nascidos e criados para fins de investigação, certificados pelo *Colegio Oficial de Veterinários da Catalunya* – Barcelona, e adquiridos à *Isoquimen, S.L.* (Barcelona, Espanha), que constituíram os grupos controlo dos trabalhos experimentais intitulados “Apexificação e revascularização em dentes permanentes imaturos – estudo experimental *in vivo*” (45) realizado pelo Prof. Paulo Palma e “Distração osteogénica dento-ancorada – estudo experimental” (46) realizada pelo Prof. Francisco do Vale no âmbito dos seus respetivos trabalhos de doutoramentos.

Os animais tinham cerca de 14 meses de idade e pesos compreendidos entre os 15 e 18 quilogramas, apresentando todos uma identificação através de sistema de *chips* subcutâneos localizados na zona do dorso.

2.2. Manutenção e bem-estar animal

A receção, observação, manutenção, manipulação, cuidados e procedimentos cirúrgicos foram efetuados no Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real, sob supervisão do Investigador Coordenador responsável pelo Bem-estar Animal.

O estado de saúde geral dos animais, à chegada à unidade hospitalar, foi avaliado por veterinários com experiência prévia e qualificação na área de experimentação animal. Excluídas quaisquer patologias agudas ou crónicas, os animais foram mantidos num período de quarentena, com observação diária, durante um intervalo de tempo nunca inferior a duas semanas. Todos os animais permaneceram numa fase de ambientação às novas instalações, aos cuidadores e ao sistema de controlo clínico durante aproximadamente 12 semanas, antes de qualquer intervenção.

2.3. Colheita do material

Após a eutanásia, as mandíbulas foram retirados *en bloc*, após dissecação meticulosa dos tecidos moles em planos e excisados com uma serra mecanizada refrigerada. De seguida foram separadas as hemimandíbulas de cada animal, após osteotomia da sutura sinfisária e imersas em formol neutro tamponado e posteriormente transportadas para o laboratório.

Todo o material utilizado nos estudos histológicos foi processado no Laboratório de Tecidos Duros da Clínica Universitária de Medicina Dentária, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

2.4. Processamento histológico de material descalcificado

Depois de colocados em cassetes “histológicas” individuais, devidamente identificadas, as peças foram novamente colocadas em formalina tamponada a 10% a +4°C durante uma semana. Após o processo de fixação procedeu-se à descalcificação das amostras.

A descalcificação foi efetuada por imersão das amostras numa solução de Morse (ácido fórmico a 50% + citrato de sódio a 20% em partes iguais), sob agitação permanente, numa unidade de agitação (Jkika Labortechnik HS 501), durante um período mínimo de oito semanas.

Após a descalcificação das amostras procedeu-se à sua desidratação por sucessivas passagens em soluções crescentes de etanol, 50%, 70%, 90% e 100%, sob agitação permanente. Posteriormente procedeu-se à fase de diafanização em xilol (Xileno PA Panreac®), impregnação e inclusão em parafina (Paraplast® Regular), utilizando cassetes apropriadas (Kartell® Spa). Depois do processo de inclusão, as amostras foram cortadas num micrótomo (Leica RM 2155), num plano proximal, em cortes sequenciais de 7 µm de espessura.

Os cortes foram em seguida secos em estufa a 37°C, durante cerca de 16h, sendo posteriormente selecionadas e coradas com Hematoxilina e eosina (HE) ou com Tricrómio Masson (TM). Durante todo o processamento foi assegurada uma rigorosa identificação das amostras.

2.5. Processamento histológico de material não descalcificado

As amostras de material não descalcificado foram preparadas segundo o protocolo desenvolvido por Karl Donath do Instituto de Patologia da Universidade de Hamburgo, na Alemanha (Donath e Breuner, 1982; Donath, 1995).

As amostras individuais foram fixadas através de imersão numa solução de formaldeído a 10% em tampão fosfato (pH 7,4) imediatamente após a colheita e durante um período de 48 horas. Posteriormente, e após lavagem com água corrente durante 30 minutos, iniciou-se o processo de desidratação através do protocolo preconizado por Karl Donath. Numa primeira fase realizaram-se passagens numa série crescente de concentrações de etanol (60%, 80%, 96% e duas vezes a 100%),

numa unidade de agitação e infiltração (Exakt® 510), com agitação contínua e com duração de 30 dias para cada passo.

Posteriormente, procedeu-se à etapa de infiltração, utilizando-se soluções com graduações crescentes de resina de metilmetacrilato (Technovit® 7200 VLC, Kulzer) em etanol (resina/álcool: 30/70%, 50/50%, 70/30%, e duas vezes a 100% de resina).

Finamente incluíram-se as amostras na mesma resina de metilmetacrilato (Technovit® 7200 VLC, Kulzer) e foi realizada a fotopolimerização na unidade de polimerização (Exakt® 520), com sistema de arrefecimento e em moldes plásticos.

As amostras incluídas nos blocos de resina sofreram de seguida um corte, na respetiva unidade do sistema Exakt® (Exakt® 310 CP), consoante a orientação pretendida para subsequente preparação da primeira lâmina acrílica.

De cada amostra, foram obtidos três cortes sagitais que envolviam o espaço compreendido entre o terceiro e o quarto pré-molar, com a seguinte correspondência:

- I. Corte sagital vestibular;
- II. Corte sagital médio;
- III. Corte sagital lingual.

A espessura final de 50 µm foi obtida através de polimento calibrado com discos de diamante de granulometria decrescente (800, 1000, 1200, 2500 e 4000; Hermes®, Alemanha) (Figura 2.50). Todas as medições de controlo foram realizadas com micrómetro digital (Mitutoyo® 2093, Digimatic Micrometer, Japão).

Concluiu-se a fase laboratorial efetuando uma técnica de coloração com azul de Toluidina dos tecidos duros representados na lâmina final. Esta técnica, que utiliza um corante básico e cora os componentes ácidos em diversas gradações de azul, permite estabelecer uma boa distinção entre tecido osteóide e tecido ósseo mineralizado.

A observação das lâminas foi efetuada com recurso a um microscópio de luz de campo claro (Nikon® Eclipse 600, Tóquio, Japão) e estereomicroscópio (Nikon® SMZ 1500, Tóquio, Japão). Estes dispositivos têm capacidade para acoplar equipamento fotográfico convencional (Nikon® FDX 35, com sensor multiponto Nikon® U-III, Tóquio, Japão), bem como câmaras fotográficas digitais (Optronics® DEI 750D CE, Goleta, Califórnia, Estados Unidos da América e Nikon® Digital Camera DXM-1200 C, Tóquio, Japão) ligadas a computadores PC (Intel®Pentium™ III e Intel®Core™ 2 Duo Core™) com “software” para fotografia e análise de imagem (Nikon® ACT-1 C, Tóquio, Japão).

3. Resultados

3.1 Detecção de compartimentos de remodelação óssea presentes no tecido ósseo alveolar

O osso alveolar é constituído por áreas de tecido ósseo compacto (fig 3a e 3b) e por áreas de tecido ósseo esponjoso (fig 4a e 4b), sendo considerado o local onde se verifica, em condições fisiológicas, a mais alta taxa de remodelação de todo o esqueleto. Esta notável dinâmica de remodelação está traduzida pela existência de inúmeras linhas de reversão (fig 4b). Estas linhas de reversão são marcas indeléveis que definem uma nítida fronteira entre áreas de tecido ósseo formadas por diferentes gerações de osteoblastos. De igual modo, e refletindo a sua intensa capacidade de remodelação, foram também detetadas, no tecido ósseo que constitui o alvéolo dentário, particularmente na apófise alveolar, numerosas áreas de remodelação em fase ativa.

Estas áreas em remodelação apresentam no entanto características bastante distintas, considerando as regiões onde se encontram. De facto, no tecido ósseo compacto observam-se verdadeiros túneis/cones de reabsorção (fig 5-6), alguns apresentando tamanho e profundidade consideráveis. Nas trabéculas de tecido ósseo esponjoso os locais em reabsorção (fig 7a e 7b) apresentam-se como escavações superficiais e pouco profundas, muitas vezes bastante discretas, observadas junto à medula óssea.

A identificação em microscopia de luz das regiões em remodelação baseou-se maioritariamente na presença de nítidas lacunas de reabsorção com ou sem osteoclastos visíveis, ou na observação de uma camada de células osteoblásticas quase sempre acompanhadas de osteóide. Tendo em conta que, como já foi referido, os osteoclastos apresentam uma semivida bastante mais curta do que os osteoblastos e a enorme diferença de duração das fases de reabsorção e de formação que compõem o ciclo de remodelação óssea, foi possível encontrar a presença de osteoblastos em muito maior número de vezes. Foram ainda consideradas como áreas em remodelação ativa, zonas onde as lacunas de reabsorção estavam ocupadas por populações celulares que não apresentavam características típicas de células osteoclásticas ou osteoblásticas, constituindo uma etapa intermédia entre a fase de reabsorção e a de formação, normalmente designada por fase de reversão.

Uma observação mais atenta das áreas em remodelação, com recurso a maiores ampliações, permite-nos distinguir a existência de estruturas que reconhecemos/identificamos como compartimentos de reabsorção óssea.

O compartimento de remodelação óssea apresenta-se no tecido ósseo esponjoso como um espaço (fig 8-10) fechado onde se encontram as células constituintes de uma BMU (nem sempre fáceis de identificar em cortes de parafina), sendo, no entanto, de salientar a presença frequente de osteoclastos e/ou osteoblastos localizados junto à superfície óssea. Este espaço encontra-se revestido exteriormente por uma fina camada em forma de cúpula (*canopy*) formada por células

extremamente achatadas (muito semelhantes às células de revestimento ósseo) separando este compartimento da medula óssea adjacente (fig 11a e 11b). É também possível observar a continuidade desta *canopy* com as restantes células de revestimento presentes na superfície da mesma trabécula (fig 12 e 13), mas em estado de repouso e que, por este motivo, permanecem em íntima ligação com a matriz óssea.

No caso do osso alveolar, observa-se entre as trabéculas de tecido ósseo esponjoso a existência de medula óssea amarela, com nítido predomínio de células adiposas, não sendo visíveis áreas de hematopoiese. Será pertinente referir a existência de uma abundante rede capilar (fig 14-15) localizada em estreita associação de proximidade à *canopy* que reveste os compartimentos de reabsorção, sendo mesmo possível verificar a presença de inúmeros pontos de contacto entre os capilares e as células de revestimento que a compõem.

Esta rede capilar, particularmente desenvolvida junto às superfícies ósseas em remodelação, apresenta quase sempre um trajeto paralelo à *canopy*, acompanhando-a em quase toda a sua extensão. Por sua vez, nas superfícies ósseas em repouso, a densidade de capilares presente é incomparavelmente menor.

No tecido ósseo compacto que forma o alvéolo dentário, o compartimento de remodelação óssea (fig 16-18) apresenta-se também como um espaço que recobre as zonas de matriz mineralizada (que formam as paredes de um cone de reabsorção) e que estão a ser alvo de um processo de remodelação. Também aqui é possível observar uma *canopy* formando o teto do compartimento em questão, constituída por uma camada de células achatadas. A população celular que ocupa este espaço vai variando consoante a fase do ciclo de remodelação em que se encontra. Tal como referido anteriormente, a proximidade de vasos sanguíneos é sempre uma constante, mostrando em geral um percurso paralelo à *canopy*.

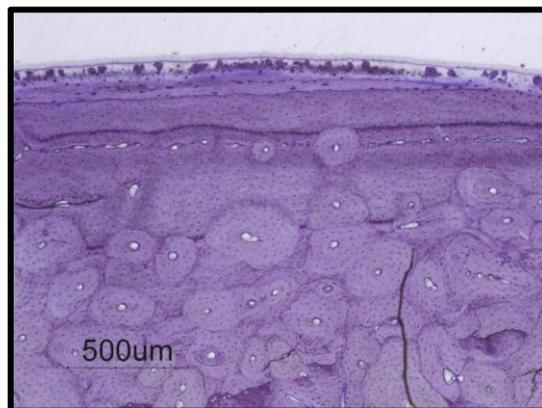


Figura 3- Imagem histológica de uma região do tecido ósseo cortical do osso alveolar onde são visíveis inúmeros sistemas de Haver e respetivos canais de Havers. Azul de Toluidina, 20x no original.

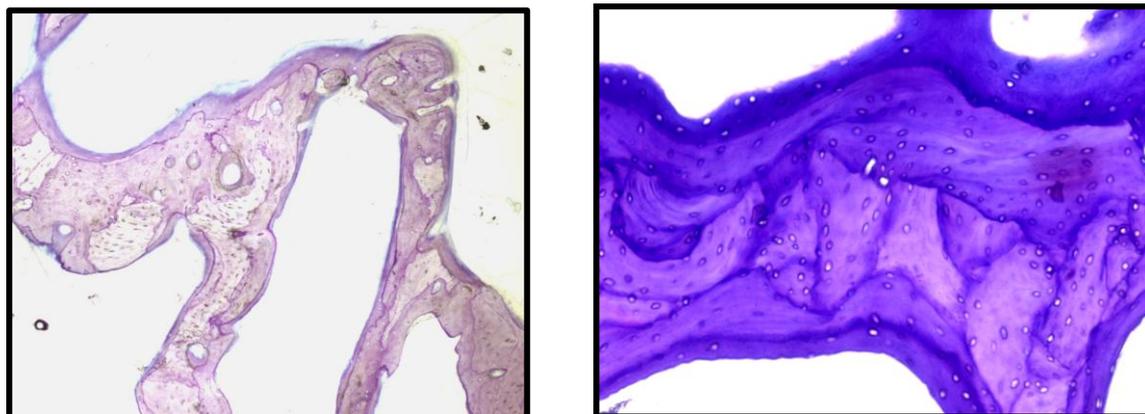


Figura 4 – A- Aspeto histológico de uma região de tecido ósseo esponjoso do osso alveolar. É ainda visível a presença de abundante osteóide na área mais periférica da trabécula bem como a presença de sinais de remodelação óssea. B- linhas de reversão traduzindo uma intensa remodelação óssea visível ao nível do tecido ósseo esponjoso (setas). Azul de Toluidina, 40x e 100x no original, respetivamente.

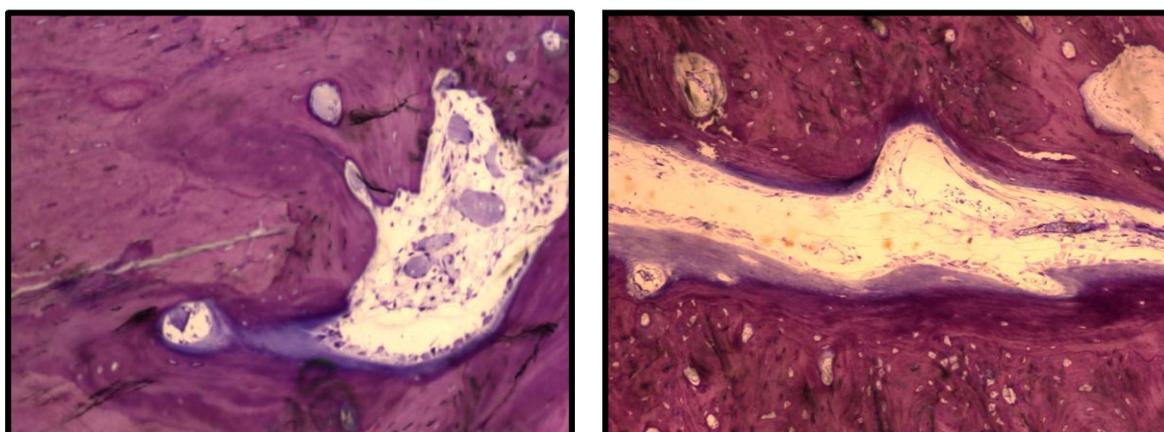


Figura 5 – A e B – Aspeto histológico de um cutting/filling cone no tecido ósseo cortical com tamanho e profundidade consideráveis, apresentando várias estruturas vasculares (V) localizadas mais ao menos centrais, uma quantidade abundante de osteóide e uma camada de osteoblastos ativos. Azul de toluidina, 40x no original.

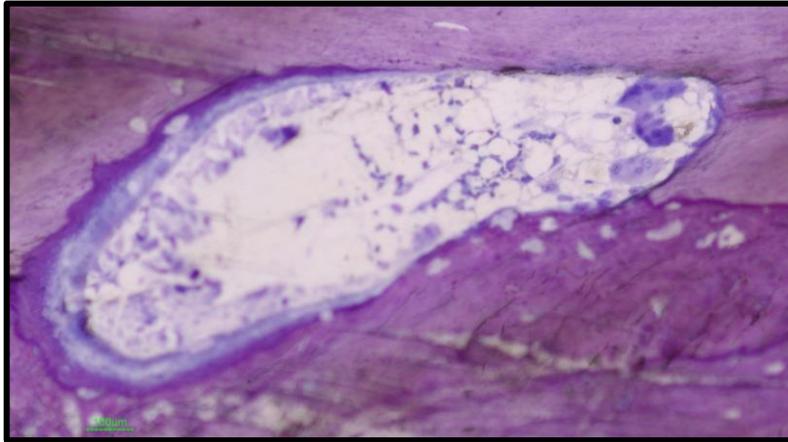


Figura 6 – Imagem histológica de um cutting/filling cone no tecido ósseo compacto. É possível identificar a presença de osteoclastos (OC) na região mais superior da imagem enquanto, na área oposta, se identifica a presença de células osteoblásticas (Ob) e de osteóide. Azul de toluidina, 400x no original.

Figura 7a e 7b (faltam)

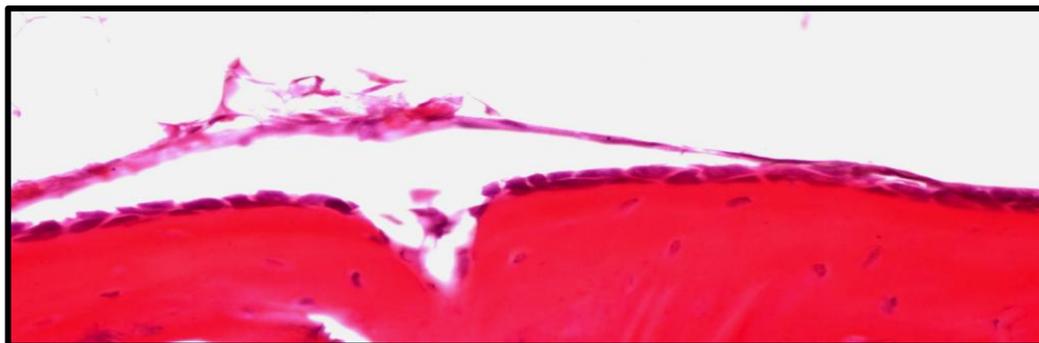


Figura 8 – Aspeto histológico do compartimento de remodelação óssea no tecido ósseo esponjoso. De facto verifica-se a criação de um espaço fechado, onde se encontram células osteoblásticas, com a formação de uma cúpula que mantém a sua continuidade com as células de revestimento ósseo. H.E 400x no original

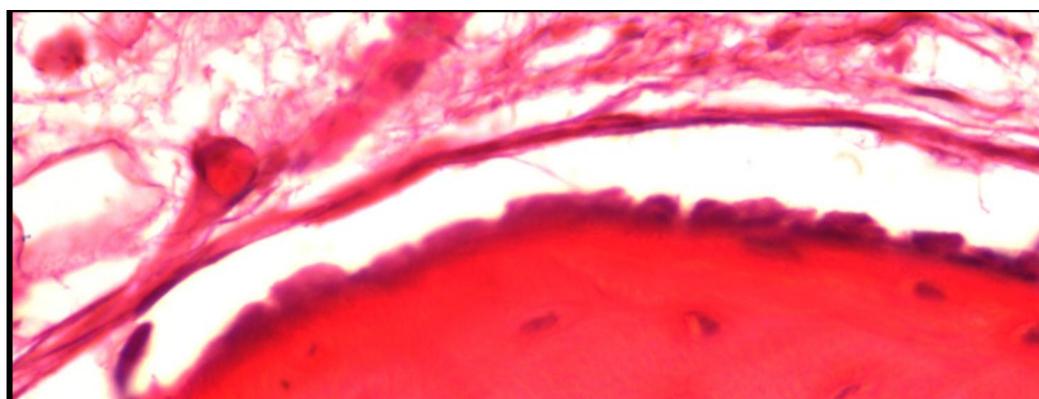


Figura 9- Aspeto em microscopia de luz de um compartimento de remodelação óssea, localizado na superfície de uma trabécula óssea, delimitado por uma camada de células achatadas, lining cells (seta), que o separam do meio externo. De notar a proximidade do capilar sanguíneo (C) às lining cells. H.E.1000x no original

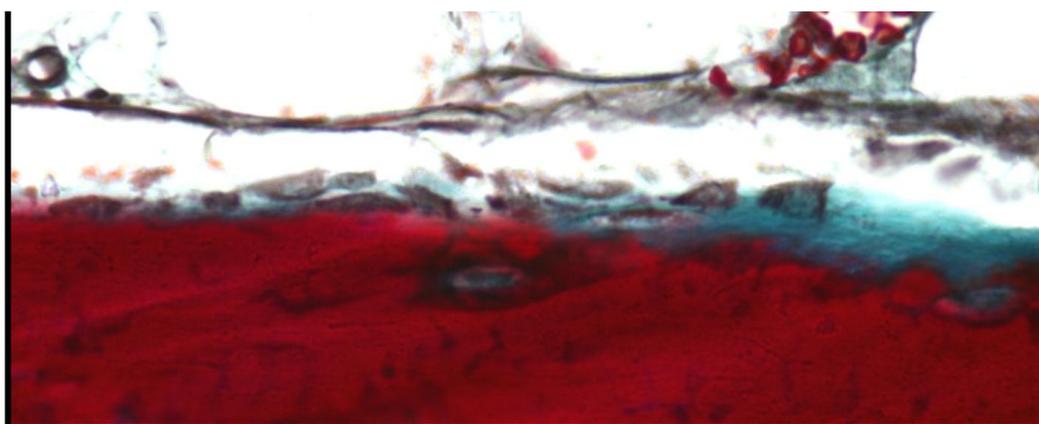


Figura 10 – Imagem histológica de um compartimento de remodelação óssea pondo em evidência a estreita relação espacial dos vasos sanguíneos com as células da canopy. De facto, parece existir uma penetração do capilar sanguíneo no BRC através das lining cells. Osteoblastos ativos e osteóide são facilmente identificáveis no interior do BRC. TM 400x no original.

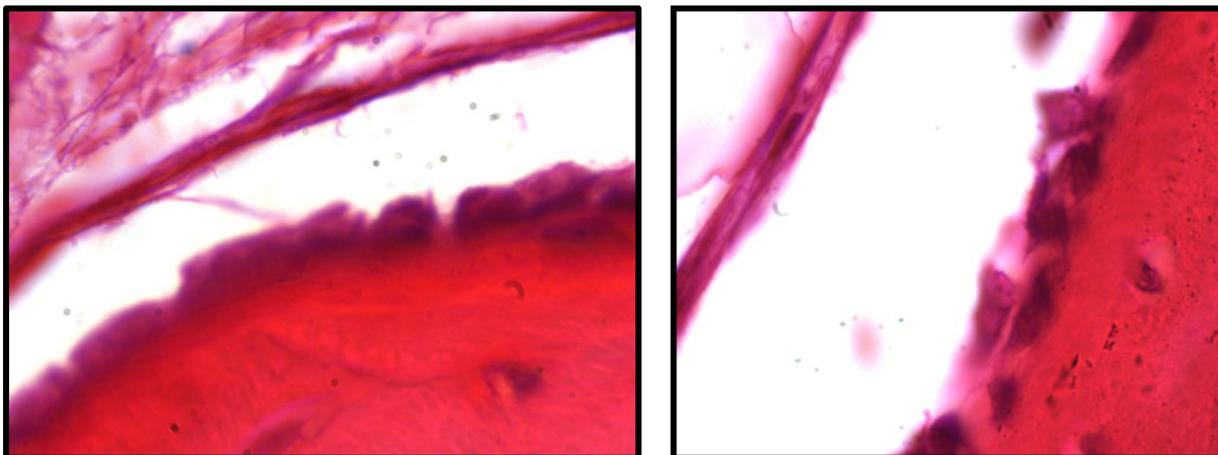


Figura 11 – Pormenor da fina camada em forma de cúpula (*canopy*) formada por células extremamente achatadas (muito semelhantes às células de revestimento ósseo) separando este compartimento da medula óssea adjacente. De notar o contacto direto dos osteoblastos com a superfície óssea. H.E. 400X e 1000 x no original, respetivamente.

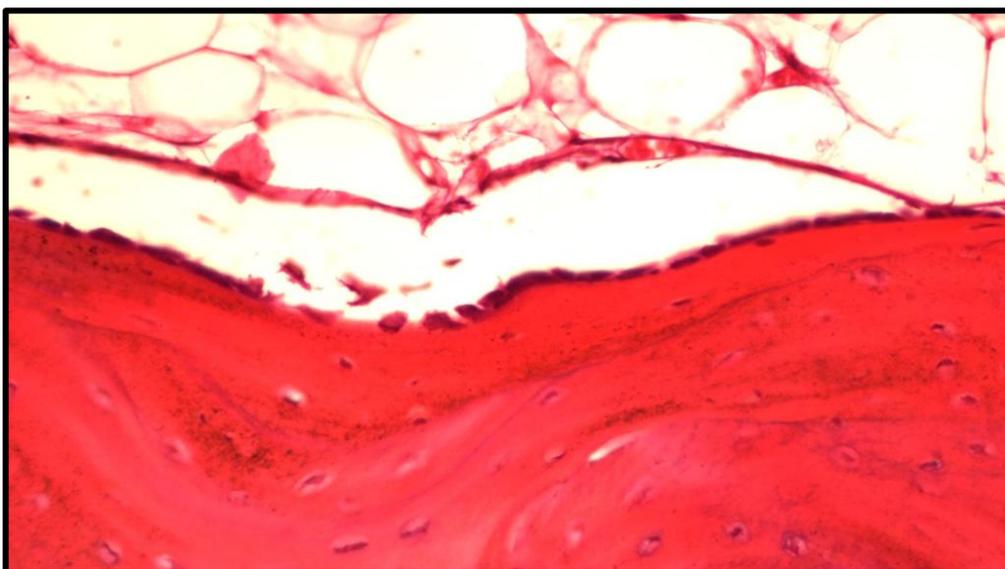


Figura 12 - Aspecto em microscopia de luz de um compartimento de remodelação óssea, localizado na superfície de uma trabécula óssea, delimitado por uma camada de células achatadas, lining cells (seta), que o separam da medula óssea adjacente. É visível ainda a existência de medula óssea amarela, com nítido predomínio de células adiposas, não sendo visíveis áreas de hematopoiese. H.E, 100x no original

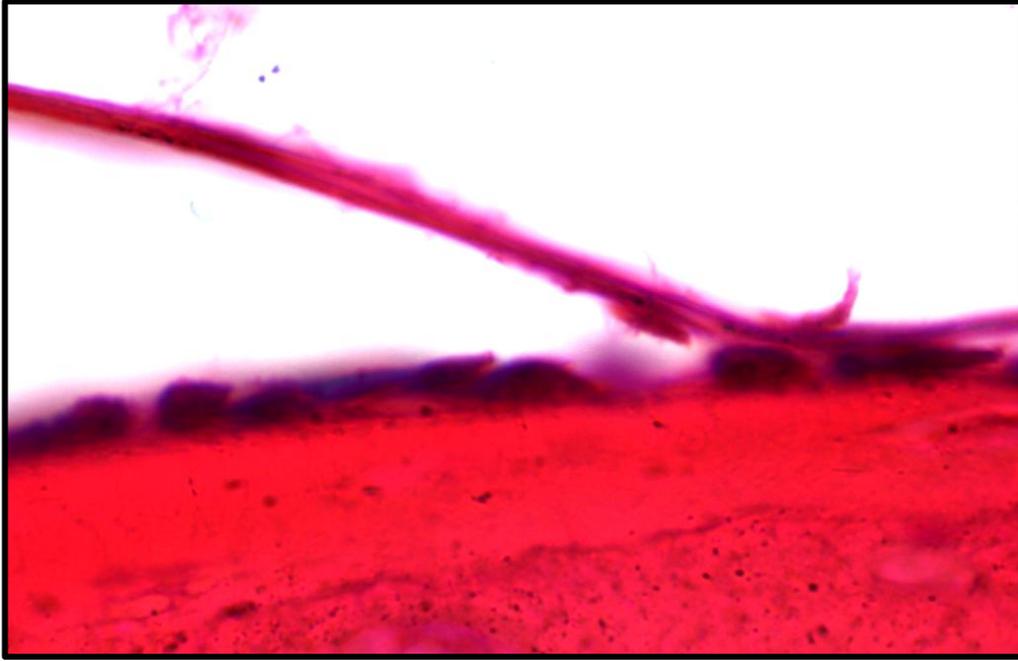
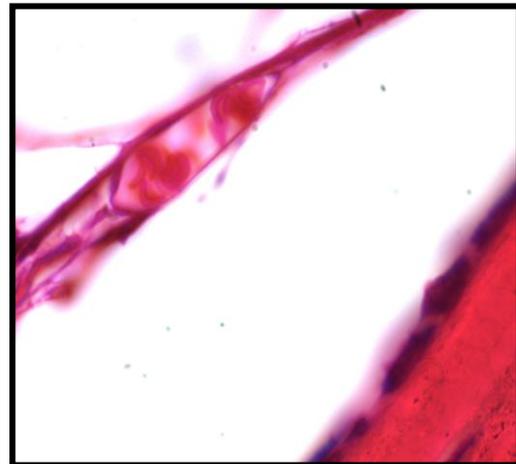
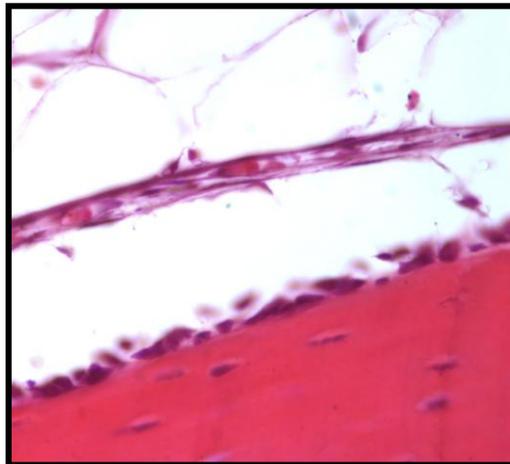


Figura 13 – Maior ampliação de uma região representada na imagem anterior. Pormenor da zona onde se inicia o levantamento das células de revestimento ósseo, nitidamente com uma fenótipo de células achatadas, formando o espaço confinado para que processos de remodelação óssea ocorram sem interferências. H.E, 400x no original



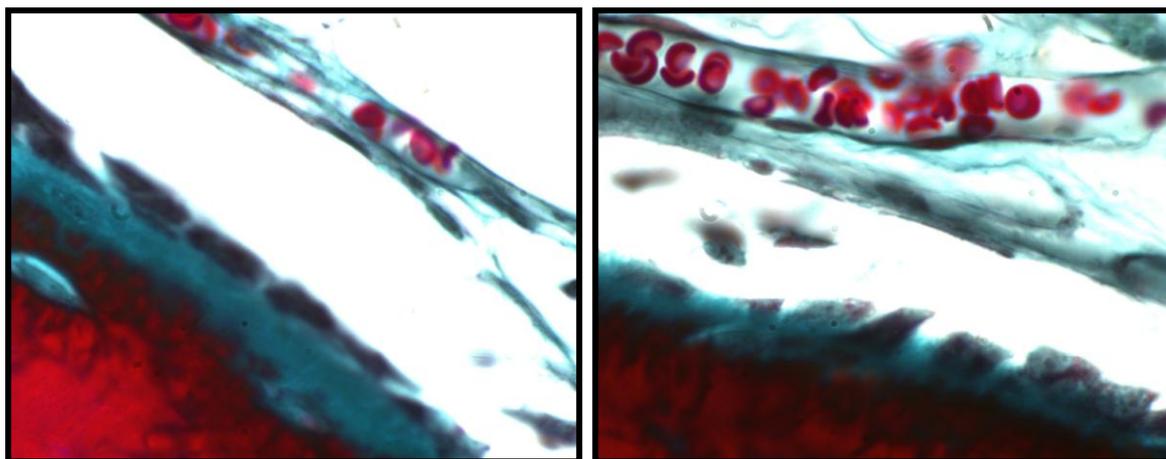


Figura 15 – Aspeto morfológico do compartimento de remodelação óssea em fase de formação. A- Observa-se o trajeto paralelo e em íntimo contacto dos capilares sanguíneos com as células da *canopy* em toda a sua extensão. É ainda visível a presença de osteoblastos e osteóide. B- Detalhe da proximidade e percurso paralelo das células da parede do capilar com as células da *canopy*. T.M, 400x, 1000x no original, respetivamente.

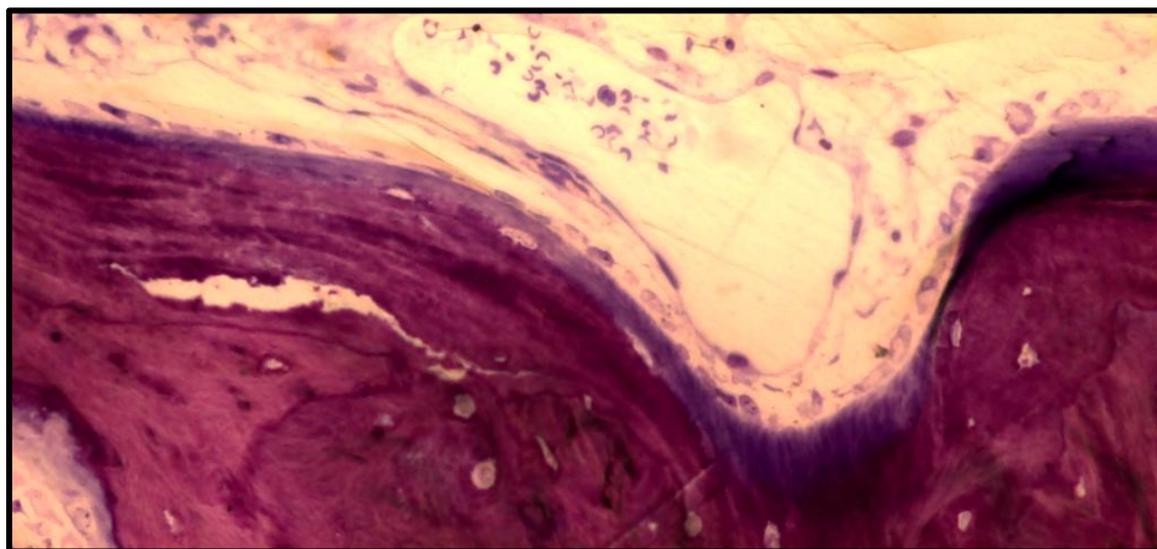


Figura 16 – Aspeto morfológico do compartimento de remodelação óssea no tecido ósseo compacto do alvéolo dentário. Observa-se a proximidade dos capilares sanguíneos com as células da *canopy* em toda a sua extensão. É notória a evolução das células osteoblásticas, de um fenótipo mais plano para células mais cúbicas, bem como da quantidade de osteóide depositada ao longo da superfície óssea em remodelação. H.E, 100x no original.

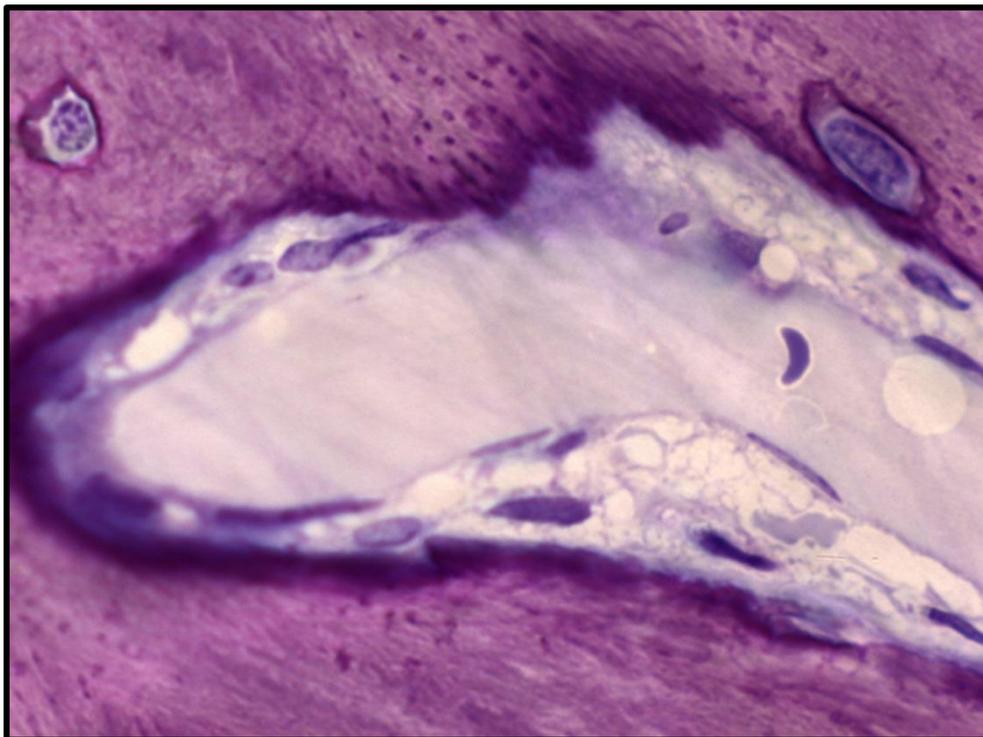


Figura 17 – Detalhe do compartimento de remodelação óssea em fase de reversão no tecido ósseo compacto. Azul de Toluidina, 400x no original.

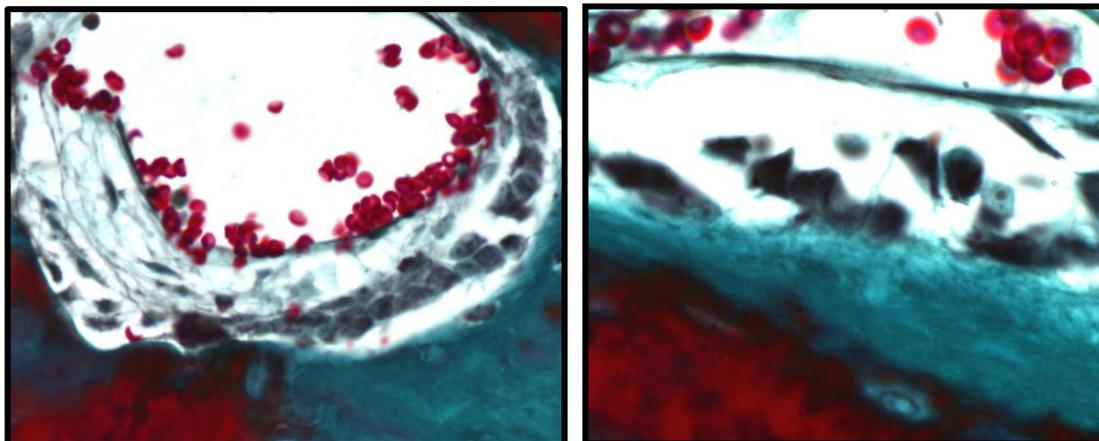


Figura 18 - Aspeto em microscopia de luz de um compartimento de remodelação óssea, localizado numa BMU no tecido ósseo cortical. A - As células achatadas junto dos glóbulos vermelhos demarcam o limite externo, a cúpula, do BRC. É também visível a presença de um osteoclasto (Oc) e de osteoblastos (Ob) bem como de uma população celular com um fenótipo não completamente definido no interior do compartimento. B – Maior ampliação de uma região da imagem anterior evidenciando a proximidade dos capilares com a parede externa da cúpula e de células com fenótipo osteoblástico em contacto direto com o osteóide. TM, 100x e 400x no original, respetivamente.

3.2 Identificação de diferentes etapas do ciclo de remodelação óssea

Para além da deteção de numerosos compartimentos de remodelação no tecido ósseo que compõe o alvéolo dentário, foi também possível identificar as diferentes etapas que constituem o ciclo de remodelação óssea, tendo por base as características morfológicas das células localizadas junto à matriz óssea em remodelação.

A figura 19a mostra um BRC numa fase de reabsorção sendo possível reconhecer, na superfície da matriz óssea que forma a parede de um cone de reabsorção, a existência de várias lacunas de *Howship*, bem como a presença de vários osteoclastos. É também perceptível a existência de outras células, incluindo as células de revestimento da *canopy* e a proximidade de um vaso sanguíneo. Na figura 19b observa-se, com mais detalhe, uma confluência de vários osteoclastos, formando células gigantes multinucleadas, localizadas em cavidades por elas escavadas na superfície da matriz óssea. É ainda possível identificar uma nítida interface, entre o osteoclasto e a matriz mineralizada, demarcando o local onde irá surgir uma linha cimentante. É possível verificar também a existência de várias zonas adjacentes à matriz mineralizada, contendo um material de aspeto fibrilar que deverá corresponder a matriz orgânica (maioritariamente colagénio) ainda não completamente digerida.

Nas figuras 20 e 21 é possível verificar em várias áreas de tecido ósseo compacto, a diversidade celular e riqueza vascular existente num compartimento de remodelação em fase de formação óssea. Com efeito, para além de uma zona de matriz osteóide, é visível uma extensa camada de células osteoblásticas, uma complexa profusão celular e uma intrincada rede capilar que no seu conjunto formam uma BMU.

Também as figuras 22-24 mostram, na superfície de trabéculas de tecido ósseo esponjoso, a existência áreas de remodelação em fase de formação óssea caracterizadas pela presença de células osteoblásticas, adjacentes à matriz osteóide por elas elaborada, recobertas por um compartimento de remodelação. Neste compartimento, é possível observar as células de revestimento que formam a *canopy*, para além de outras, de difícil identificação em microscopia de luz. É ainda possível verificar a proximidade de capilares sanguíneos, mostrando um trajeto paralelo à *canopy*.

Ainda que o processo de reabsorção e de formação óssea sejam considerados fenómenos intimamente ligados, visto que o mecanismo de reabsorção osteoclástica estimula a atividade reparadora osteoblástica e que os osteoblastos, ou as suas células precursoras sejam recrutados exatamente para os locais onde previamente se verificou um processo de reabsorção, estes dois tipos de células raramente estão presentes em simultâneo na mesma superfície óssea. De facto, verifica-se um intervalo de tempo de várias semanas entre o desaparecimento dos osteoclastos e o aparecimento de osteoblastos no mesmo local. Este período intermediário, ainda mal esclarecido, é geralmente classificado como uma fase de reversão e caracterizado pela presença de uma diferente

população celular. Assim, num compartimento de remodelação óssea em fase de reversão, podemos identificar numerosas células alongadas com núcleo achatado, de certo modo semelhantes às células de revestimento, porém apresentando-se mais volumosas e em maior número. As figuras 25-27 documentam bem o que acabámos de descrever pondo em evidência vários compartimentos de remodelação óssea em fase de reversão, muito bem definidos, contendo no seu interior inúmeras células alongadas que, no entanto, se diferenciam das células de revestimento da *canopy*. A proximidade entre estas células e as células endoteliais dos vasos sanguíneos que se situam em seu redor é notória (figuras 26 e 27). De referir ainda que estas células apresentam-se com frequência bem mais achatadas quando localizadas próximo de células osteoclásticas, apresentando um aspeto mais cubóide quando perto de superfícies em fase de formação. Parecem, pois, formar uma ponte celular de ligação entre osteoclastos e osteoblastos.

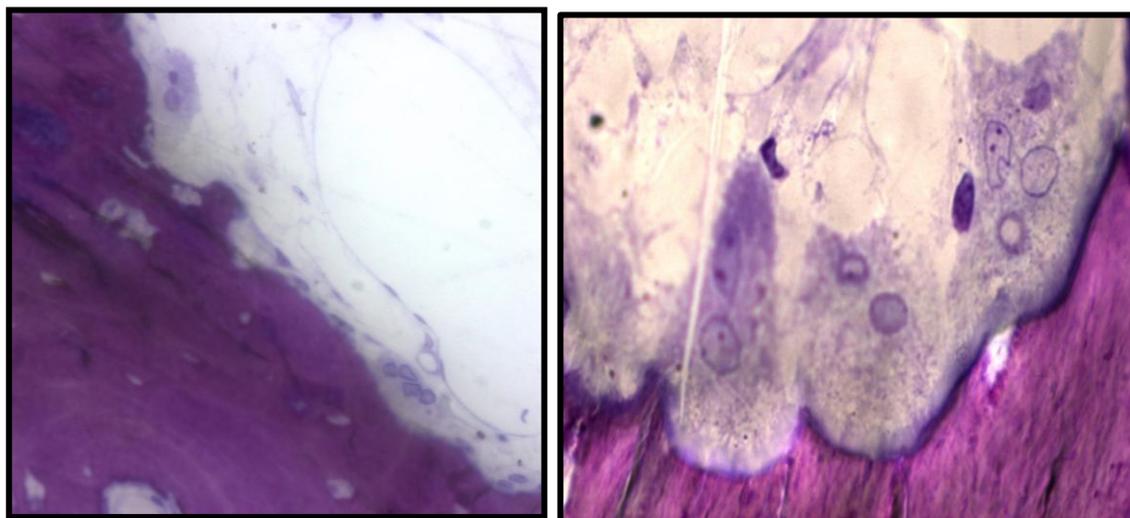


Figura 19 – Aspeto histológico de um compartimento de remodelação em fase de reabsorção. A- É perceptível na superfície da matriz óssea que forma a parede de um cone de reabsorção, a existência de várias lacunas de *Howship*, bem como a presença de vários osteoclastos (OC). É também evidente a existência de outras células, incluindo as células de revestimento da *canopy* e a proximidade de um vaso sanguíneo. B- Detalhe da confluência de vários osteoclastos, formando células gigantes multinucleadas, localizadas em lacunas de *Howship*. É ainda possível identificar uma nítida interface, entre o osteoclasto e a matriz mineralizada, demarcando o local onde irá surgir uma linha cimentante. Azul de Toluidina, 100x e 1000x no original, respetivamente.

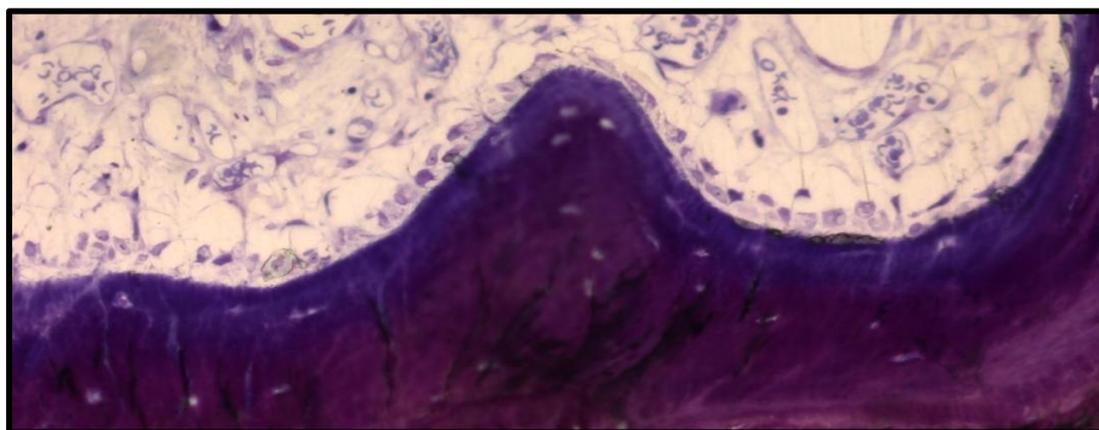


Figura 20 – Aspeto histológico de um compartimento de remodelação em fase de formação óssea. De notar a enorme diversidade celular e uma intrincada rede capilar que no seu conjunto formam uma BMU. Azul de Toluidina, 20x no original

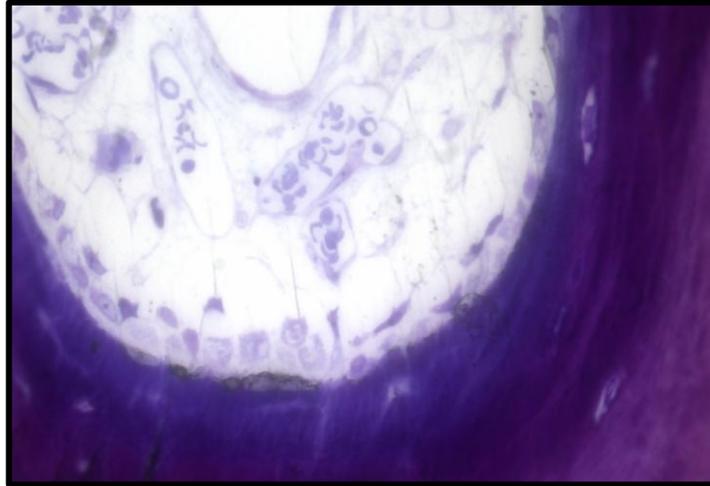


Figura 21 – Maior ampliação de uma região da imagem anterior mostrando em detalhe a enorme diversidade celular e uma intrincada rede capilar que no seu conjunto formam uma BMU. Além disso para além de uma zona de matriz osteóide, é visível uma extensa camada de células osteoblásticas. Azul de Toluidina, 100x no original

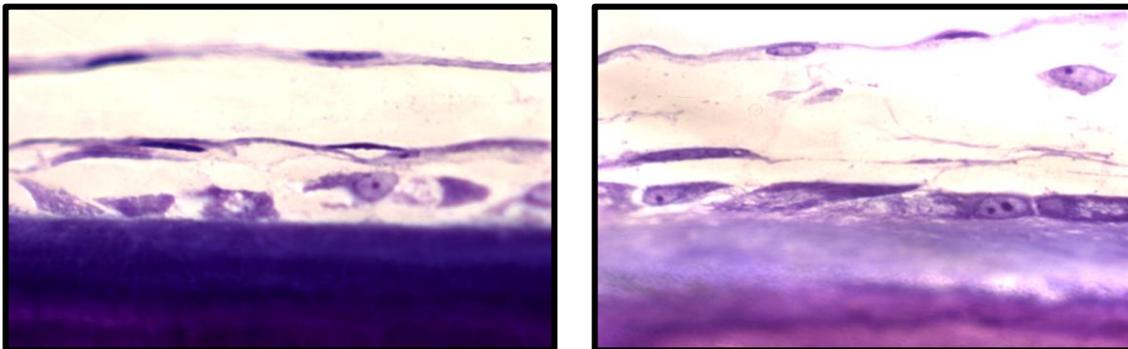


Figura 22 – Pormenor histológico do compartimento de remodelação óssea na superfície de trabéculas de tecido ósseo esponjoso. Ambas as imagens demonstram áreas de remodelação em fase de formação óssea caracterizadas pela presença de células osteoblásticas, adjacentes à matriz osteóide por elas elaborada, recobertas por um compartimento de remodelação. Azul de Toluidina, 1000x no original

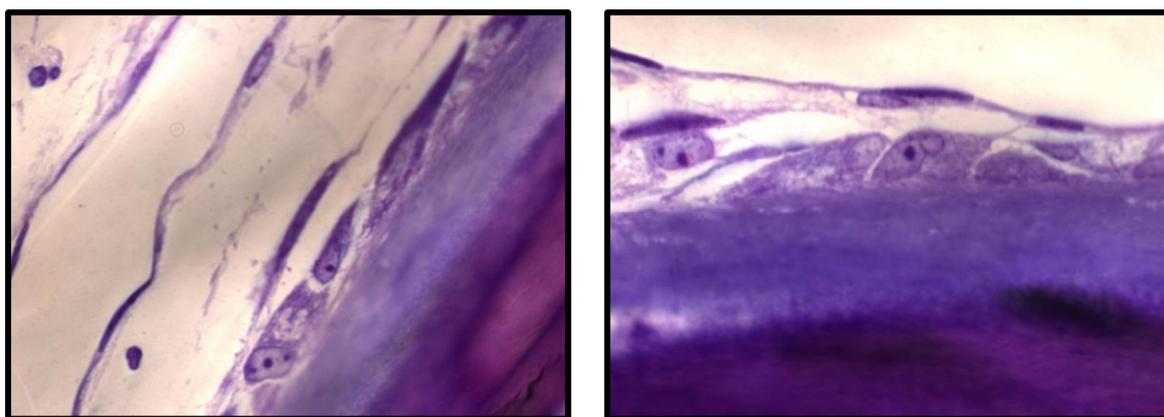


Figura 23 – A- Proximidade do vaso sanguíneo (V) com o compartimento de remodelação óssea em fase de formação. B- Pormenor do BRC – Osteoblastos em contacto direto com o osteóide por eles produzido e, localizada acima dos osteoblastos, são visíveis células achatadas pertencentes à cúpula do BRC. Azul de Toluidina, 400x e 1000x no original, respetivamente.

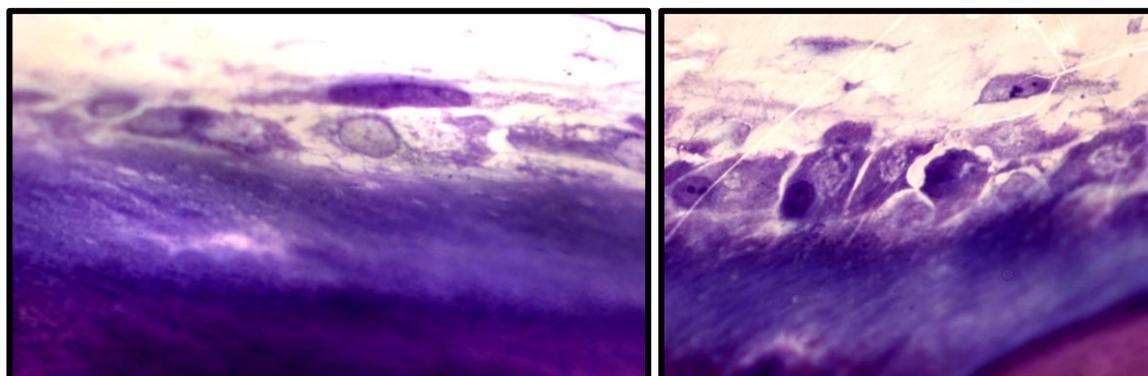


Figura 24 – Detalhe de um compartimento em remodelação óssea na fase de formação. A- Pormenor das células de revestimento que formam a *canopy* em íntimo contacto com os osteoblastos. B – No compartimento é possível identificar os osteoblastos para além de outras, de difícil identificação em microscopia de luz. Azul de Toluidina, 1000x no original

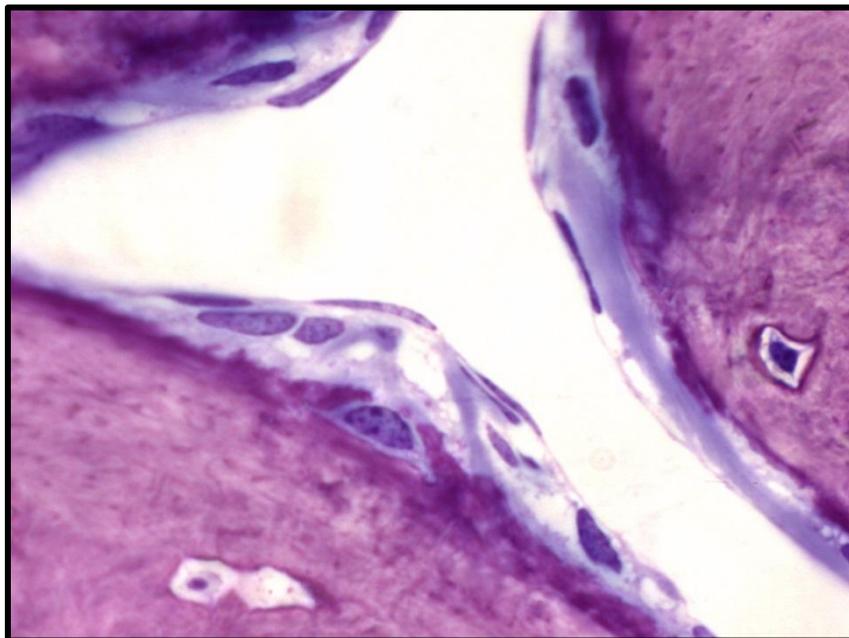


Figura 25 – Aspeto histológico de compartimentos de remodelação óssea em fase de reversão, muito bem definidos, contendo no seu interior inúmeras células alongadas que, no entanto, se diferenciam perfeitamente das células de revestimento da *canopy*. De notar também a integração do osteócito na matriz óssea. Azul de Toluidina, 400x no original

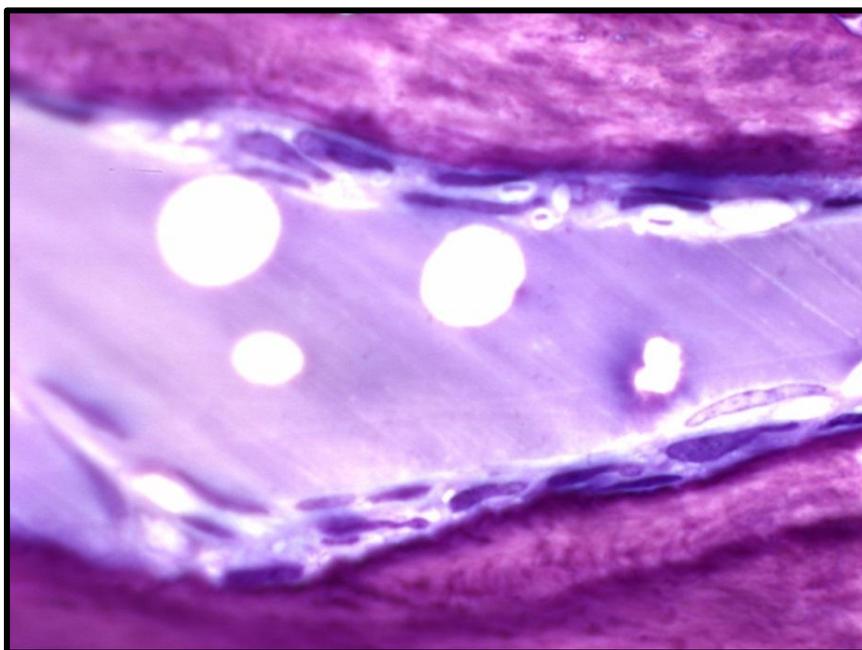


Figura 26 – Pormenor de compartimentos de remodelação óssea em fase de reversão. No interior do compartimento são visíveis células achatadas, em proximidade quer com a matriz óssea quer com as células da *canopy*. A proximidade entre estas células e as células endoteliais do vaso sanguíneo que se situam na região central é notória. Azul de Toluidina, 400x no original

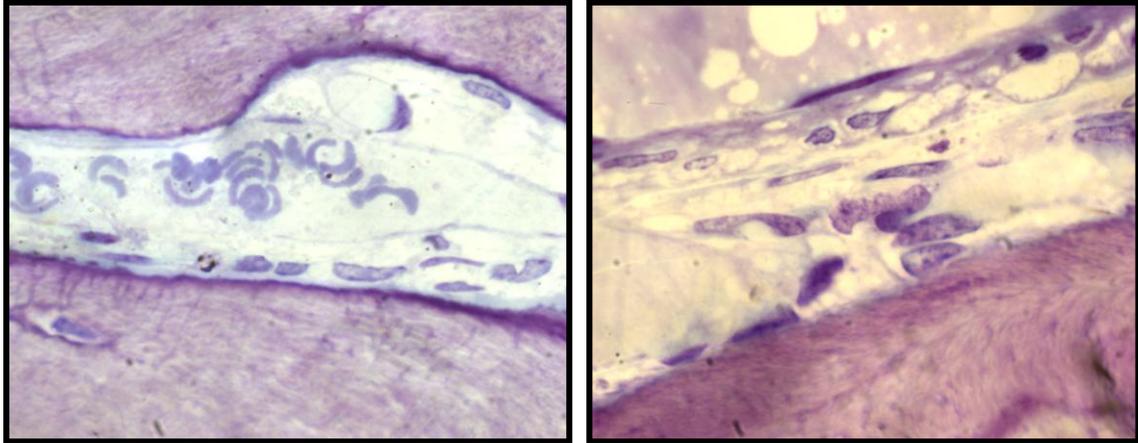


Figura 27 – Compartimento de remodelação óssea em fase de reversão. A- Presença de numerosas células alongadas com núcleo achatado. Observa-se, ainda, o trajeto paralelo do vaso sanguíneo em relação às células da *canopy*. B- É possível identificar numerosas células alongadas com núcleo achatado, de certo modo semelhantes às células de revestimento, porém apresentando-se mais volumosas e em maior número no interior do compartimento. Azul de Toluidina, 200x, 400x no original, respectivamente.

3.3 Detecção de compartimentos de remodelação presentes na dentina e cimento

De modo semelhante ao que observámos nas regiões de tecido ósseo em remodelação, também nas zonas de remodelação de cimento e dentina, foi possível identificar uma estrutura em tudo idêntica ao compartimento de remodelação óssea. Porém, as áreas de reabsorção da dentina, adjacentes ao cimento, são reparadas apenas com formação de novo cimento, e não de dentina. Uma vez que a constituição histológica do cimento é muito idêntica à do tecido ósseo, seria previsível que o seu processo de remodelação apresentasse também características muito semelhantes. Com efeito, para além de zonas de reabsorção do cimento que podem atingir a dentina, pudemos identificar a existência de compartimentos de remodelação, revestidos por uma *canopy* e em estreita proximidade de vasos sanguíneos.

Na figura 28 é possível observar uma zona de reabsorção de cimento que atinge a dentina, formando um compartimento revestido por uma camada de células achatadas que consideramos como uma *canopy*.

Uma fase correspondente à fase de formação óssea foi também reconhecida no processo de remodelação do cimento. Com efeito, as figuras 29 e 30 põem em evidência a existência de um compartimento de remodelação junto a uma área de cimento recoberta por cementóide e por cementoblastos. A figura 30 permite observar com mais pormenor as células da *canopy*, o espaço ocupado pelo compartimento e uma camada de cementoblastos (muito semelhantes a osteoblastos), adjacente a uma zona de cimento não mineralizado. É também possível observar uma faixa de matriz mineralizada de cimento e uma zona de dentina com túbulos dentinários.

A figura 31 mostra também uma área de reabsorção na dentina e no cimento, ocupada por um espaço onde são visíveis diferentes tipos de células, bem como um vaso sanguíneo apresentando no seu conjunto um processo muito semelhante ao que se verifica nos cones de reabsorção, característicos do tecido ósseo compacto. Neste corte, é no entanto difícil distinguir as células de revestimento da *canopy* das células endoteliais do vaso sanguíneo. A população celular adjacente à superfície da dentina e do cimento, sem possibilidades de métodos imunocitoquímicos, é de difícil caracterização. Todavia, por comparação com o tecido ósseo, pode ser classificada como um compartimento de remodelação em fase de reversão.

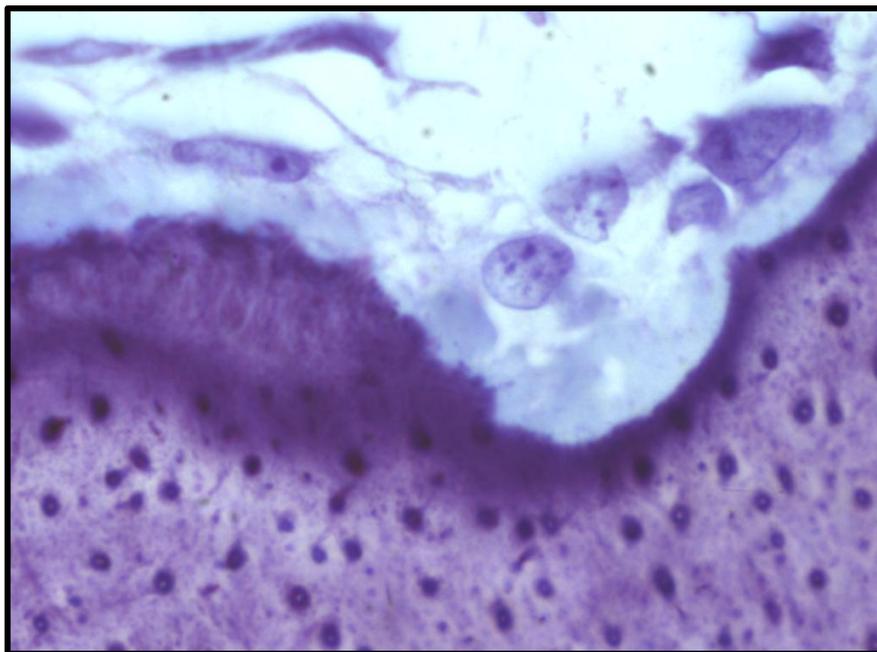


Figura 28 – Compartimento de remodelação óssea em fase de reabsorção localizado na superfície radicular externa. É notória a zona de reabsorção de cimento que atinge já a dentina, formando um compartimento revestido por uma camada de células achatadas que consideramos como uma *canopy*. Azul de Toluidina, 400x no original

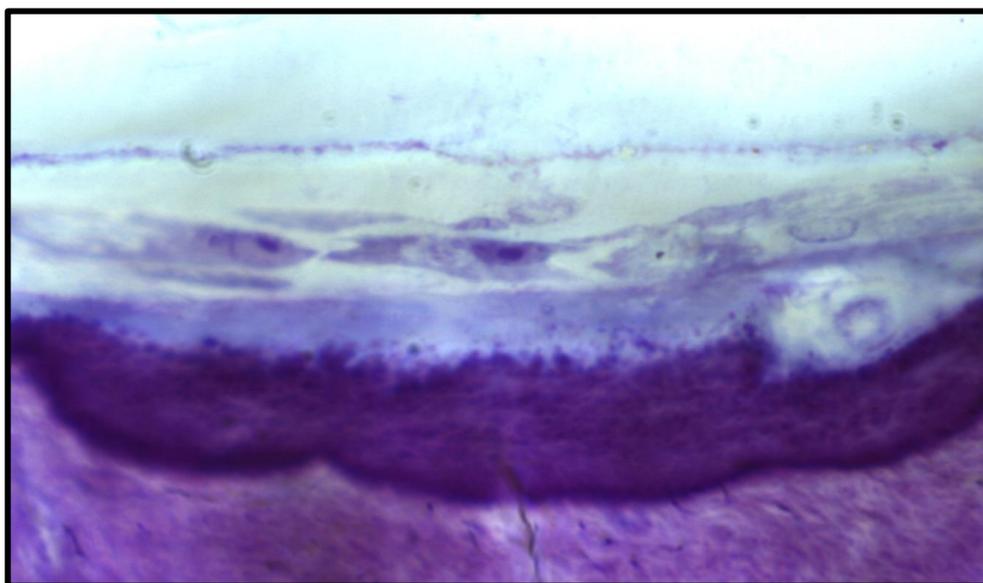


Figura 29 – Aspeto histológico de um compartimento de remodelação óssea em fase de formação localizado na superfície radicular externa. É facilmente identificável a presença de uma área de cimento recoberta por cementóide e por cementoblastos limitados por uma fina linha que corresponderá às células da *canopy*. Azul de Toluidina, 1000x no original

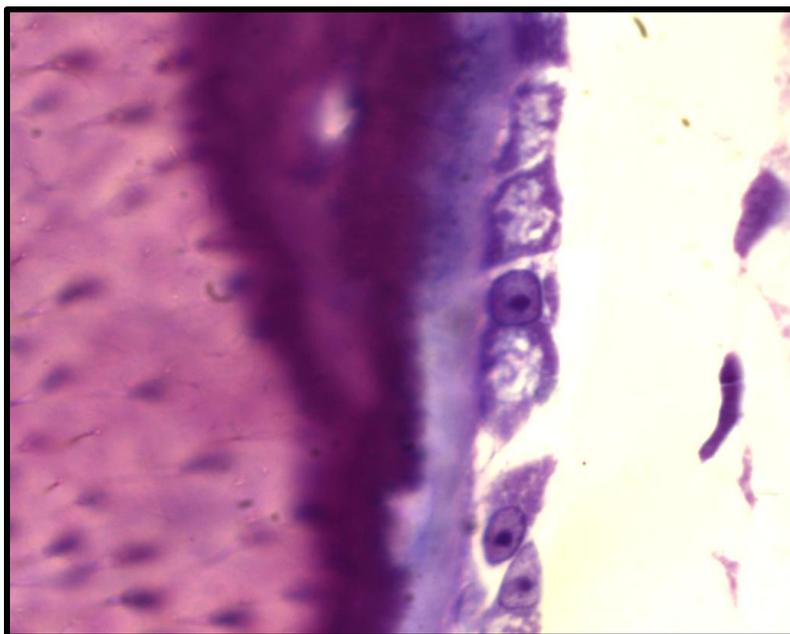


Figura 30 – Detalhe de uma área de cimento recoberta por uma zona de cimento não mineralizado e por cementoblastos limitados externamente pelas células da *canopy*. É também possível observar uma faixa de matriz mineralizada de cimento adjacente a uma zona de dentina com túbulos dentinários. Azul de Toluidina, 1000x no original

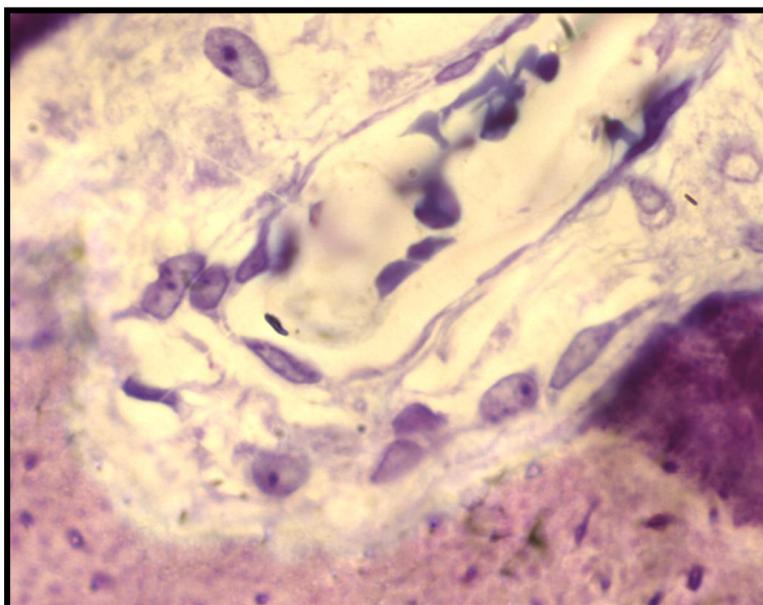


Figura 31 – Compartimento de remodelação em fase de reversão. É possível observar uma área de reabsorção na dentina e no cimento, ocupada por um espaço onde são visíveis diferentes tipos celulares, bem como um vaso sanguíneo. No entanto é difícil distinguir as células de revestimento da *canopy* das células endoteliais do vaso sanguíneo. Azul de Toluidina, 1000x no original

4. Discussão

O envolvimento direto das estruturas vasculares no desencadear dos fenómenos de reabsorção óssea e na sua manutenção não está ainda completamente esclarecido mas são cada vez mais as evidências que apontam neste sentido.

Uma ativação dos mecanismos de angiogenese e a aproximação e/ou adesão de capilares sanguíneos às células de revestimento de uma região da superfície óssea que vai necessitar de um processo de remodelação parece constituir um dos primeiros sinais de ativação de um ciclo de remodelação. Este facto, que assinala a conversão de uma superfície óssea de um estado quiescente para um estado ativo de remodelação, é acompanhado por alterações na morfologia e comportamento das suas células de revestimento. Assim, verifica-se uma retração e um destacamento destas células, afastando-se da respetiva matriz óssea mineralizada, ao mesmo tempo que se processa a digestão da camada de endóstio subjacente, dando início à formação de uma *canopy* e ao desenvolvimento de um compartimento de reabsorção. As células que constituem a *canopy* são, confirmadamente, células da linha osteoblástica que expressam a maioria dos marcadores característicos do fenótipo osteoblástico, mas que se apresentam num estadio muito precoce de diferenciação, mostrando inclusive um índice de proliferação superior a 10 %.

Estes processos são acompanhados por uma forte migração e recrutamento de células pré-osteoclásticas dirigindo-se exatamente para a região em causa e por um reforço dos mecanismos de osteoclastogénese. A superfície da matriz óssea desnudada e exposta atrai fortemente as células precursoras dos osteoclastos contribuindo ainda para a sua maturação e ativação. Com efeito, só em contacto direto com a matriz óssea mineralizada é que os pré-osteoclastos se fundem formando células multinucleadas capazes de uma verdadeira atividade de reabsorção. As células da linha osteoclástica podem alcançar o compartimento de reabsorção por diapedese através das células da *canopy* ou migrarem através de zonas livres resultantes da retração das células da *canopy*. No caso das trabéculas do tecido ósseo esponjoso, a proximidade da medula óssea deixa antever uma grande facilidade de acesso das células precursoras dos osteoclastos e osteoblastos ao BRC. Porém no tecido ósseo compacto serão os capilares sanguíneos, presentes nos canais de Havers, as únicas vias capazes de conduzir estas células para as áreas que delas necessitam.

Os pré-osteoclastos vão encontrar no BRC um ambiente ideal e uma concentração adequada de factores osteoclastogénicos, sendo, muito provavelmente, as células de revestimento da *canopy* (porque constituem células da linha osteoblástica) as principais responsáveis pela síntese de M-CSF e de RANKL. A presença destas citoquinas no interior do BRC constitui um dos mais importantes fatores responsáveis pela diferenciação e ativação osteoclástica.

Porém, como já foi referido, os osteócitos não estão alheios a este processo. De facto, os osteócitos comprometidos ou danificados podem estimular, ainda que de forma indireta, a produção

de RANKL nas células de revestimento (através de *gap junctions*), ou mesmo nas células do estroma presentes em territórios adjacentes, como é o caso da medula óssea no tecido ósseo esponjoso.

Por sua vez, os osteócitos em apoptose podem, eles próprios, também ser capazes de sintetizar RANKL tendo até sido considerados como a maior fonte de RANKL no tecido ósseo sempre que se inicia um processo de remodelação. Neste contexto, importa referir que nas zonas que requerem uma remodelação, ou reparação, foi detetado um aumento significativo na expressão de VEGFs pelos osteócitos, influenciando, deste modo, os mecanismos de angiogénese.

Estas duas estruturas (vasos sanguíneos e *canopies*) parecem realmente funcionar em conjunto, constituindo uma importante unidade de apoio, nutrição e abastecimento celular e metabólico ao compartimento de remodelação óssea.

A grande densidade de capilares observada junto às *canopies* seguindo um percurso paralelo constitui uma ampla interface entre estas duas entidades. Esta situação permite uma grande superfície de contacto entre capilares e *canopies*, constituindo certamente um local privilegiado de comunicação entre estruturas vasculares e compartimentos de remodelação. Na formação e desenvolvimento dos cones de reabsorção óssea, observados no tecido ósseo compacto, o vaso sanguíneo cresce à mesma velocidade que a BMU avança (25 μm por dia), situando-se usualmente a não mais de 100 μm de distância quer da zona de reabsorção, quer da zona de formação óssea.

De facto, o BRC tem sido frequentemente considerado como uma estrutura vascular, sendo várias as representações esquemáticas em que se propõe a comunicação direta de um capilar sanguíneo com o espaço do compartimento, localizada a nível da *canopy*. Todavia, um estudo realizado com recurso a microscopia electrónica REF revelou que capilares e células de revestimento da *canopy* são estruturas fisicamente independentes, mostrando, no entanto, algumas regiões onde se verifica uma muito estreita proximidade. Foi também demonstrado nesse estudo que os capilares adjacentes às zonas de remodelação óssea, mesmo no caso de trabéculas ósseas do tecido ósseo esponjoso, são constituídos por uma camada contínua de células endoteliais, não podendo, por isso, ser considerados como sinusóides. Este trabalho revelou também que a parede dos capilares em questão apresentava, em redor da camada de células endoteliais, uma bainha de células consideradas como pericitos, que durante as fases de remodelação se encontram expostos a uma alta concentração de fatores de crescimento provenientes, quer do compartimento de reabsorção, quer sintetizados pelas células endoteliais. Estas células apresentam inúmeras capacidades de diferenciação, mostrando nomeadamente um forte potencial osteogénico. Existem fortes evidências que os pericitos prestam uma forte contribuição nas respostas osteogénicas, relacionadas com estimulações eléctricas, manipulações ortodónticas, reparações da sutura palatina e processos de ossificação em locais heterotópicos. Esta região perivascular pode pois representar um importante reservatório de células osteoprogenitoras que podem facilmente ser recrutadas para a *canopy* ou para o interior do

compartimento e, conseqüentemente, colonizar as superfícies ósseas. Este facto poder-se-á verificar sempre que se observe uma estreita proximidade entre capilares e *canopies*.

Foi também detetado um alto índice de proliferação celular, acompanhando as regiões adjacente às áreas de remodelação, ou seja, nos locais de convergência entre capilares e compartimentos. Estas regiões podem, pois, ser consideradas como verdadeiras plataformas angio/osteogénicas. De facto, uma vez iniciada a formação do compartimento de remodelação, as células da *canopy* parecem encontrar-se numa posição ideal no que respeita à exposição de fatores mitogénicos e osteogénicos provenientes, quer do interior do BRC, quer das regiões adjacentes. Por sua vez, será durante a fase de reversão, ou seja, durante o tempo que medeia entre o final do processo de reabsorção e o início do processo de formação óssea que o gradiente de citocinas, fatores de crescimento e de diferenciação deverá atingir a sua concentração máxima no interior do BCR. Este facto irá facilitar o recrutamento de células osteoprogenitoras para o local deixado vazio pelas células osteoclásticas, promovendo ao mesmo tempo a sua proliferação e permitindo a sua maturação no sentido de osteoblastos maduros. Parece ser determinante também a obtenção de uma alta densidade celular a nível das superfícies reabsorvidas, de modo a atingir uma “massa crítica” de células osteoblásticas capaz de dar início à síntese de matriz óssea. Neste âmbito foi também reconhecido que as células da *canopy* constituem um reservatório de progenitores osteoblásticos prontos a ser recrutados para as superfícies em reversão. Deste modo, foi demonstrada a existência de um gradiente entre as células da *canopy* e as superfícies ósseas em reparação, caracterizado por um aumento no seu estadio de diferenciação e um decréscimo nos índices de proliferação. Este recrutamento é apontado como um pré-requisito necessário ao início do processo de formação óssea.

Pode admitir-se, pois, que o desaparecimento ou perda da *canopy* numa fase de reversão, para além de perturbar drasticamente o equilíbrio dentro do compartimento, irá comprometer definitivamente o recrutamento das células pré-osteoblásticas e, deste modo, parar o ciclo de remodelação.

Nas situações em que se observa uma paragem no processo de *coupling*, a fase de reversão apresenta uma baixa densidade de células, quando comparada com uma fase de reversão activa, que por sua vez se mostram muito mais achatadas, ou seja, muito semelhantes às células de revestimento das superfícies em repouso.

As células de revestimento do compartimento de remodelação óssea assumem assim uma importância crítica na reconstrução das áreas reabsorvidas.

III. Resumo

A remodelação óssea representa 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.

O ciclo da remodelação óssea 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**). 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.

Pode, pois, afirmar-se que a reabsorção e a formação óssea 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.

De facto, considerando que na sequência de remodelação, a fase de formação (da responsabilidade das células osteoblásticas) é sempre precedida por uma fase de reabsorção (da responsabilidade osteoclástica), continua por esclarecer o modo como se procederá esta transição ou reversão. Será que os osteoclastos podem desencadear a diferenciação dos osteoblastos, representando assim os osteoclastos um factor essencial para a diferenciação osteoblástica ?

Para esta questão, existem diversas possibilidades de resposta, nomeadamente: a) a existência de factores de crescimento sintetizados pelos osteoclastos, exercendo um efeito parácrino nos osteoblastos; b) a acção de factores de crescimento e citoquinas com efeito osteogénico contidos na matriz óssea e libertados aquando do processo de reabsorção osteoclástica e c) um contacto directo célula-célula entre osteoclastos e osteoblastos.

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. Como é sobejamente conhecido com o avançar da idade e, sobretudo, em situações de osteoporose obtém-se um balanço final (entre formação e reabsorção) negativo.

De facto, 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, associada a processos de reabsorção osteoclástica.

Convém referir, como nota final, que toda a actividade celular do ciclo de remodelação óssea será *protegida* por uma estrutura desenvolvida para o efeito.

Hauge et al. (2001) foram os primeiros investigadores a apontar para a existência de um compartimento de remodelação óssea, como uma entidade real, ainda que transitória, demonstrando histologicamente a sua existência.

Estes investigadores verificaram também que as células constituintes da sua *canopy* expressavam a maioria dos marcadores característicos do fenótipo osteoblástico (fosfatase alcalina, osteocalcina e osteonectina), sendo muito provavelmente *lining cells* ósseas. Este estudo veio também levantar a hipótese de este compartimento poder constituir uma estrutura vascular especializada.

Mais tarde, vários outros trabalhos [7][14] demonstraram uma estreita associação dos capilares à *canopy*, concluindo também que a integridade do *BRC* é um pré-requisito essencial para a remodelação e formação óssea.

O microambiente medular em redor do *BRC* constitui, logicamente, uma das principais fontes das células constituintes das *BMUs*. Porém, importa sublinhar que a medula óssea não será a única origem destas células. De facto, vários capilares sanguíneos penetram a *canopy*, actuando também como uma via para o transporte de células necessárias à *BMU*.

O vaso sanguíneo constitui uma estrutura sempre presente e estrategicamente localizada em todas as *BMUs*, uma vez que a formação de novos vasos sanguíneos está intimamente relacionada com os processos de osteogénese e ossificação, quer intramembranosa, quer endocondral.

Por outro lado, é cada vez mais evidente a existência de uma linhagem comum entre células vasculares endoteliais e células da linha osteoblástica. Com efeito, os osteoblastos encontram-se sempre na proximidade de células endoteliais, e a invasão vascular constitui um pré-requisito para a formação, remodelação e regeneração óssea.

Em relação às células osteoblásticas, apenas um reduzido número de células desta linha foi detectado, até há bem pouco tempo, na circulação periférica. Todavia, com a possibilidade de identificação destas células através de meios tecnológicos mais sofisticados (*citometria de fluxo* e *cell sorter analysis*), permitiu encontrar e caracterizar uma expressiva percentagem de células da linha osteoblástica no sangue periférico.

Em síntese, estudos recentes vieram demonstrar que a remodelação óssea, tanto no tecido ósseo cortical como trabecular, tem lugar em estruturas vasculares especializadas para o efeito – o Compartimento de Remodelação Óssea (*BRC*).

Segundo este modelo, as células precursoras dos osteoblastos chegarão ao *BRC* a partir não directamente da medula óssea (o que não seria possível, uma vez que o tecido ósseo cortical se situa em locais distantes desta), mas a partir de capilares sanguíneos que invadem o *BRC*. Com efeito, as células da linha osteoblástica podem entrar no *BRC* através da circulação sanguínea (*capilar aferente*), ou provenientes de células das estruturas perivasculares (*péricitos*) ou ainda das próprias células endoteliais.

Assim sendo, a possibilidade de se efectuar a identificação e colheita destas células e sua posterior expansão por cultura apresenta-se como uma promissora ferramenta para a elaboração de futuros tratamentos de patologias relacionadas com o metabolismo do tecido ósseo.

IV. Abstract

Bone remodelling represents the most notable response of the bone tissue, as it is supported by a complex cellular machinery which is under the influence of numerous regulation factors. Furthermore, the mechanism of bone remodeling is a strictly localized process.

The bone remodelling cycle comprehends a series of organized events that will convert a resting surface in a remodeling area, following an immutable sequence of activation (**A**) → resorption (**R**) → formation (**F**). Therefore, the process of bone remodelling consists in the elimination of a certain area of bone tissue that will be replaced by another, with little or none alterations of bone mass.

This way, it is plausible to state that bone resorption and formation are events which are closely attached, as the beginning of the first one stimulates the repairing activity of the second, in the way that the resorption of a certain amount of bone tissue shall be replaced by the same amount of new bone.

Truthfully, considering the fact that in the sequence of bone remodeling the formation phase (performed by osteoblasts) is always preceded by a resorption phase (performed by osteoclasts), the way in which the transition or reversion takes place is still widely unknown. Can osteoclasts trigger osteoblast differentiation, representing an essential factor for osteoblastic differentiation?

There are multiple possibilities of answers to this question, namely: a) the presence of growth factors produced by osteoclasts will have a paracrine effect on osteoblasts; b) the action of growth factors and cytokines with osteogenic potential present within the bone matrix are released with the beginning of osteoclastic resorption and c) a direct cell-to-cell contact between osteoclasts and osteoblasts.

Despite the alignment and association between bone resorption and formation is rarely affected, the final balance concerning the level of bone mass can vary considerably. As it is conventionally accepted, with the aging process and in situation of bone disease, such as osteoporosis, the final balance between bone resorption and formation tends to be negative.

Furthermore, most of inflammatory and metabolic diseases that hit bone tissue usually manifest themselves by disturbances in the dynamics of the remodeling process, resulting almost invariably in a decrease in bone mass, associated with osteoclastic resorption.

It is also important to stress out that all cellular activity within the bone remodeling cycle has to be *protected* by a specific structure created for that matter.

Hauge et al (2001) were the first investigators to point out the existence of a bone remodeling compartment as a real and temporary entity, demonstrating its existence histologically.

These investigators also verified that the cells which formed this *canopy* expressed the majority of the markers characteristic of the osteoblastic phenotype (alkaline phosphatase, osteocalcin and osteonectin), most likely being bone *lining* cells. These investigations also raised the hypothesis that this compartment may very well form a specialized vascular structure.

Later on, numerous investigations [7][14] demonstrated as well that there is a strict association between blood capillaries and the bone remodeling compartment's *canopy*, concluding that the integrity of the *BRC* itself is also a pre-requirement fundamental for bone remodeling and formation.

The marrow microenvironment surrounding the *BRC* is one of the main sources of cells that form the *BMU*. In spite of this, it is important to state that the bone marrow is not the only origin of these cells. In fact, multiple blood capillaries penetrate the *BRC canopy* and serve as a method of transportation of the cells needed to the functioning of the *BMU*.

The blood vessel is a structure strategically present e located in all *BMU*'s, once the formations of new blood vessels is intimately related with the processes of osteogenesis and ossification.

In another perspective, it is ever more evident the existence of a common lineage between vascular endothelial cells and osteoblastic cells. Furthermore, the osteoblasts are always located near endothelial cells and vascular invasion is a pre-requirement for bone formation, remodeling and regeneration.

Concerning to the osteoblastic cells, merely a low number of cells from this lineage has been detected in the peripheral circulation until recently. However, with the possibility of identifying these cells through technologically more sophisticated methods (flow cytometry and cell sorter analysis) allowed investigators to find a descriptive percentage of osteoblastic cells on the peripheral blood.

In summary, these recent studies demonstrated that bone remodeling (both in cortical and trabecular bone tissue) takes place in specialized vascular structures – the bone remodeling compartment. According to this model, osteoblastic precursor cells arrive in the *BRC* not only from the bone marrow, but also via blood capillaries which invade the *BRC*. Furthermore, osteoblastic lineage cells may enter the *BRC* through the blood circulation (afferent capillary), they may be originated from perivascular structures (pericytes) and also from the endothelial cells themselves.

This way, the possibility of performing the identification e harvesting of these cells and the subsequent expansion through culture represents a promising tool for the formulation of future therapeutics of diseases related to bone tissue metabolism.

V. Bibliografia

1. Garant PR. *Oral Cells and Tissues: Quintessence Publishing (IL) 2003.p. 195-238.*
2. Martin, T.J. and E. Seeman, *Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. 22(5): p. 701-22.*
3. Junqueira LCCJ. *Tecido ósseo. In: Koogan G, editor. Histologia Básica. 11ª edição ed; 2008. p. 108-26.*
4. Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular. In: Kierszenbaum AL, Editor. Tradução da 2ª Edição ed: Mosby-Elsevier; 2008. p. 136-59.*
5. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. *The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol 2008;61(5):577-87.*
6. Standing S. *Gray's Anatomy, 40th Edition - The Anatomical Basis of Clinical Practice, Expert Consult Churchill Livingstone 2009. p. 27-59.*
7. Geddes AC. *The Origin of the Osteoblast and of the Osteoclast. J Anat Physiol 1913;47(Pt 2):159-76.*
8. Parfitt, A.M., *Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. Bone, 2002. 30(1): p. 5-7.*
9. Hauge, E.M., et al., *Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. J Bone Miner Res, 2001. 16(9): p. 1575-82.*
10. Epstein, S., *Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. Endocr Rev, 1988. 9(4): p. 437-49.*
11. 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.*
12. Doblare M, Garcia JM. *Anisotropic bone remodelling model based on a continuum damage-repair theory. J Biomech 2002;35(1):1-17.*
13. 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):273-86.*
14. 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 1992;1(1):11-21.*
15. Parfitt, A.M., *The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. Calcif Tissue Int, 1984. 36 Suppl 1: p. S37-45.*
16. Cohen MM, Jr. *The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. Am J Med Genet A 2006;140(23):2646-706.*
17. Mensah KA, Li J, Schwarz EM. *The emerging field of osteoimmunology. Immunol Res 2009.*
18. Huiskes, R., et al., *Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. Nature, 2000. 405(6787): p. 704-6.*
19. Chow, J.W., et al., *Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. J Bone Miner Res, 1998. 13(11): p. 1760-7.*

20. Lafage-Proust MH., et al., Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling. *BoneKEy Reports* 4, Article number: 662 (2015) | doi:10.1038/bonekey.2015.29
21. Brandi ML et al. *Vascular biology and the skeleton*; *J Bone Miner Res.* 2006;21:183-192
22. Agerbaek MO, Eriksen EF, Kragstrup J, Mosekilde L, Melsen F. A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner.* 1991;12:101-12
23. Eriksen E., Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* (2010) 11:219-227, DOI 10.1007/s11154-010-9153-1
24. Eriksen E. et al., Perspective Remodeling and Vascular Spaces in Bone. *Journal of bone and mineral research*, Volume 22, Number 1, 2007; Published online on October 2, 2006; doi: 10.1359/JBMR.060910
25. Khosla, S., Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 2001. 142(12): p. 5050-5.
26. Ishii, M., et al., Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 2009. 458(7237): p. 524-8
27. Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *EMBO J.* 2006;25:5840-51
28. Zvaifler, N.J., et al., Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*, 2000. 2(6): p. 477-88.
29. Zhao, C., et al., Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab*, 2006. 4(2): p. 111-21.
30. Lu Q, Sun EE, Klein RS et al. Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* 2001; 105(1): 69-79.
31. Canalis, E., et al., Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int*, 2007. 18(10): p. 1319-28.
32. Martin, T.J. and N.A. Sims, Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*, 2005. 11(2): p. 76-81.
33. Everts, V., et al., The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*, 2002. 17(1): p. 77-90.
34. Barou O, Laroche N, Palle S, Alexandre C, Lafage-Proust MH: Preosteoblastic proliferation assessed with BrdU in undecalcified, Eponembedded adult rat trabecular bone. *J Histochem Cytochem* 1997, 45: 1189e1195
35. Lotinun S, Sibonga J, Turner R: Differential effects of intermittent and continuous administration of parathyroid hormone on bone histomorphometry and gene expression. *Endocrine* 2002, 17:29e36
36. Rouleau MF, Mitchell J, Goltzman D: Characterization of the major parathyroid hormone target cell in the endosteal metaphysis of rat long bones. *J Bone Miner Res* 1990, 5:1043e10537
37. Kristensen H. et al., Osteoblast Recruitment Routes in Human Cancellous Bone Remodeling, *The American Journal of Pathology*, Vol. 184, No. 3, March 2014

38. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, Plesner T, Delaissé JM: A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol* 2009, 174:239e247
39. Jensen PR, Andersen TL, Søre K, Hauge EM, Bollerslev J, Amling M, Barvencik F, Delaissé JM: Premature loss of bone remodeling compartment canopies is associated with deficient bone formation: a study of healthy individuals and patients with Cushing's syndrome. *J Bone Miner Res* 2012, 27:770e780
40. Kristensen HB, Andersen TL, Marcussen N, Rolighed L, Delaissé JM: Increased presence of capillaries next to remodeling sites in adult human cancellous bone. *J Bone Miner Res* 2013, 28:574e585
41. Jaworski, Z.F., Coupling of bone formation to bone resorption: a broader view. *Calcif Tissue Int*, 1984. 36(5): p. 531-5.
42. Mohamed, A.M., Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med*, 2003. 349(17): p. 1671; author reply 1671.
43. Taubman, M.A. and T. Kawai, Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2001. 12(2): p. 125-35.
44. Parfitt, A.M., The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. *J Bone Miner Res*, 2001. 16(9): p. 1583-5.
45. Rocha, P., et al, "Apexificação e Revascularização em dentes permanentes imaturos – estudo experimental In vivo", tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013
46. Vale, F., et al, "Distração Osteogénica Mandibular dento-ancorada – estudo experimental", tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014
47. Palma, P., "Estudo de novas formulações para regeneração óssea em defeitos de dimensão crítica", tese de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
48. Khosla, S. and G.Z. Eghbali-Fatourehchi, Circulating cells with osteogenic potential. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1068: p. 489-97.
49. Khosla, S., J.J. Westendorf, and U.I. Modder, Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair. *Stem Cells*, 2010. 28(12): p. 2124-8.
50. Mundy, G.R., Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res*, 1993. 8 Suppl 2: p. S505-10.
51. Ribatti, D., B. Nico, and E. Crivellato, The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol*, 2011. 55(3): p. 261-8.
52. Edelman, D.A., et al., Pericytes and their role in microvasculature homeostasis. *J SurgRes*, 2006. 135(2): p. 305-11.

53. Collin-Osdoby, P., Role of vascular endothelial cells in bone biology. *J Cell Biochem*, 1994. 55(3): p. 304-9.
54. Carlevaro, M.F., et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci*, 2000. 113 (Pt 1): p. 59-69.
55. Villars, F., et al., Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem*, 2000. 79(4): p. 672-85.
56. Crawford, Y. and N. Ferrara, VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell Tissue Res*, 2009. 335(1): p. 261-9.
57. Kempen, D.H., et al., Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials*, 2009. 30(14): p. 2816-25.
58. Zvaifler, N.J., et al., Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*, 2000. 2(6): p. 477-88.
59. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003. 423(6937): p. 337-42.
60. Street, J., et al., Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(15): p. 9656-61.
61. Cooper, D.M., et al., Three-dimensional microcomputed tomography imaging of basic multicellular unit-related resorption spaces in human cortical bone. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2006. 288(7): p. 806-16.
62. Cheng, S.L., et al., Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 1994. 134(1): p. 277-86.
63. Modder, U.I. and S. Khosla, Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. *J Cell Biochem*, 2008. 103(2): p. 393-400.
64. Eghbali-Fatourehchi, G.Z., et al., Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. *Bone*, 2007. 40(5): p. 1370-7.
65. Sims, N.A. and J.H. Gooi, Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*, 2008. 19(5): p. 444-51.
66. Robling, A.G., A.B. Castillo, and C.H. Turner, Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006. 8: p. 455-98.
67. Bonewald, L.F., Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision*, 2006. 3(10): p. 7-15.
68. Huiskes, R., et al., Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*, 2000. 405(6787): p. 704-6.

69. Kwon, D.S., et al., *Physiologic subperiosteal new bone formation: prevalence, distribution, and thickness in neonates and infants. AJR Am J Roentgenol*, 2002. 179(4): p. 985-8.
70. Andersen, T.L., et al., *A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. Am J Pathol*, 2009. 174(1): p. 239-47.
71. Hernandez, C.J., S.J. Hazelwood, and R.B. Martin, *The relationship between basic multicellular unit activation and origination in cancellous bone. Bone*, 1999. 25(5): p. 585-7.
72. Eriksen, E.F., G.Z. Eghbali-Fatourehchi, and S. Khosla, *Remodeling and vascular spaces in bone. J Bone Miner Res*, 2007. 22(1): p. 1-6.
73. Raisz, L.G., *Physiology and pathophysiology of bone remodeling. Clin Chem*, 1999. 45(8 Pt 2): p. 1353-8.

VI. Índice

Agradecimentos	4
Sumário	5
I – Introdução	
1. Justificação do tema	7
1.2 Planificação do trabalho	9
2. Ciclo de Remodelação óssea (alguns aspetos)	10
II – Compartimento de Remodelação Óssea (CRO) - estudo experimental em modelo animal	
1. Objetivo	17
2. Materiais e Métodos	17
2.1 Animal de experimentação	
2.2 Manutenção e bem-estar animal	
2.3 Colheita do material	
2.4 Processamento histológico de material descalcificado	
2.5 Processamento histológico de material não descalcificado	
3. Resultados	
3.1 Detecção de CRO no tecido ósseo alveolar	21
3.2 Identificação de diferentes etapas do ciclo de remodelação óssea	30
3.3 Detecção de compartimentos de remodelação no cimento e dentina	37
4. Discussão e conclusões	40
III – Resumo	45
IV – Summary	48
V – Bibliografia	50
VII- Anexos	56

VII. Anexos

Listagem de Acrónimos

BMU – Basic Multicellular Unit

BRC – Bone Remodelling Compartment

LPS – Lipopolissacarídeos

RANKL – Receptor Activated of Nuclear Factor Kappa-B Ligand

RANK – Receptor Activated of Nuclear Factor Kappa-B

OPG – Osteoprotegerin

TGF β - Tumoral Growth Factor β

PDGF – Platelet Derived Growth Factor

IGF-I – Insulin-like Growth Factor I

BMP – Bone Morphogenic Protein

SIP – Sphingosin-1-phosphate

ET-I – Endothelin I

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor