

Índice

Agradecimentos

Justificação do tema

Resumo

Abstract

Introdução

Algumas noções sobre a capacidade de optimização biomecânica do tecido ósseo

Células do tecido ósseo

 Células da linha osteoblástica

 Osteoblastos

 Osteócitos

 Osteoclastos e osteoclastogénese

 Osteoclastos

 Osteoclastogénese

Remodelação óssea

Regulação molecular da remodelação óssea

Osteoimunologia

Artrite reumatóide

Osteoporose

Resistência do tecido ósseo durante a osteoporose

Fisiologia do tecido ósseo durante a osteoporose

Sequência de eventos na cascata de perda de massa óssea –
hipóteses explicativas para um ciclo vicioso

Tratamento da osteoporose

Terapêuticas estabelecidas

Novos tratamentos para a Osteoporose

Algumas limitações terapêuticas actuais

Metástases ósseas – alguns aspectos

Mecanismos de metastização óssea

Nichos osteoblásticos

Bibliografia

Agradecimentos

Agradeço à minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Helena Lopes Figueiredo pelo entusiasmo e dedicação sem limites, dentro e fora da sala de aulas, para onde espreitar uma oportunidade de ir mais longe na compreensão da ciência que constrói o ser humano, com quem aprendi a dar os meus «primeiros passos» na histologia, base fundamental para compreender a Anatomia Patológica e todas as outras ciências clínicas. E indubitavelmente uma referência no ensino desta escola. A quem devo uma orientação e apoio incansável, de valor inestimável e sem quem não teria chegado ao fim deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Judas por ter acolhido este projecto.

Apresento a minha gratidão também ao Dr. Paulo Palma pelo material bibliográfico e imagens que gentilmente e prontamente me cederam.

Resumo

A permanente reorganização do tecido ósseo, visando uma constante adaptação ou reparação da sua microestrutura óssea, é levada a cabo por diversas células ósseas, que assumem várias formas e funções e que, no seu conjunto, constituem a série osteoblástica e a série osteoclástica.

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

A remodelação óssea implica a reconstrução de uma área, iniciando-se sempre com um processo de reabsorção. Os osteoclastos são as células com maior responsabilidade nos dinâmicos processos de remodelação óssea.

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

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

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

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

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

Nesta perspectiva, um mecanismo de tipo inflamatório parece estar na base de todo o processo de remodelação, podendo mesmo considerar-se o

próprio processo de remodelação (ele próprio) como sendo uma resposta inflamatória localizada nas áreas de tecido ósseo estrutural ou funcionalmente danificado.

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

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

Nos casos de artrite reumatóide observa-se uma forte participação de linfócitos T (*TH-17* cells) no processo de formação dos osteoclastos, traduzindo uma contribuição determinante destas células (estimulando a produção de RANKL) para a perda da massa óssea e conseqüente deformação articular. Pode actualmente considerar-se a artrite reumatóide como uma *RANKL disease*. Uma excessiva perda óssea observa-se não só nas doenças inflamatórias, mas também nas doenças auto-imunes e neoplásicas.

Também acompanhada por um processo inflamatório, neste caso mediado pelo défice de estrogénios, a osteoporose será abordada com especial atenção e de uma forma interdisciplinar, por constituir o maior problema de saúde pública para adultos saudáveis acima dos 55 anos de idade e se prever um aumento da sua incidência mundial de 3 vezes nos próximos 5 anos devido ao envelhecimento da população, se não houver nenhuma estratégia interventiva.

O défice de estrogénios tem efeitos directos estimulando a linhagem osteoclástica e inibindo a linhagem osteoblástica e efeitos indirectos, principalmente mediados por células do sistema imunitário, com activação de células T.

O estado pró-inflamatório que acompanha a osteoporose e o envelhecimento em geral designa-se por *inflammaging*.

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

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

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

Abstract

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

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

Remodeling commences with signals that initiate osteoclast formation, followed by osteoclast-mediated bone resorption, a reversal period, and then a long period of bone matrix formation mediated by osteoblasts, followed by mineralization of the matrix.

Bone remodeling is tightly regulated by central, systemic and local factors. The relative concentration of RANKL and OPG in bone is a major determinant to balance bone formation and resorption.

The bone and immune systems share an abundance of molecules and regulatory mechanisms. The interaction between the immune and skeletal systems has long been acknowledged, but investigation into rheumatoid arthritis

ha highlighted the importance of the dynamic interplay between the two systems. Osteoimmunology analyses the interactions between bone and immune cells.

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

Since 1941 that osteoporosis has been proposed as a consequence of estrogen deficiency. Collectively, estrogen deficiency has direct as well as indirect impacts on bone metabolism all of which promote osteoclastogenesis through T cell activation. The proinflammatory status associated with aging in general and the postmenopausal phase in particular is referred to as «inflammaging», which is evidenced by the increase of systemic IL-1, IL-6 and TNF- α .

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

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

Introdução

O tecido ósseo está continuamente sujeito a um processo de renovação com aproximadamente 25% de tecido ósseo trabecular e 3% de tecido cortical a serem substituídos anualmente, numa média de 10% de osso total, havendo uma renovação completa cada 10 anos. A deposição e reabsorção ósseas, através de mecanismos de modelação e remodelação ósseas, são processos dinâmicos efectuados por BMUs (Basic multicellular units), unidades constituídas por células de linhagem osteoblástica e osteoclástica, assim como por células não BMUs (células do sistema imunitário, sistema endotelial e sistema nervoso) . No tecido trabecular normal cerca de 900 BMUs são iniciadas em cada dia verificando-se cerca de 180 BMUs no tecido cortical BMUs iniciadas por dia [1,2]

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

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

Este trabalho visa prioritariamente proporcionar uma panorâmica geral do processo de remodelação óssea e dos seus factores de regulação. Ainda dentro deste contexto pareceu-nos importante fazer algumas considerações sobre osteoimunologia, osteoporose e processos de metastização óssea .

Algumas noções sobre a capacidade de optimização biomecânica do tecido ósseo

É através da remodelação e modelação que os ossos são capazes de processos de adaptação e auto-reparação da sua estrutura como resposta a alterações mecânicas, biológicas e bioquímicas. Muitas dessas exigências diferem consoante a localização anatómica, por esse motivo, não é surpreendente a variabilidade da microestrutura (e respectivas propriedades) do tecido ósseo desde a disposição densa e reforçada da estrutura do córtex diafisário ao aspecto em favo de mel, menos denso de osso trabecular das regiões metafisárias.

O que determina a organização da arquitectura do tecido ósseo? Porquê a anisotropia do osso lamelar?

Sob condições de imponderabilidade e/ou inactividade física, a perda de massa óssea pode ser bastante significativa. Ao invés, a actividade leva habitualmente ao reforço do tecido ósseo, dependendo o aumento de massa óssea da intensidade e frequência dos esforços realizados .

Isto implica que a formação de tecido ósseo é essencialmente aumentada por aplicação dinâmica de carga, tendo-se demonstrado que aplicação de carga com baixa amplitude/magnitude ($< 10 \mu\text{C}$) e elevada frequência (10 – 100 Hz)

estimula a deposição do tecido ósseo e inibe a osteoporose de desuso. Este tipo de estímulos são muito frequentes nas actividades rotineiras do dia-a-dia.

Uma aceleração nos ciclos de carga dinâmica tem também um elevado potencial osteogénico. Isto pode ser conseguido através de saltos em direcções inabituais numa actividade física de elevado impacto.

A justificação para a formação de tecido ósseo ser estimulada preferencialmente por cargas dinâmicas (em detrimento de cargas estáticas), de elevada frequência e baixa amplitude, advém da resposta osteogénica (mecanossensibilizada pelos osteócitos) depender de fluxo de fluido na rede de canaliculos causada por aplicação súbita de shear stress (carga) sobre o tecido ósseo. [3].

Verifica-se, no entanto, que uma aceleração de ciclos de carga de estímulos mecânicos de alta amplitude e baixa frequência pode ter efeitos osteogénicos comparáveis a baixo numero de ciclos de cargas de elevada frequência e baixa amplitude. [3].

Existe, portanto, uma relação dinâmica entre a estrutura do tecido ósseo e o meio envolvente [4], estabelecida pela lei de Wolf, anatomista do fim do século XIX que afirmava que os elementos trabeculares do esqueleto não foram concebidos apenas para realizar uma função específica de suporte, mas também para responder às forças a que está sujeito, alterando constantemente a sua constituição estrutural, durante todo o tempo de vida do individuo. De

acordo com esta lei, as características geométricas dos ossos e a distribuição dos seus componentes micro-estruturais são determinadas pela magnitude e direcção das tensões a que estão sujeitos. Assim, as trabéculas ósseas (e as fibras de colagénio) encontram-se preferencialmente alinhadas segundo a direcção das tensões máximas aplicadas daí resultando a anisotropia do osso (o osso trabecular é mais resistente e rígido na direcção do alinhamento trabecular), sendo que nas regiões onde predominam forças de compressão há uma disposição transversal das fibras de colagénio e das trabéculas ósseas em relação ao eixo sob carga. Uma alteração das forças mecânicas aplicadas localmente no tecido ósseo causa modificações na orientação das fibras de colagénio e nas trabéculas ósseas. A anisotropia de tecido ósseo melhora a eficiência estrutural, isto é, permite que se verifique o princípio « *maximal strength with minimal mass*» [5] conferindo força para resistir à aplicação de carga e leveza para permitir a sua mobilidade [6].

Seeman, E. sintetiza estas observações afirmando que «Bone's material composition and structure determine the loads it can tolerate. However, the loads on bone also determine its structure. This adaption is carried out by the cellular machinery of bone modeling and remodeling». [6,7,8].

Células do tecido ósseo

O tecido ósseo é, sob um ponto de vista celular, um tecido bastante económico, sendo constituído, apenas, por duas linhas celulares.

As populações de células que constituem o tecido ósseo assumem diversas formas e designações, com base na sua diferente morfologia, actividade e localização em relação à matriz calcificada. Estas células podem ser agrupadas em duas séries diferentes: células da linha osteoblástica, responsáveis pelo processo de formação da matriz óssea e células da linha osteoclástica, relacionadas com a sua reabsorção.

Células da linha osteoblástica

As células da linha osteoblástica têm origem nas células mesenquimatosas indiferenciadas e pluripotenciais, tendo sido tradicionalmente consideradas de localização exclusiva no perióstio e no estroma da medula óssea. Para além de células osteoblásticas, as células mesenquimatosas indiferenciadas podem também dar origem a células condroblásticas, fibroblásticas ou adiposas, em função da especificidade de diferentes factores indutores locais, de diferentes estímulos mecânicos e de diferentes condições de vascularização. Em relação a este último aspecto, está

hoje perfeitamente demonstrado que em áreas ricamente vascularizadas a diferenciação das células com potencial osteogénico vai, naturalmente, conduzir ao aparecimento de osteoblastos e de uma matriz óssea. Mas, por outro lado, em regiões, onde a rede vascular não esteja suficiente desenvolvida, existindo uma baixa de tensão de oxigénio, as células osteoprogenitoras podem diferenciar-se em condroblastos e originar um tecido cartilágneo (situações muitas vezes observadas aquando da formação do calo ósseo, no processo de cicatrização das fracturas), ou mesmo em fibroblastos e dar origem a um tecido fibroso. [6,9].

As células da linha osteoblástica integram quatro sub-populações principais: os **pré-osteoblastos**, os **osteoblastos maduros**, as **células de revestimento ósseo** e os **osteócitos**, sendo todas elas consideradas como diferentes estádios funcionais da mesma célula. Uma série complexa de etapas de proliferação e diferenciação permite que as células mesenquimatosas pluripotenciais se transformem em osteoblastos maduros.[10]

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

como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), e o factor de crescimento de transformação β (TGF- β) que através de factores de transcrição vão activar genes associados a proteínas específicas dos estádios mais precoces da formação da matriz óssea. Os pré-osteoblastos expressam também alguns pró-oncogenes c-myc, c-fos, c-jun, que intervêm activamente na proliferação e diferenciação das células osteoblásticas jovens.

Osteoblastos

Os **osteoblastos** tornam-se maduros quando atingem a superfície óssea e apresentam-se, então como células cúbicas, altamente polarizadas, dispostas em paliçada (frequentemente designadas por epitélio osteóide), actuando como uma barreira que controla o fluxo de iões para dentro e para fora do tecido ósseo (Fig. 1). Entre estas células formam-se junções comunicantes (*gap junctions*), que são fundamentais para a ligação e comunicação entre células adjacentes.

Os **osteoblastos maduros** são células sem capacidade de divisão mas metabolicamente muito activas. Apresentam, de facto, características ultra-estruturais típicas da sua função, ou seja, síntese e secreção de proteínas de exportação, evidenciando um aparelho de Golgi e um retículo endoplasmático rugoso, bem desenvolvido e numerosas mitocôndrias. Entre as proteínas sintetizadas pelos osteoblastos estão o colagénio tipo I e proteínas não colagénicas como a osteopontina, a osteocalcina e a sialoproteína óssea entre

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

Os **osteoblastos** são responsáveis não só pela formação da matriz óssea mas também pela sua mineralização. De facto, o tecido ósseo é constituído por uma fase mineral, formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatite, que assenta numa organizada matriz colagénica (fase orgânica). A combinação da fase mineral e da fase orgânica confere ao tecido ósseo propriedades biomecânicas únicas. As fibras de colagénio conferem uma certa elasticidade ao tecido ósseo, bem como algumas capacidades de resistência à propagação de fissuras.

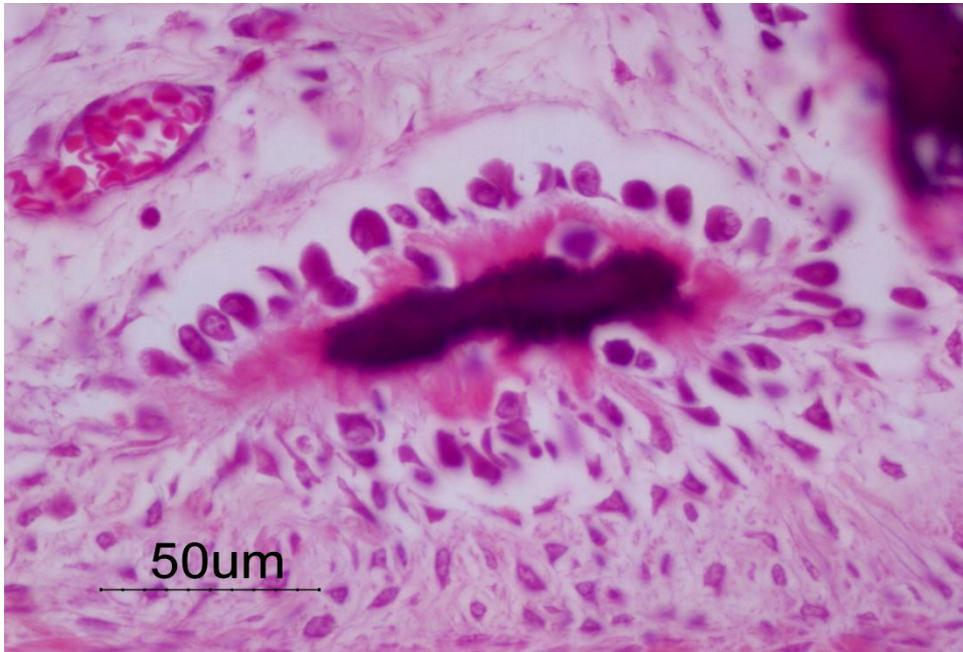


Figura 1. Osteoblastos na periferia de uma trabécula óssea em formação. É visível, também, a presença de osteóide e de matriz mineralizada.

Os **osteoblastos** apresentam numerosos prolongamentos citoplasmáticos, que se projectam para a matriz óssea e que se interdigitam e comunicam com os prolongamentos dos osteócitos. Este facto permite o estabelecimento de importantes relações entre os osteoblastos activos na superfície óssea e os osteócitos que estão no seio da matriz calcificada.

Estas células funcionam ainda com receptores e transmissores de sinais para a remodelação óssea.

Com efeito, à excepção da calcitonina, todas as hormonas e muitos factores de crescimento e citoquinas que controlam a reabsorção do tecido ósseo, têm receptores nos osteoblastos e não nos osteoclastos. Tudo indica, portanto que são as células osteoblásticas e não os osteoclastos que

desencadeiam o processo de reabsorção óssea.

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

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

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

Osteócitos

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

difusão de nutrientes e a vida da matriz óssea depende do osteócito.

Os prolongamentos celulares dos osteócitos situados no interior dos canalículos encontram-se, também, interligados por junções comunicantes (*gap junctions*), formando uma rede que é conhecida como *spider's web of bone*[8], apresentando uma profunda analogia com a rede «neuronal» que se observa no tecido nervoso. Perante esta observação P J Nijweide e tal. Chega mesmo a colocar esta interessante questão : «*Are the osteocytes the nerve cells of the mineralized bone matrix?*».

Devido ao seu elevado número (sendo as células mais numerosas) e complexa organização e disposição, os osteócitos estão numa situação privilegiada para captar as alterações da matriz óssea e os estímulos mecânicos que actuam sobre o osso (mecanossensores). Estas informações são depois transmitidas às células da superfície para que estas possam activar os processos de remodelação óssea, sempre que estes sejam necessários. Seeman descreve desta forma interessante o papel do osteócito no processo de remodelação “*in the cellular symphony of bone remodelling the osteocytes is one the most important members of the orchestra, if not the first violinist or conductor*”. [8]

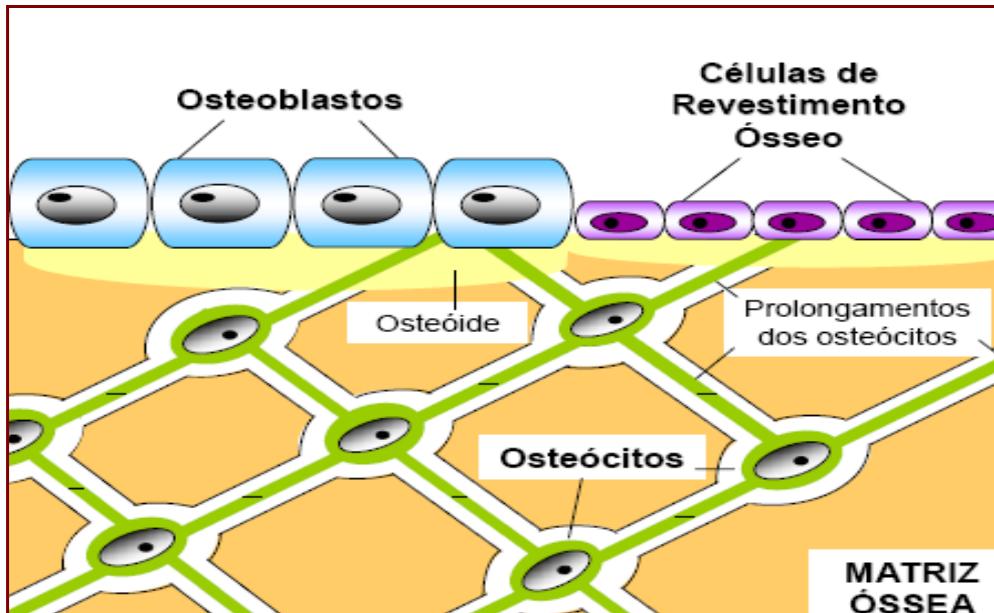


Figura 2 - Esquema representativo da distribuição e localização na matriz óssea das células da linha osteoblástica. Os osteoblastos e as células de revestimento ósseo encontram-se dispostos numa camada contínua, à superfície da matriz óssea (uma zona de matriz orgânica não calcificada, denominada por osteóide, separa estas células da matriz calcificada). Os osteócitos encontram-se situados no interior de lacunas existentes na matriz óssea. Por sua vez, uma profusa rede de canalículos interligam as lacunas entre si e alojam os prolongamentos dos osteócitos. Este conjunto (osteócitos e sistema lacuno-canalicular) forma uma complexa rede que põe em comunicação os osteócitos, os osteoblastos e as células de revestimento ósseo.*

O mecanismo pelo qual as forças mecânicas conseguem regular processos celulares é designado de uma forma global por **mecanotransdução**. Assim sendo, a mecanotransdução pode ser entendida como a conversão de um sinal de natureza mecânica (força) numa resposta celular de natureza bioquímica. Por outras palavras, pode considerar-se o mecanismo de transdução como um processo pelo qual certas células (células receptoras) detectam ou “sentem”

certos sinais mecânicos (forças ou tensões aplicadas) gerando uma resposta celular (de natureza bioquímica) dirigida às células alvo (células efectoras). Estas últimas células vão, por sua vez, activar ou modular os processos de remodelação. Os osteócitos constituem nestas circunstâncias as células receptoras ou mecanosensoras, sendo as células de revestimento ósseo, os osteoblastos e os osteoclastos, as células efectoras.

Porém, os osteócitos não respondem directamente aos estímulos mecânicos que atingem a matriz mineralizada mas respondem (indirectamente) às alterações e deformações do fluido extracelular. Com efeito, os osteócitos parecem ser particularmente sensíveis às diferenças de fluxo e pressão hidrostática do fluido existente no sistema lacuno-canalicular. Assim, a deformação da matriz óssea (que ocorre pela aplicação de uma determinada força) pode causar diferenças de pressão no fluido que preenche os canalículos, alterando o seu fluxo (isto é, a sua velocidade). É nesta interacção, entre o movimento do fluido e os osteócitos, que reside a chave da mecanotransdução. Estas alterações do meio extracelular (variações de pressão e velocidade dos fluidos) são, pois, captadas pelos osteócitos que as convertem em sinais e mensagens moleculares (óxido nítrico e prostaglandinas, alterações da carga eléctrica, alterações na membrana plasmática com libertação de cálcio), que serão transmitidas, como já foi referido, às células efectoras quer através dos prolongamentos celulares e *gap junctions* (activando a rede intracelular de comunicação) quer por difusão no fluido extracelular. É

cada vez mais consensual que estes mecanismos não actuam de forma isolada, mas sim em sinergia, observando-se diversas vias alternativas em simultâneo.

Por outro lado, a existência de uma área de matriz danificada ou comprometida (pela presença de microfissuras) pode provocar uma restrição na acessibilidade dos osteócitos aos nutrientes e oxigénio, o que leva à sua apoptose. A apoptose dos osteócitos desencadeia quase sempre processos de remodelação óssea, verificando-se uma íntima associação, no tempo e no espaço, entre microfissuras, apoptose dos osteócitos e remodelação óssea.[3]

Osteoclastos

Os osteoclastos desempenham uma função essencial na remodelação e na renovação do tecido ósseo.

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

reabsorção (levado a cabo nas lacunas de Howship), sendo as fases pré e pós-reabsorção relativamente curtas.

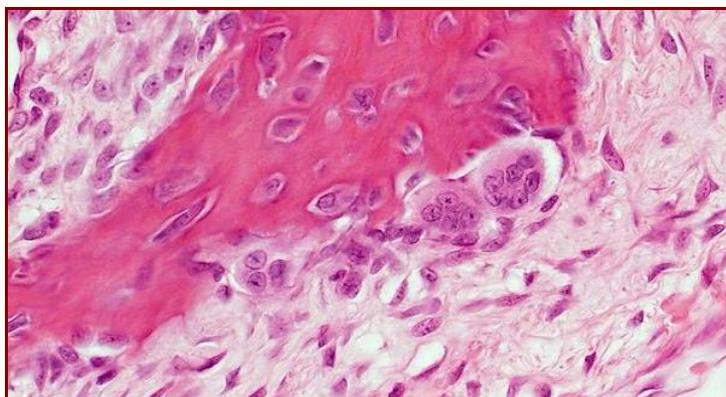


Figura 3 - Aspecto em microscopia de luz de osteoclastos presentes em lacunas de Howship à superfície de uma trabécula óssea. Corte histológico de material descalcificado corado com HE.*

Para dar início ao processo de reabsorção, o osteoclasto (Figura 6) une-se intimamente à matriz óssea, de modo a criar um compartimento estanque. Esta ligação é feita entre integrinas ($\alpha\beta3$), expressas e localizadas na sua membrana celular, e sequências RGD presentes em certas proteínas da matriz óssea. Nesta fase estabelece-se no osteoclasto uma forte polarização, com o pólo apical voltado para a matriz óssea e a superfície basolateral orientada para o micro-ambiente medular.^[11]

No pólo apical ocorre, entretanto, a formação de numerosas projecções digitiformes, semelhantes a microvilosidades (bordadura em escova), que se estendem até à superfície óssea e através das quais são lançados vários produtos que degradam a matriz adjacente, originando progressivamente uma lacuna de reabsorção[11]

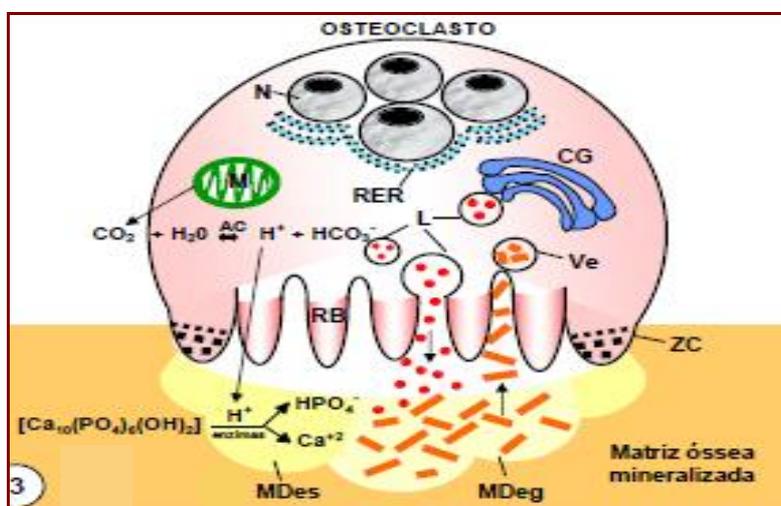


Figura 4 – Osteoclasto em actividade de reabsorção. O compartimento imediatamente subjacente à bordadura em escova (RB) constitui o local onde ocorre a reabsorção óssea. No interior do osteoclasto, a anidrase carbónica (AC) promove a conversão de gás carbónico (CO_2) e água (H_2O) em iões hidrogénio (H^+) e bicarbonato (HCO_3^-). A bomba de prótons, localizada na membrana da RB, promove a libertação dos iões H^+ para o microambiente onde se processa a reabsorção óssea. A acidificação, promovida pelos iões H^+ , contribui para a desmineralização da matriz óssea, ocorrendo a dissolução dos cristais de hidroxiapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e consequente libertação de cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (HPO_4^-). Segue-se, então, a secreção de enzimas lisossomais. Estas enzimas são responsáveis pela degradação das proteínas colagénicas e não-colagénicas da matriz. Os produtos da degradação da matriz orgânica são internalizados na RB, por meio de vesículas (Ve) e transportados para o interior do osteoclasto, sendo posteriormente, conduzidos para o meio extracelular. N, núcleos; M, mitocôndria; L, lisossomas; RER, retículo endoplasmático rugoso; CG, complexo de Golgi; MDes, matriz óssea desmineralizada; MDeg, matriz óssea parcialmente degradada.*

A reabsorção propriamente dita é um processo altamente organizado e sequencial (levado a cabo na lacuna de reabsorção) constituído por duas fases consecutivas. A primeira fase consiste num processo de acidificação do compartimento atrás mencionado (através da produção de prótons H^+ e aniões

Cl⁻), provocando a dissolução dos cristais de hidroxiapatite, constituintes da fase mineral da matriz óssea. Numa segunda fase, tem lugar a degradação completa da fase orgânica por acção de numerosos enzimas proteolíticos (catepsinas e metaloproteínas da matriz).^[11]

Na série osteoclástica podemos incluir os monócitos circulantes, os monócitos presentes na medula óssea, os pré-osteoclastos e os osteoclastos. Os osteoclastos são membros da linha celular dos monócitos-macrófagos, podendo a sua diferenciação resultar de precursores mielóides (medula óssea – série hematopoiética) mas também de células macrofágicas já bem diferenciadas. Assim sendo, pode considerar-se que o osteoclasto não será uma verdadeira célula óssea, mas sim uma célula sanguínea altamente especializada que possui muitas características imunológicas. A semelhança filogenética entre o sistema imunológico e o osteoarticular resulta numa forte comunicação e integração entre estes dois sistemas, ocupando o osteoclasto uma posição chave.^[11]

Com efeito, os osteoclastos são geralmente células com uma má “reputação” estando, quase sempre, associadas a desequilíbrios e situações patológicas. Schilling et al (2006) (12), num artigo muito original e interessante a propósito de osteoclastos, colocam a seguinte questão: “*Why does bone in contrast to all other tissues entertain a cell to destruct itself?*”, respondendo logo a seguir que “*the reason may be that the osteoclast is not a true bone cell, but rather a highly*

specialized blood cell". A este respeito referem ainda que "*bone resorption can be viewed as a fight between bone marrow and bone for the bone marrow space*".

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

Osteoclastogénese

O processo de formação, desenvolvimento e maturação dos osteoclastos engloba múltiplas etapas sendo a fusão celular de precursores mononucleares uma das mais emblemáticas.

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

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

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

Todavia, o RANKL pode também ser sintetizado pelas células dendríticas, linfócitos T e B (todas células de natureza inflamatória), apresentando-se, neste caso, sob uma forma solúvel. O conhecimento deste facto tem uma importância vital nos processos de reabsorção óssea associados a situações inflamatórias.

Os osteoblastos sintetizam ainda uma outra proteína, neste caso solúvel, a osteoprotegerina (OPG), com uma alta afinidade para o RANKL, impedindo ou bloqueando a ligação do RANKL ao seu receptor RANK. Por este mecanismo, a OPG regula a população funcional dos osteoclastos, actuando localmente como um “travão” à osteoclastogénese, reduzindo, deste modo, a reabsorção óssea (Figura 5).

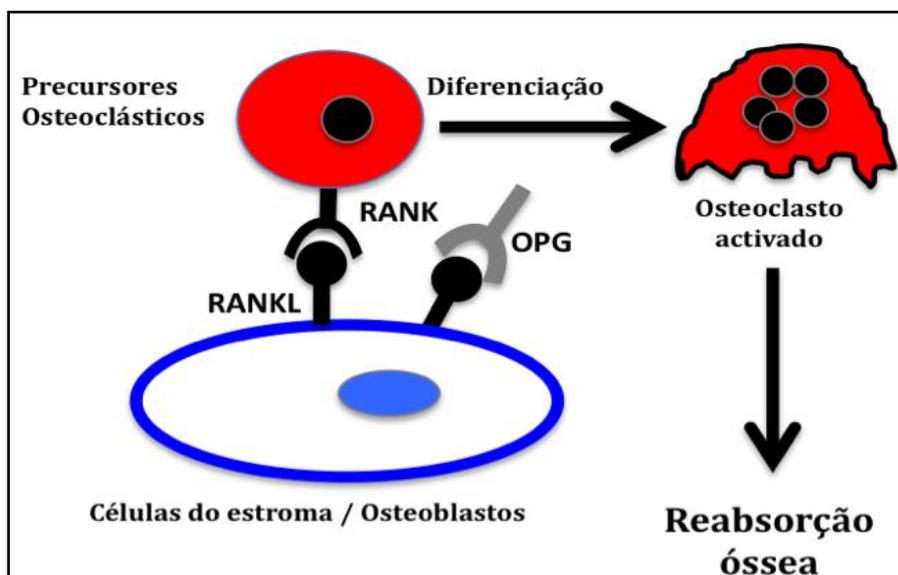


Figura 5 - Esquema do processo de diferenciação dos osteoclastos (osteoclastogénese) através do sistema RANKL/RANK/OPG com intervenção directa dos osteoblastos.*

Com efeito, as células da linha osteoblástica podem controlar o desenvolvimento e a actividade osteoclástica (em resposta a diferentes estímulos mecânicos, hormonais e inflamatórios) ajustando os níveis de expressão do RANKL e de OPG.^[13] A presença de altos níveis de RANKL promove a osteoclastogénese, enquanto que uma maior expressão de OPG resulta numa diminuição da osteoclastogénese, ou mesmo na apoptose dos osteoclastos. Assim, as células da linha osteoblástica podem funcionar como um reóstato (Figura 8) do processo de reabsorção óssea.^[13]

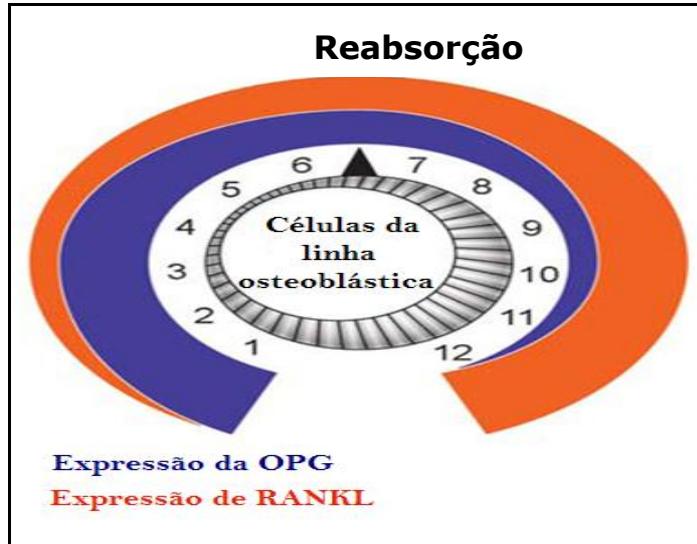


Figura 6 - Mecanismo de regulação da população funcional de osteoclastos, à semelhança de um reóstato, efectuada pelas células da linha osteoblástica com base nos níveis de RANKL e de OPG.*

Uma nota final para referir, mais uma vez, que muitos são os trabalhos que têm vindo a demonstrar¹¹³ que algumas citocinas pró-inflamatórias e os LPSs (lipopolissacarídeos componentes da superfície da parede de algumas bactérias Gram negativas) podem estar envolvidos na diferenciação terminal dos osteoclastos (Figura 9), de uma forma independente dos osteoblastos (ou seja, sem a necessidade do contacto directo com estas células). Tanto a Interleucina-1 (IL-1), Interleucina-6 (IL-6) como o factor de necrose tumoral α (*tumoral necrose factor α* – TNF- α) podem estimular por si só a osteoclastogénese.¹⁶

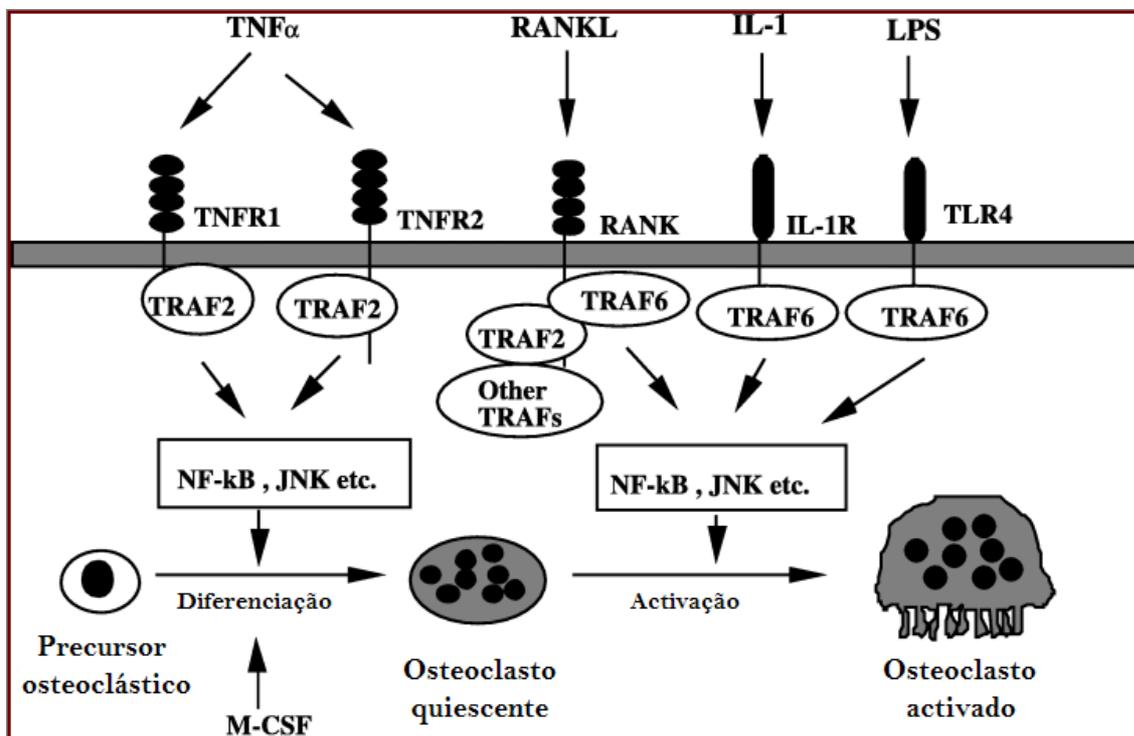


Figura 7 – Representação esquemática do processo de diferenciação e ativação das células osteoclásticas sob o efeito do TNF- α , RANKL, IL-1 e LPS. A presença de M-CSF é indispensável a todo este processo. De notar, porém, que as citocinas TNF- α , IL-1 e LPS actuam de forma independente do eixo RANKL/RANK. O conjunto dos TRAFs representa um mecanismo de transdução intracelular que leva à activação de factores de transcrição (NF-kB, JNK) que regulam a diferenciação e maturação final dos osteoclastos.*

A remodelação óssea é considerada por muitos autores, como iremos abordar mais adiante, uma resposta inflamatória. Assim, esta situação pode ser agravada por um terreno inflamatório favorável.

Em síntese, pode afirmar-se que o processo de diferenciação das células da linha osteoclástica está muito controlado pelas células da linha osteoblástica, através de um eixo de regulação comum, vulgarmente conhecido por RANKL/RANK/OPG. Porém, esta via não é de sentido único e, como

veremos posteriormente, também os osteoclastos condicionam e modulam muitas das actividades osteoblásticas.

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

Remodelação óssea

A remodelação óssea representa, como já foi referido, a mais notável resposta do tecido ósseo, tendo atrás de si uma complexa maquinaria celular que por sua vez está sujeita à acção de numerosos factores de regulação. De sublinhar ainda que o mecanismo de remodelação é um processo altamente localizado.

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

pertencentes ao sistema imune, sistema vascular, sistema hematopoiético que não terão, certamente, menos importância.

Este ciclo compreende uma série ordenada de eventos (Figura 13) que vão converter uma superfície em repouso numa zona em remodelação seguindo uma sequência imutável de activação (A) → reabsorção → (R) formação (F). A remodelação óssea consiste, pois, num processo pelo qual é eliminado uma área de tecido ósseo que será substituída por outra, com pouca ou nenhuma alteração da massa óssea. Este fenómeno pode verifica-se igualmente (e seguindo a mesma ordenação) noutros tecidos duros. [6,14,15]

As equipas celulares responsáveis por estas actividades multidisciplinares são colectivamente designadas por BMU (*basic multicellular unit*).

A **fase de activação (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 já foi descrito, da responsabilidade de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos osteócitos em “sofrimento” ou em apoptose, localizados na área que irá ser sujeita a remodelação. Esta situação leva ao recrutamento e migração dos precursores mononucleados osteoclásticos e ao reforço dos mecanismos da osteoclastogénese, subjacente

aos quais está normalmente o eixo RANKL/RANK/OPG com particular destaque para os elevados teores de RANKL em relação aos de OPG.

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

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

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

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

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

Uma das mais fortes evidências neste sentido resulta do facto de se observar sempre uma fase de reabsorção antes da fase de formação e o aparecimento de novo osso preferencialmente em locais onde previamente se verificou um processo de reabsorção. Também em estudos *in vitro* se observou que os osteoblastos em cultura elegem as superfícies côncavas e as lacunas de

reabsorção para o seu desenvolvimento. Estes aspectos pressupõem a existência nas lacunas de reabsorção de condições ideais para a osteogénese. Neste âmbito convém não esquecer a influência que podem ter as superfícies ósseas, particularmente a sua geometria de concavidade, no sentido de estimular e modular as respostas osteogénicas.

De facto, as lacunas de Howship, concavidades escavadas pelos osteoclastos, constituem locais estratégicos e privilegiados para a formação de matriz osteóide e sua posterior mineralização. A geometria conformacional, dimensão, composição, microarquitetura e ainda a nanoestrutura de superfície destas cavidades criam um micro-ambiente que propícia o aparecimento de um fenótipo osteoblástico. Estas lacunas parecem favorecer, ou mesmo contribuir, para uma sequestração de iões e de factores de crescimento ou outras proteínas com efeitos osteoindutores, estimulando ao mesmo tempo o processo de angiogénese, pré-requisito essencial para a osteogénese. Compreende-se facilmente que os osteoclastos, na sua actividade de reabsorção de matriz mineralizada, para além do seu directo envolvimento na reparação de áreas ósseas danificadas e no equilíbrio homeostático do cálcio, estejam também e sobretudo a preparar estas superfícies e a criar condições para uma posterior e eficaz colonização pelas células da linha osteoblástica. Esta dinâmica osteoclástica está na base dos tão característicos do processo de *creeping substitution* dos materiais do enxerto ósseo.

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

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

Durante este período de reconstrução, várias são as moléculas que podem ser consideradas como osteoindutoras sendo muitas delas produzidas localmente enquanto outras estavam presentes na matriz óssea sob uma forma inactiva (TGF,IGF1,PDGF) mas que entretanto foram libertadas e activadas na sequência do processo de degradação osteoclástica.

Nesta fase, convém acentuar mais uma vez a importância da presença de osteoclastos para o processo de formação óssea. Ref et al num estudo recente afirmaram que a presença de osteoclastos, independentemente da sua capacidade de reabsorção é essencial para os mecanismos de osteogénese, secretando factores activadores dos osteoblastos. Neste âmbito, é impossível deixar de referir que as terapêuticas mais utilizadas na osteoporose, e em

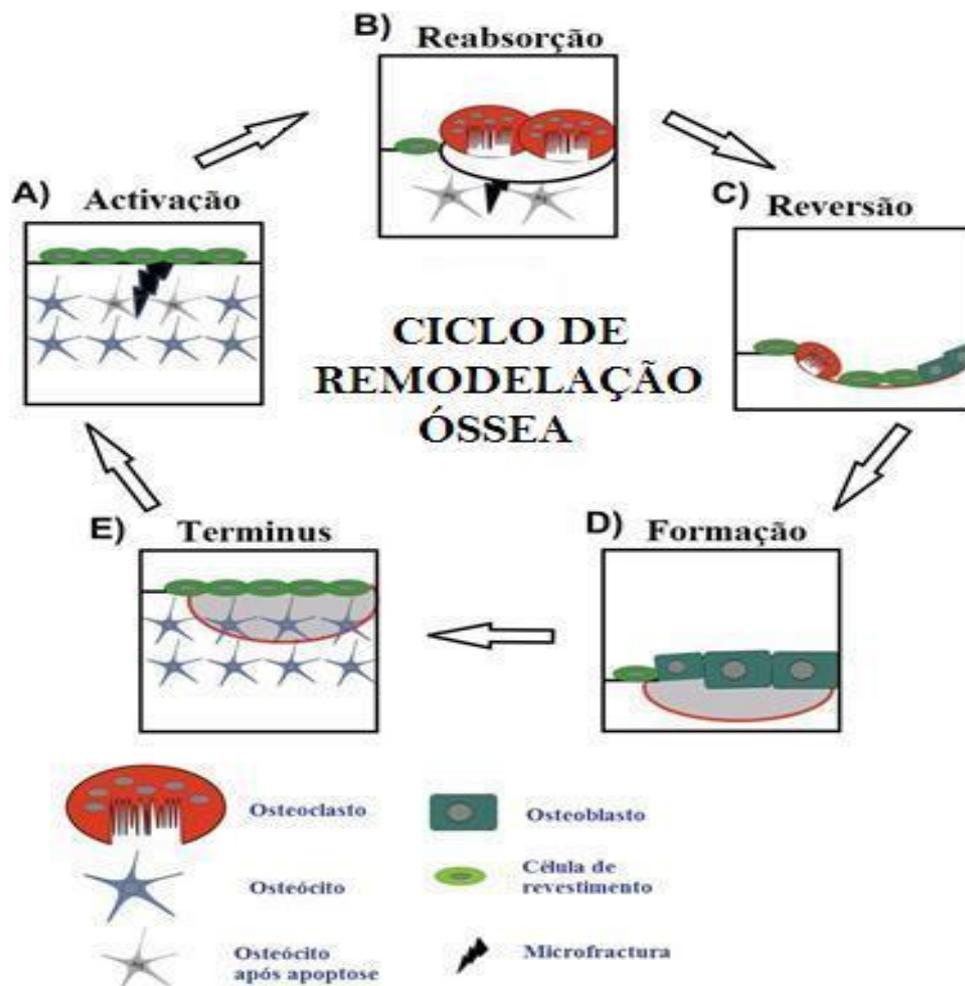
outras doenças acompanhadas de perda de massa óssea, consistem em fármacos exclusivamente anti-osteoclásticos. Este procedimento não será certamente o mais recomendado, uma vez que vai diminuir a presença de osteoclastos e, deste modo, o estímulo principal para a formação óssea.

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

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

Por outro lado, a velocidade da remodelação do osso esponjoso ou trabecular é muito maior que a do osso cortical. Este aspecto está intimamente relacionado com a sua grande área de superfície de contacto com o meio envolvente. Deste modo, pode responder com mais facilidade às várias solicitações, apresentando uma maior capacidade metabólica e uma maior actividade de remodelação do que o osso cortical. Encontramos, pois, por este

facto, uma maior incidência de patologia (osteoporose, metástases, osteomielites), nesta variedade de tecido ósseo.



*Adaptado de ¹⁴

Figura 8 – Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea.*

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

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

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

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

Em síntese a PTH parece desempenhar um papel central no ciclo de remodelação estando envolvida quer na fase de activação (via RANKL), quer na fase de reversão (via osteoclastos e Ephrin B2) quer ainda no terminus do

ciclo (redução da esclerostina). Até ao presente a PTH constitui a única terapêutica anabólica capaz de induzir a formação de novo osso. Porém, devido ao seu efeito na produção de RANKL pode secundariamente activar os processos de reabsorção. A combinação da PTH com terapias anti-reabsorção pode parecer aconselhável. No entanto, esta conjugação parece anular grande parte da resposta anabólica da PTH, acentuando o papel central dos osteoclastos nos processos anabólicos de osteogénese.

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

Regulação molecular da remodelação óssea

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

A actividade das células participantes no processo de remodelação (**BMUs**) para além de uma regulação sistémica apresentam, como já foi descrito, uma importante regulação local. Com efeito, verifica-se a existência de um conjunto de sinais e mensagens intercelulares estabelecendo um constante diálogo entre osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Este sistema de sinalização e comunicação local será o maior responsável pela acção concertada de todas estas células e pela coordenação e transição equilibrada das diferentes etapas da remodelação. Também é provável que toda esta actividade tenha que ser de certo modo “protegida” de interferências estranhas, tendo sido mesmo descrita a existência de um compartimento designado por **BRC** (*bone remodeling compartment*) que seria delimitado externamente por células de revestimento ósseo, visando proteger e abrigar todo este complexo e delicado conjunto de células e actividades. [6,16,19,20].

As **BRCs** (*bone remodeling compartments*) são compartimentos especializados que envolvem microcapilares e medeiam a comunicação entre a medula óssea e as superfícies ósseas em remodelação. [17,18,19,20]

São delimitados externamente por uma camada externa de células que apresentam marcações imunohistoquímicas da linhagem osteoblástica (fosfatase alcalina, osteocalcina, osteonectina, colagénio do tipo I, IGFs, TGF β , BMPs) assim como da linhagem osteoclástica (RANKL e OPG), não se sabendo com segurança se são mesmo células de revestimento (*lining cells*),

se células endoteliais transformadas, se pericitos ou mesmo células da linhagem macrocítica. (macrófagos ou «*osteomacs*»).[19,21,22]

Estas formações são delimitadas internamente pelo conjunto de células que participam quer na reabsorção ou deposição de tecido ósseo, de acordo com a etapa do ciclo de remodelação. [19,20]

Nestas áreas de remodelação temos a considerar não só as células específicas do tecido ósseo, que podem ser designadas por células BMUs, como as células não BMUs (Figura 15) que incluem, entre outras, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B (populações celulares pertencentes ao sistema imunitário).

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

Com efeito, um mecanismo de tipo inflamatório pode estar na base de todo o processo de remodelação, podendo mesmo considerar-se o próprio processo de remodelação (ele próprio) como sendo uma resposta inflamatória localizada nas áreas de tecido ósseo estruturalmente ou funcionalmente danificado. Estas áreas podem ser reconhecidas como *non-self* sendo o

processo de reabsorção óssea entendido, nesta perspectiva, como uma forma altamente especializada e controlada de autoimunidade. [23,24]

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

Em jeito de conclusão a figura 9 pretende ilustrar e fazer uma pequena sinopse do processo molecular e celular da reabsorção óssea “vivido” na frente de reabsorção de um cutting / filling cone, seguindo a tradicional sequência de activação – reabsorção – formação, via RANKL/RANK/OPG. O início e localização deste processo é induzido pelas citocinas inflamatórias produzidas pelos osteócitos lesados. Estas citocinas atraem, entre outras células do sistema imune, os linfócitos T e estimulam a produção de RANKL (tanto pelas células imunitárias como pelas células de revestimento e osteoblastos). Entretanto as células da linha osteoclástica, também provenientes da corrente sanguínea, chegam à frente de remodelação e começam a desenvolver os receptores RANK. O RANKL ao ligar-se ao seu

receptor RANK desencadeia a maturação e activação dos osteoclastos que iniciam e caracterizam a fase de reabsorção. Como consequência da actividade dos osteoclastos começam a libertar-se (da matriz óssea reabsorvida), vários factores de crescimento responsáveis pela proliferação e diferenciação dos pré-osteoblastos (que migram das zonas perivasculares ou mesmo da corrente sanguínea para esta área de baixa densidade celular). Neste processo parecem também estar envolvidas as células de revestimento ósseo adjacentes aos locais de reabsorção, sendo imprescindível também a presença de osteoclastos funcionantes ou não (quer através da síntese de factores parácrinos ou de contactos celulares).

Entretanto os pré-osteoblastos vão produzindo OPG (com grande afinidade para o RANKL) que ao ligar-se ao RANKL desactiva os osteoclastos, pondo termo à fase de reabsorção. Os osteoblastos entretanto diferenciados iniciam a formação e mineralização de novo tecido ósseo, completando-se, assim, o processo de *turnover* ósseo^{16,62}. Uma nota final para acentuar que os osteoclastos ocupam uma posição pivot nos processos de remodelação óssea e constituem de longe as células com maior responsabilidade no potencial dinâmico dos tecidos duros. [23,24,25].

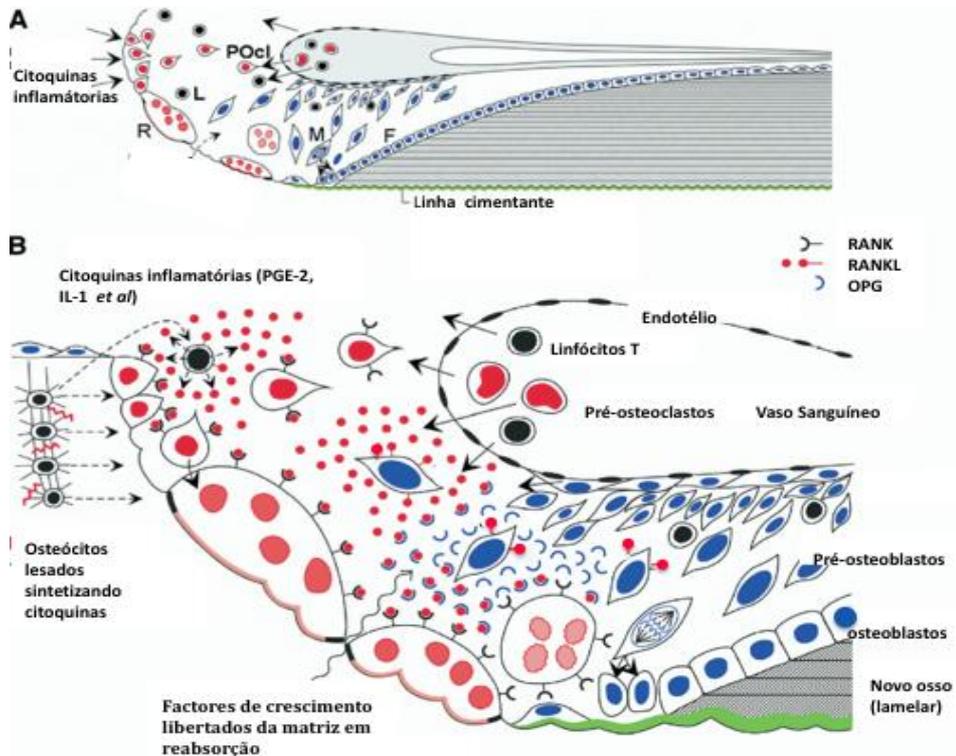


Figura 9. A) Hemi-corte de um cutting / filling cone ilustrado actividade celular associada ao processo de remodelação óssea; **B)** maior ampliação da frente de reabsorção do cutting / filling cone **A**, esquematizando o mecanismo molecular e celular envolvido na sequência de activação-reabsorção (R) formação (F) via RANKL/RANK/OPG. Linfócitos T (preto ⊙), células da linha osteoclástica (vermelho ⊙) e células da linha osteoblástica (azul ⊙). (Adaptado de Roberts WE, 2006⁶²).

Osteoimunologia - breves considerações

Tradicionalmente, o osteoblasto tem sido considerado uma “master cell” na regulação do processo de diferenciação, maturação e activação dos osteoclastos e, deste modo, no mecanismo de reabsorção óssea. Porém, a chegada de um cada vez maior número de informações e pesquisas (demonstrando a íntima e complexa inter-relação entre células ósseas e células

do sistema imunológico) leva-nos a repensar certos conceitos, já há muito estabelecidos, sobre os processos de regulação do *turnover* ósseo.

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

Com efeito, as células de natureza imunológica têm a sua origem em células tronco presentes na medula óssea desenvolvendo-se, portanto, no mesmo micro-ambiente que os osteoclastos. Assim sendo, o tecido ósseo parece ocupar uma posição crucial, podendo mesmo ser considerado como um órgão imunológico. De facto, Lorenzo et al [23] afirmam que a medula óssea pode ser encarada como um «*loosely compartmentalized lymphoid organ*», não sendo, pois, difícil de entender a estreita relação entre células ósseas e células imunitárias.

Assim, não será também de admirar que uma excessiva activação do sistema imunológico (como é o caso da artrite reumatóide) seja frequentemente acompanhado por uma perda de massa óssea, como

resultado de uma sobre-estimulação da diferenciação e actividade osteoclástica.

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

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

Nestes casos, o constante diálogo e comunicação entre os diferentes tipos de populações celulares envolvidos adquire especial significado, observando-se geralmente um desequilíbrio do eixo RANKL/RANK/OPG.

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

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

Em condições patológicas, as células T activadas expressam altos teores de RANKL (quer na forma transmembranar, quer solúvel), sendo capazes de induzir directamente (sem intervenção dos osteoblastos) os mecanismos de osteoclastogénese e de diferenciação osteoclástica.

Artrite reumatóide

Nos casos de artrite reumatóide (fig 10) observa-se uma forte participação dos linfócitos T no processo de formação dos osteoclastos, traduzindo uma contribuição determinante das células T para a perda da massa óssea e consequente deformação articular.

À primeira vista, parecerá paradoxal como è que as células *T helper CD4+* (*TH-cells*), células maioritariamente presentes nestas situações, ao produzirem IFN- γ e IL-4 (ambas moléculas com reconhecido efeito anti-osteoclastogénico) aceleravam a activação e formação de osteoclastos. Porém, foi recentemente identificado, dentro da população celular de linfócitos T, um subgrupo de *TH-cells* responsável pelos processos de reabsorção óssea, sendo designado por *TH-17 cells* (por constituírem *TH cells* que produzem interleucina 17 – IL-17). Esta interleucina induz nos fibroblastos sinoviais a produção de RANKL. A IL-17 estimula, também, nos macrófagos sinoviais a secreção de proteínas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6). Estas citocinas vão, por sua vez, activar os mecanismos osteoclastogénicos, quer actuando directamente nos precursores dos osteoclastos, quer indirectamente através dos fibroblastos sinoviais (estimulando a produção de RANKL). As *TH 17 cells* podem também exprimir RANKL (na sua forma transmembranar), contribuindo para um aumento ainda maior dos processos da osteoclastogénese.

Em síntese, pode actualmente considerar-se a artrite reumatóide como uma *RANKL disease*. [23,24,25,26,27].

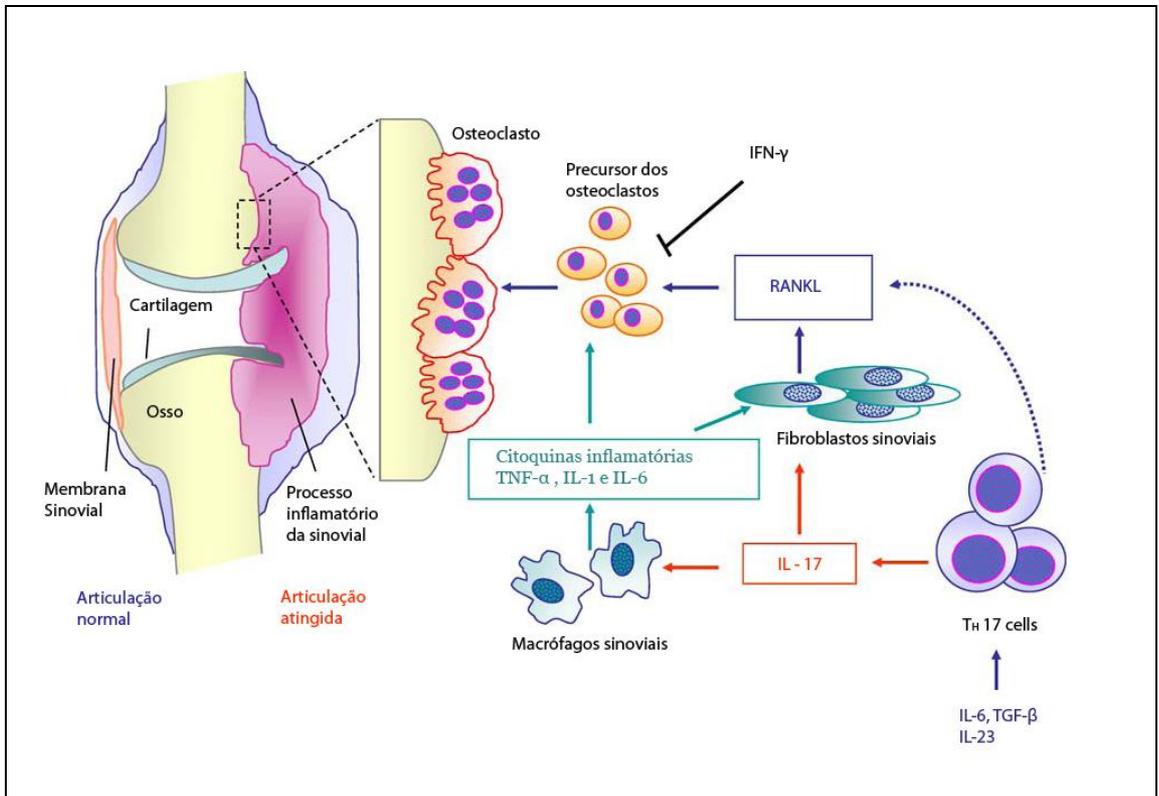


Figura 10. Faz uma síntese do mecanismo da destruição óssea associada à artrite reumatóide. A articulação atingida para além de macrófagos e fibroblastos sinoviais contém células T (*TH 17 cells*) com efeitos osteoclastogénicos devido à produção de grandes quantidades de IL-17. Esta interleucina induz nos fibroblastos sinoviais a produção de RANKL. A IL-17 estimula, também, nos macrófagos sinoviais a secreção de proteínas inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6). Estas citocinas vão, por sua vez, activar os mecanismos osteoclastogénicos, quer actuando directamente nos precursores dos osteoclastos, quer indirectamente através dos fibroblastos sinoviais (estimulando a produção de RANKL). As *TH 17 cells* podem também exprimir RANKL (na sua forma transmembranar), contribuindo para um aumento ainda maior dos processos da osteoclastogénese.

^

Osteoporose

A osteoporose constitui o maior problema de saúde pública para adultos saudáveis acima dos 55 anos de idade e uma em duas mulheres vão desenvolver uma fractura osteoporótica comparativamente com um em quatro homens. Sem uma estratégia interventiva é provável que o número de pessoas com osteoporose aumente 3 vezes nos próximos 25 anos devido ao envelhecimento da população [28].

A osteoporose é uma doença que para além de causar uma significativa perda da massa óssea e fracturas e conduz a dor severa, deformidades e nalguns casos complicações secundárias que resultam na morte (a sobrevivência após uma fractura da coluna vertebral ou do colo do fémur decresce em 20%) [28,29].

Esta doença é classificada clinicamente como sendo primária ou secundária. A osteoporose primária refere-se a uma perda de massa óssea na mulher pós-menopausica (tipo I) ou a perda de massa óssea devido ao processo de envelhecimento (tipo II, senil) nos homens idosos. Osteoporose secundária está relacionada com perdas de massa óssea como efeito secundário de outras doenças ou tratamentos farmacológicos.

A osteoporose pós-menopausica (tipo I) é a forma mais comum da doença e acredita-se que se inicia quando a produção de estrogénios se torna deficiente após a menopausa. A osteoporose senil é atribuída a processos de envelhecimento incluindo disfunção dos osteoblastos. [29,30].

Em 1998, o modelo de osteoporose tipo I/tipo II foi revisto e denominado «modelo unitário da osteoporose em mulheres pós-menopausicas e homens idosos». No modelo unitário, a deficiência de estrogénios é proposta como sendo a principal causa de perda de massa óssea em ambos os casos (homens idosos e mulheres pós-menopausicas) [30].

A perda de massa óssea resulta numa fragilidade que proporcionará fracturas ósseas sob o mínimo traumatismo nos ossos do punho, colo do fémur e vértebras [29].

Para o diagnóstico actual da doença recorre-se ao uso de DEXA para quantificar a densidade óssea como preditor da probabilidade de fractura. No entanto, estas técnicas são insuficientes porque modificações na massa óssea não explicam sozinhas a susceptibilidade a fracturas ósseas. Torna-se agora claro que outras características da qualidade óssea, incluindo propriedades e composição do tecido ósseo, micro-arquitectura e micro-dano também influenciam a susceptibilidade a fracturas, estando em curso investigações para determinar a sua contribuição precisa.

A terapêutica hormonal de substituição e agentes anti-reabsortivos (como bifosfonatos, calcitonina, reguladores selectivos da actividade dos estrogéneos) são tratamentos correntes para a perda de massa óssea. O seu principal objectivo é reduzir a incidência de fracturas, inibindo a reabsorção pelos osteoclastos e mantendo a massa óssea. No entanto, mesmo com o uso continuado, estes medicamentos só reduzem a propensão para fractura para cerca de 50%, sugerindo que a qualidade do tecido ósseo restante possa estar comprometida.

Os medicamentos mais recentemente desenvolvidos, incluem a PTH (hormona paratiróide), alendronato, ciclosporina A e ralenato de estrôncio, têm um efeito anabólico no tecido ósseo, promovendo deste modo a formação de novo tecido ósseo. No entanto continuam a reduzir o risco de fracturas em apenas 40%. Porém, mesmo com estes medicamentos, a qualidade de vida não pode ser completamente recuperada porque 50% experienciam incapacidade e 75% nunca recuperam o mesmo nível de independência que tinham antes de sofrerem uma fractura osteoporótica. [29]

Devido à elevada prevalência e inexactidão de técnicas diagnosticas e terapêuticas, muita investigação tem sido feita nas áreas da biomecânica e da biologia celular e molecular. A exposição que se segue tem como objectivos:

a) apresentar uma visão interdisciplinar dos mecanismos que conduzem à perda de massa óssea e fracturas osteoporóticas, à luz dos conhecimentos

actuais e b) referir as propostas terapêuticas da biologia molecular para o tratamento da osteoporose, baseadas em alvos moleculares.

Resistência do tecido ósseo durante a Osteoporose

A principal preocupação com a osteoporose reside no facto das propriedades mecânicas do tecido ósseo ficarem de tal forma comprometidas que as fracturas ocorrem sob circunstâncias de carga normais, o que não se verifica nos tecidos ósseos saudáveis. Na osteoporose verifica-se uma redução na resistência ao stress máximo, no módulo elástico máximo na força compressiva máxima e na resistência à torção.

As propriedades biomecânicas do tecido ósseo dependem da quantidade e qualidade de massa óssea, baseada na: 1) morfologia; 2) micro-arquitectura; 3) composição; 4) grau de micro-dano.

Densidade óssea:

O diagnóstico da osteoporose fundamenta-se numa avaliação da massa óssea inferior em 2,5 desvios-padrão relativamente à curva que define a massa óssea do adulto jovem. A densitometria óssea é um mau preditor do risco de fractura, uma vez que a redução de massa óssea não explica completamente o risco de fractura, por exemplo, apenas 10 a 53% das fracturas ósseas que

ocorrem nas mulheres pós-menopausicas, acima dos 65 anos, podem ser atribuídas exclusivamente a uma diminuição da massa óssea.

Micro-arquitectura e morfologia ósseas:

Foi demonstrado que, no aparecimento da osteoporose pós-menopausica ocorre um adelgaçamento trabecular, aprofundamento das cavidades de reabsorção, acumulação de micro-fracturas e perda de conectividade trabecular. A micro-arquitectura é, de forma estatisticamente significativa, mais anisotrópica que o normal, apresentando menos trabéculas transversas relativamente ao eixo primário de carga. Também há evidência de um aumento da porosidade e adelgaçamento do tecido ósseo cortical do colo do fémur osteoporótico (Bell et al.1999[31], Crabtree e tal 2001[32]).

Até recentemente, pensava-se que a perda de massa óssea ocorresse ao longo da arquitectura trabecular de uma forma uniforme e irreversível. Dados recentes, obtidos por micro-CT desafiam estas premissas: em ratos OVX, Waarsing et al.(2004,2006[33]) descobriram que após o adelgaçamento trabecular inicial, as trabéculas restantes subsequentemente aumentam lentamente de espessura. Efectivamente verificaram que determinadas trabéculas são preservadas e aumentam de espessura ou fundem-se com outras. Aplicando esta técnica, houve uma melhoria na acuidade diagnóstica na predição do risco de fracturas de cerca de 13% nos modelos,

comparativamente ao uso da densitometria óssea isoladamente. Esta melhoria resultou do facto de terem sido incluídos parâmetros da micro-arquitectura trabecular, como aumento das cavidades de reabsorção, adelgaçamento e perda da conectividade trabecular.

A geometria do colo do fémur, em corte transversal, está alterada durante a osteoporose para compensar a perda de massa óssea (Cordey e tal 1992[34];Jiang e tal. 2008[35]). Um estudo independente refere que uma perda acentuada do osso cortical modifica dramaticamente a conformação e dimensões do canal medular do fémur, enquanto pequenas ou nenhuma alterações ocorrem na metáfise ou dimensões externas do fémur (El-Zaim et. al 2007[36]).

Com base nestes estudos, pensa-se que as fracturas osteoporóticas ocorrem quando a degradação simultânea da densidade óssea e da micro-arquitectura reduz a resistência do osso abaixo de cargas fisiológicas normais. Desconhece-se se estas modificações ocorrem apenas como resultado directo e/ou indirecto da deficiência de estrogénios. [29]

Modificações nas propriedades do tecido ósseo e sua composição durante a osteoporose.

Enquanto que a perda de massa óssea e alterações da arquitectura têm sido extensivamente estudadas e caracterizadas, é menos evidente de que forma a composição do tecido ósseo se modifica no progredir da doença [29].

As propriedades mecânicas do tecido ósseo são determinadas pela quantidade, integridade e organização estrutural de cada uma das fases que o compõem e a interacção física entre elas. Como já foi referido noutra secção, a fase mineral, constituída principalmente por cálcio e fósforo sob a forma de cristais de hidroxiapatite, confere rigidez e a fase orgânica, constituída por colagéneo, proteínas não colagénicas e células, que confere elasticidade. [29].

Durante a deficiência de estrogénios ocorre uma diminuição de densidade e massa ósseas com perda de resistência às forças aplicadas e simultaneamente um aumento do módulo elástico, ou seja, da plasticidade/elasticidade da fase orgânica do tecido ósseo de 40 a 90 %.

Estas alterações do tecido ósseo sugerem que a osteoporose pode induzir modificações nos constituintes primários do tecido ósseo, nomeadamente no colagéneo, proteínas não colagénicas e fase mineral.

Colagénio:

O colagénio mais abundante no tecido ósseo é o colagénio do tipo I mas os tipos III, IV e VI também estão presentes.

Estão descritas várias alterações na composição do colagénio relacionadas com o aparecimento da osteoporose : um estudo recente sugere haver um aumento na síntese de colagénio do tipo I e estudos prévios descreviam uma redução na produção de colagénio de tipo IV e III. Ocorre acessoriamente um aumento da hidroxilação de resíduos de lisina, o que modula a natureza das pontes cruzadas de colagénio que se formam extracelularmente.

Efectivamente, foram descritas diminuições no teor de cetoimina, piridínio, aldimina e ligações pirrólicas no osso osteoporótico. Curiosamente, estas modificações estavam inversamente correlacionadas com o volume de tecido ósseo e tinham maior prevalência, no colo do fémur, um dos locais de elevada susceptibilidade a fracturas (Bailey et al. 1993)[37]. Estes autores afirmam que este tipo de modificações aumenta a susceptibilidade a fracturas por alterarem a resistência da rede de colagénio ou a mineralização normal da matriz, uma vez que o colagénio funciona como uma armação para os minerais ósseos.

Proteínas não colagénicas:

As proteínas não colagénicas são predominantemente osteopontina, osteocalcina, fosfatase alcalina e sialoproteína óssea (tal como já foi referido em secção prévia), desempenhando funções essenciais na organização da matriz e como locais de nucleação de cristais de mineral na matriz orgânica,

uma vez que promovem a formação de cristais, ligam os cristais de mineral à matriz de colagénio e facilitam a ligação de células.

Há evidência limitada e controversia quanto às alterações nestas proteínas durante a osteoporose, estando contudo estabelecido que o número de osteócitos que expressam osteopontina, aumentam nos tecidos ósseos que tendem a ter elevada reabsorção óssea após ovariectomia (Ikeda et.al 1996).[38]

Fase mineral:

Os estudos existentes apresentam resultados contraditórios quanto ao teor mineral e dimensões dos cristais do tecido osteoporótico [29]

Micro-dano ósseo (micro-damage)

O micro-dano é reconhecido, desde longa data, como um determinante -chave na resistência óssea (Burr et. al 1998)[39]. Também se acredita que a reabsorção de tecido ósseo envelhecido pelos osteoclastos, durante a remodelação fisiológica, impede a acumulação de micro-dano e resultante manutenção da resistência do osso.

Existe alguma evidência que a extensão de micro-dano está aumentada na deficiência de estrogénios (Dai e tal. 2004)[40]. Este dano pode ter-se acumulado como resultado de modificações na mineralização do tecido ósseo (Mc Namara et al. 2006)[41]. Tais alterações poderão reduzir a resistência à iniciação e propagação de fractura do tecido ósseo (Schaffler 2003).[42]

Complementarmente ou alternativamente, o tecido ósseo pode ser mais susceptível ao dano após a perda óssea, uma vez que o tecido remanescente terá de suportar uma carga superior à que teria em situação normal. Desconhece-se se este tipo de dano é suficiente para provocar por si só uma deterioração do comportamento mecânico do tecido ósseo até o predispor à falência. Além disso, o aumento da remodelação óssea também pode ser atribuído a uma aceleração da remoção de tecido ósseo danificado (Burr et. al. 1997)[43] e neste sentido, o aumento de dano terá um papel primordial na perda óssea e fractura subsequente.

Estudos de biologia molecular e celular são necessários para provar em definitivo se há um aumento da reparação do micro - dano durante a osteoporose. (Sabemos que há aumento do micro-dano mas não sabemos se e como afecta a dinâmica de remodelação do tecido ósseo).

Fisiologia do tecido ósseo durante a osteoporose

Na remodelação normal verifica-se que a formação e reabsorção ósseas são equivalentes, ou seja, as quantidades removidas e depositadas de osso são semelhantes. A maior modificação na remodelação óssea ocorre na menopausa, quando há um aumento do número de cavidades de reabsorção mas a formação de tecido ósseo não aumenta proporcionalmente e as cavidades de reabsorção não são completamente preenchidas com novo tecido ósseo e disto resulta uma perda permanente da massa óssea.

A diferença é maior nos primeiros 5 anos após a menopausa e coincide com uma elevação de citoquinas. [28]

O balanço negativo de cálcio ósseo total é cerca de 100mg/dia durante os primeiros 3 anos e torna-se menor após cerca de 5 anos, sendo em média 30 mg/dia.

A fase em que a perda óssea é mais acentuada envolve principalmente o osso trabecular. A fase mais lenta de perda de osso afecta simultaneamente os tecidos ósseo trabecular e cortical. [30].

Osteoclastos e progenitores hematopoiéticos

O estrogénio tem um efeito inibitório sobre a maturação dos osteoclastos (Oursler e tal. 1991) e aumenta a sua apoptose (Hughes e tal. 1996)[45], actuando através dos receptores dos estrogénios dos osteoclastos (ER α e β).

Quando há défice de estrogénio plasmático, há um aumento do número de progenitores hematopoiéticos (Jilka et al. 1992, 1995)[45], desta forma proporcionando um maior número de potenciais precursores de osteoclastos que podem ser recrutados e levar a um aumento do número de osteoclastos maduros (Jilka et. al. 1992; 1995[46]; Brockstedt et al. 1993 [47]; Rosen 2000)[48]. Adicionalmente, a apoptose dos osteoclastos está diminuída. A conjugação destes eventos conduzirá a uma reabsorção prolongada, aumento da profundidade de cavidades de reabsorção e perfuração trabecular (Bell et al. 1996)[49]. As trabéculas perfuradas são removidas por remodelação posterior e dessa forma, a perda de massa óssea aumenta a fragilidade dos ossos, resultando numa maior propensão para fractura. [29]

Apesar dos osteoclastos serem o alvo preferencial da maioria das terapêuticas actuais, a inibição da actividade osteoclástica isoladamente não impede a ocorrência de fracturas osteoporóticas.

Um estudo recente decreve que o estrogénio inibe a formação de osteoclastos *in vitro* quando em co-cultura com células da linhagem osteoblástica, mas o mesmo não acontecia quando os precursores dos osteoclastos estavam

sozinhos em cultura (Michael et al.2005). Este estudo sugere, pois, fortemente que a regulação da actividade osteoclástica por estrogénio depende de células da linhagem osteoblástica (Michael et al. 2005) [50] e por esse motivo, estas assumem um papel central na osteoporose. [29].

Células da linhagem osteoblástica

Osteoblastos e osteócitos também possuem receptores de estrogénio (Braidman et al. 2001) [51]. Evidência sugere que o estrogénio medeia a resposta normal de osteoblastos e osteócitos à aplicação de carga (Lanyon 1996) [52] e que as células da linhagem osteoblástica apresentam respostas deficientes a estímulos mecânicos *in vitro* quando privadas de estrogénio (Sterck et al 1998 [53]; Jessop et al 2004).[54]

A deficiência em estrogénio induz apoptose de osteócitos (Tomkinson et al. 1997[55]; Kousteni et al. 2001)[56], o que por sua vez pode resultar em hipermineralização do tecido envolvente (Frost 1960[57]; Kingsmill & Boyde 1998[58]; Boyde 2003)[59]. Adicionalmente, verifica-se uma alteração da rede de osteócitos (Knothe Tate et al 2004)[60] e a densidade de osteócitos está aumentada no osso pós-menopáusico, o que pode significar que os osteoblastos produzem menos tecido ósseo por célula durante a osteoporose (Mullender et al. 1996)[61]. Em conjunto, estas características podem

modificar a sensibilidade e resposta mecânica do tecido (Tatsumi et al. 2007).[62]

Sinalização molecular na osteoporose

O estrogénio apresenta acções esqueléticas e extra-esqueléticas, que, em caso de deficiência, contribuem para a patogénese da osteoporose. Estes efeitos podem ser directos ou indirectos. São directos se actuam nos receptores de estrogénios das células da linhagem osteoblástica e osteoclástica e têm actividade indirecta quando mediados por receptores de estrogénio em vários tipos de células que influenciam a homeostase óssea, como células do estroma que sobreactivam a OPG sob o efeito de estrogénios e células do sistema imunitário. [30].

A deficiência em estrogénios pós-menopausica conduz à sobrerregulação do RANKL nas células da medula óssea, facto que é um determinante fundamental na reabsorção óssea, enquanto que o estrogénio estimula directamente a produção de OPG pelos osteoblastos, tendo dessa forma efeitos anti-reabsortivos no tecido ósseo. [30].

Os efeitos extra-esqueléticos são principalmente decorrentes do aumento da excreção renal do cálcio e de uma diminuição da absorção do cálcio. Simultaneamente a este défice, ocorre um aumento sérico da PTH. Este

hiperparatiroidismo secundário é por um lado um mecanismo compensatório para perdas de cálcio no envelhecimento e por outro lado resulta do facto do estrogénio ter um efeito inibidor directo sobre a glândula paratiróide. Adicionalmente, a deficiência em estrogénios aumenta a sensibilidade do osso à PTH. Outros mecanismos envolvidos na absorção intestinal insuficiente do cálcio nos idosos são o défice de vitamina D, redução no metabolismo da vitamina D para a sua forma activa e a redução nos receptores intestinais de vitamina D. Ocorre um aumento dos níveis de vitamina D séricos e da absorção do cálcio nas mulheres pós-menopausicas que tomam estrogénios. [30].

Os efeitos indirectos principais dos estrogénios ou deficiência de estrogénios são mediados por células do sistema imunitário, sendo estudados pela osteoimunologia , abordada em capítulo próprio. [30]

Desde 1989 que se conhecem algumas correlações entre tratamento estrogénico e libertação sistémica de citocinas., sendo entretanto reconhecido o envolvimento de várias citocinas e outros mediadores inflamatórios, como as interleucinas IL-1, IL-6, TNF α e prostaglandina E2 na patogénese da osteoporose, apesar da maioria desses estudos se concentrarem nos efeitos destes mediadores na osteoclastogénese.

Desde o final da década de 1980 é reconhecido também que o tratamento estrogénico aumenta a produção de IGF-1 (Insulin- like growth factor – 1) e TGF- β (Transforming growth factor β) pelas células da linhagem osteoblástica.

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

Foi demonstrado que a ablação de estrogénios resulta num aumento de IL-7, o que conduz à activação das células T, o que por sua vez leva a um aumento da produção de IFN- γ e TNF- α pelas células T.

Uma das principais acções do IFN- γ é a sobre-regulação do complexo major de histocompatibilidade (MHC) tipo II nas células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos da medula óssea e as células dendríticas. Isto conduz a um aumento da activação das células T, que vão produzir ainda mais RANKL e TNF- α , ambas citocinas com actividade osteoclastogénica marcada. [30]

Os efeitos do IFN- γ no metabolismo ósseo são complexos: IFN- γ age como citocina pró-osteoclastogénica no contexto de ovariectomia, enquanto que é anti-osteoclastogénica em situações normais.

O «*Inflammaging*» é específico do género: nas mulheres idosas as células T produzem mais IFN- γ comparativamente com as mulheres mais jovens, enquanto que o envelhecimento dos homens não tem efeito na produção de IFN- γ . De forma similar ao que acontece com o IFN- γ , as células T também podem ter um efeito fortemente protector do tecido ósseo, através da interacção com as células B, envolvendo a co-estimulação com os ligandos CD40-CD40, o que resulta numa activação da produção de OPG pelos linfócitos B. [30]

Inflamação e acumulação de radicais oxidativos aparecem associados [30,63], sendo características comuns ao envelhecimento do organismo. Foi demonstrado que em ratos ovariectomizados, a deficiência em estrogénios também causa a acumulação de espécies reactivas de oxigénio na medula óssea, conduzindo a um estado pró-inflamatório causado por um aumento da produção de TNF- α por células T activadas através da sobre-regulação da molécula co-estimulatória CD80 nas células dendríticas. Nesta experiência era possível impedir a perda de massa óssea nas cobaias através do tratamento com antioxidantes ou CTLA4-Ig, que é um inibidor da via CD80/CD28 de co-estimulação. Estas observações confirmam que a ovariectomia aumenta 5 vezes o potencial de apresentação de antígeno por células dendríticas, enquanto que este incremento nos macrófagos medulares é de cerca de 2 vezes. [30]

Sequência de eventos na cascata da perda de massa óssea – hipóteses explicativas para um ciclo vicioso

O autor L.M Namara apresenta 2 hipóteses explicativas para a sequência de eventos que levam à perda de massa óssea e à osteoporose

- 1. Efeito promotor da actividade dos osteoclastos (devido ao défice de estrogénios) no desencadear de toda a cascata de eventos na osteoporose :** as moléculas que promovem a actividade dos osteoclastos estão *upregulated* (M-CSF, RANKL, TNF- α , interleucinas) durante o défice de estrogénios, enquanto que as que inibem os osteoclastos estão *downregulated* (OPG, TGF- β). Desta forma, há um aumento da osteoclastogénese e redução da apoptose dos osteoclastos conduzindo a uma reabsorção óssea mais profunda e mais duradoira. Estes aspectos aceleram redução de massa óssea.

Mais tarde, devido à perda de massa óssea, como resposta secundária, os osteócitos ficam sujeitos a cargas mais elevadas, conduzindo a modificações complexas no comportamento dos osteoblastos, composição do tecido e ocorrência de micro-dano: a perda de massa óssea poderia iniciar uma resposta adaptativa onde os osteoblastos e osteócitos alteram a

composição local do tecido (fase mineral e orgânica, principalmente não colagénica) e as propriedades do tecido ósseo remanescente.

Simultaneamente, cristais minerais maiores ou mais numerosos podem dissociar as ligações cruzadas de colagénio ou impedir a formação de pontes cruzadas maduras (Otsubo et al. 1992).

Dano pode acumular-se no tecido como resultado da natureza cada vez mais quebradiça do tecido ou/e do aumento de carga.

A combinação destes acontecimentos vai aumentar a susceptibilidade à fractura do tecido ósseo.

Apesar de existir evidência suficiente para suportar esta sequência de acontecimentos, ainda não está estabelecido se as modificações na composição dos tecidos são realmente uma resposta secundária à perda de massa óssea. Além disso, sabe-se que a supressão da reabsorção osteoclástica não impede a ocorrência de fracturas, o que sugere que a actividade osteoclástica pode não ser a causa primária da cascata de perda de massa óssea.

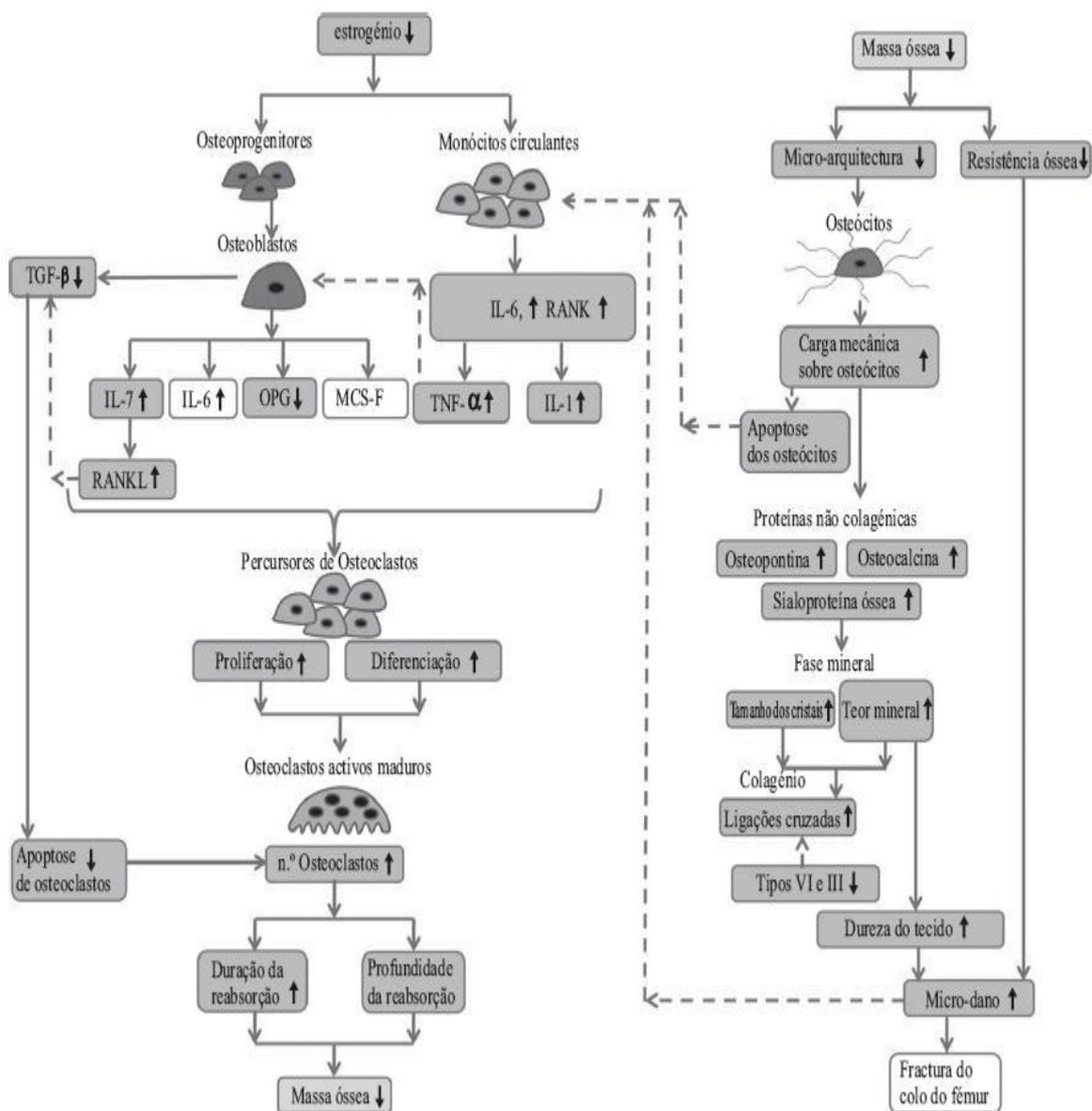


Figura 11. Efeito promotor da actividade dos osteoblastos no desencadear de toda a cascata de eventos na osteoporose (devido ao défice de estrogénios) (coluna à esq):moléculas que promovem a actividade dos osteoclastos upregulated (M-CSF,RANKL,TNF- α , ILs) e as que inibem os osteoclastos downregulated (OPG TGF- β).Por este motivo há um aumento da osteoclastogénese e uma excessiva reabsorção óssea,que conduz à perda de massa óssea.(coluna à direita).Devido à perda de massa óssea, ocorre um aumento da carga mecânica sobre o tecido ósseo remanescente. Isto levará a um aumento da mineralização para compensar a perda de tecido ósseo.

Finalmente, um aumento da mineralização pode dissociar ligações entre as proteínas colagénicas e não colagénicas e conduzir à acumulação de dano e finalmente à fractura óssea

Mecanismos de retro-controlo estão indicados por linhas a tracejado.

Rectângulos brancos e cinzentos, evidências experimentais, respectivamente *in vitro* e em modelos ovariectomizados (OVX).

Adaptado de artigo 29.

2. Efeito promotor na actividade dos osteoblastos (devido ao défice de estrogénios) no desencadear de toda a cascata de eventos na osteoporose

Os estrogénios, através dos receptores nos osteoblastos são capazes de modular a actividade destas células na produção, organização e regulação da matriz óssea. Ocorrendo inicialmente, devido ao défice de estrogénios, uma inibição da osteoblastogénese e dos genes responsáveis pela maturação dos osteoblastos e pela produção de reguladores da mineralização e produção de proteínas não colagénicas *in vitro*. Daí resultaria, conseqüentemente, uma diminuição da produção de IGF-I e TGF- β .

Devido a estas proteínas serem reguladoras da matriz de colagénio e da produção de proteínas não colagénicas é expectável que se repercutissem em modificações em ambos os componentes do tecido ósseo. Isto faria,

desta forma aumentar o módulo elástico da componente orgânica do tecido ósseo (Mc Namara et al. 2006).

Assim, a perda de massa óssea será uma resposta secundária a modificações na resistência do tecido: inicialmente a capacidade de deformação da matriz óssea estaria reduzida sob carga normal e isto por sua vez poderia iniciar uma resposta reabsortiva osteoclástica a uma carga fisiológica como resultado do micro-dano por ela causado.

Um aumento nas dimensões dos cristais de hidroxiapatite pode dissociar as pontes cruzadas de colagénio e conduzir a um aumento da acumulação de micro-dano e a conjugação destes eventos culminar em fracturas ósseas.

Evidências experimentais a suportar esta hipótese são limitadas, mas modelos computacionais aplicados a modelos de mecanorregulação predizem que : 1º osteócitos localizados num tecido mais quebradiço estão sujeitos a níveis tensionais inferiores e iniciam reabsorção conduzindo a perfuração trabecular (Mulvihill et al. 2008) e 2º, quando o tecido ósseo se torna mais quebradiço, ocorre uma adaptação da estrutura para adquirir uma diminuição da massa óssea e aumenta a anisotropia de forma semelhante ao tecido ósseo osteoporótico (van der Linden et al. 2004).

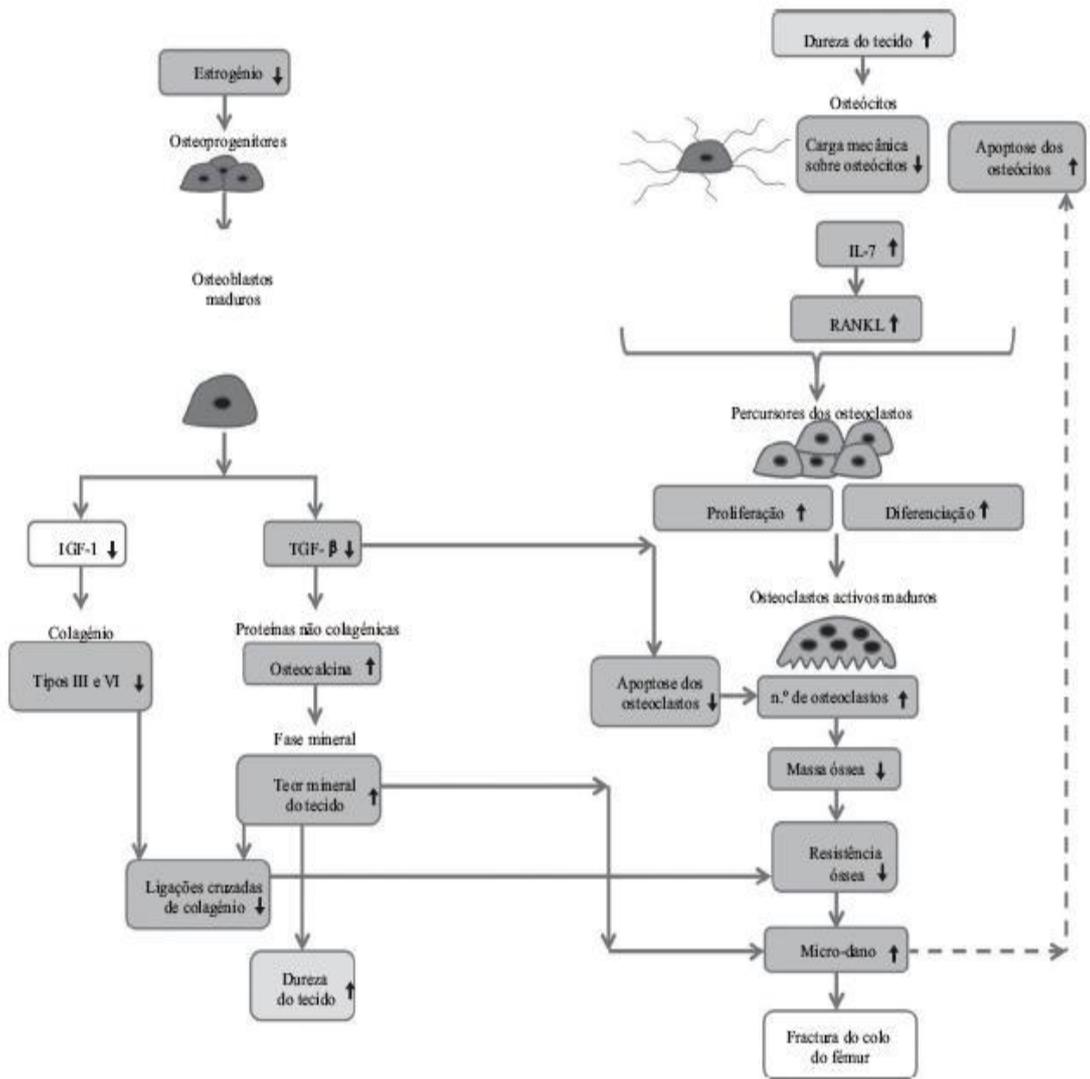


Figura 12. Efeito promotor na actividade dos osteoblastos no desencadear de toda a cascata de eventos na osteoporose (devido ao défice de estrogénios): (coluna à esquerda). A falta de estimulação estrogénica na linhagem osteoblástica inibe a osteoblastogénese e altera a função dos osteoblastos, que modificam a sua actividade produzindo menos IGF-1 e TGF- β . Disto resulta uma diminuição na produção de colagénio dos tipos III e VI e aumento de proteínas não colagénicas como a osteocalcina. Como consequência das alterações nos componentes do tecido ósseo, ocorrem modificações: a) na «armadura» orgânica do tecido ósseo, diminuindo a sua elasticidade/módulo elástico (deixa de se deformar para

absorver a energia das cargas aplicadas) e daí haver uma diminuição da resistência óssea à aplicação de carga e fractura/micro-fractura porque não tem meios de dissipar a energia transitoriamente). B) na mineralização do tecido, aumentando o teor mineral, o que por sua vez aumenta a dureza do tecido.

Finalmente, como consequência do aumento da dureza do tecido, baixa carga mecânica sobre os osteócitos é suficiente para lesar os canaliculos que contêm os seus prolongamentos citoplasmáticos e desta forma lhes causar apoptose (que, desta forma, aparece aumentada). A apoptose dos osteócitos desencadeia uma resposta reabsortiva osteoclástica, com remoção do tecido ósseo, isto levará à diminuição da massa óssea e consequentemente da resistência óssea acumulando-se cada vez mais micro-dano até culminar em fracturas.

Mecanismos de retro-controlo estão indicados por linhas a tracejado. Rectângulos brancos e cinzentos, evidências experimentais, respectivamente in vitro e em modelos ovariectomizados (OVX).

Adaptado de artigo 29.

São necessários estudos experimentais: a) para averiguar se alguma destas sequências corresponde à sequência de eventos que conduz à osteoporose; b) compreender os efeitos destas alterações do tecido ósseo na dinâmica e remodelação e da remodelação nas alterações do tecido ósseo. Este tipo de investigações podem revelar-se úteis no estabelecimento de novos alvos terapêuticos.

Tratamento da osteoporose

Até há pouco tempo, a prevenção e tratamento da perda de massa óssea estava completamente dependente do uso de medicamentos que inibem a reabsorção óssea, um mecanismo que não consegue recuperar a massa nem a estrutura óssea que foram perdidas.[28]

Aliás, o uso de tratamentos anti-reabsortivos de forma continuada leva a uma supressão da remodelação prolongada, causando uma acumulação do micro-dano, fractura e redução da regeneração óssea. [7].

Avanços recentes na biologia óssea identificaram várias moléculas envolvidas no processo de reabsorção e formação ósseas que conduzirão a novos tratamentos para a osteoporose, que estão neste momento a ser submetidos a ensaios clínicos. Faremos também uma referência a terapêuticas de uso corrente e a possíveis alvos moleculares futuros.

1. Terapêuticas estabelecidas

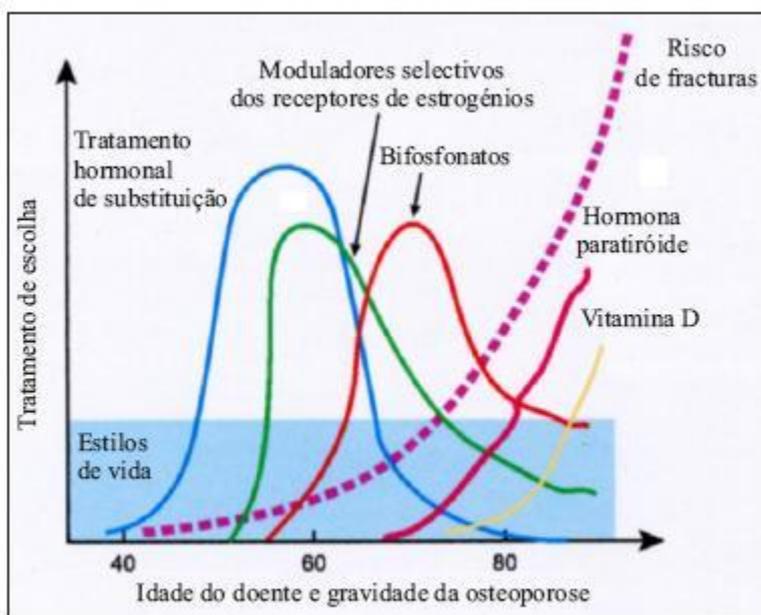


Figura 13. A prevenção e tratamento da osteoporose (da infância à 3ª idade) deve basear-se em estilos de vida saudáveis (ingestão adequada de cálcio, actividade física regular, evicção tabágica e do consumo excessivo de álcool). A suplementação de vitamina D é essencial nos idosos. Escolhas de outras medicações mais específicas dependem principalmente da idade dos doentes e gravidade da osteoporose (correlacionada com a linha a tracejado: risco de fractura). Adaptada de artigo 64.

1.1 Agentes anti-reabsortivos

A maioria dos agentes anti-reabsortivos disponíveis hoje também inibem a formação de tecido ósseo ao fim de vários meses e este facto limita o efeito de aumento da massa óssea.

(1). Terapêutica estrogénica e SERMS (Selective Estrogen Receptor Modulators) – moduladores selectivos dos receptores de estrogénios; têm

benefício comprovado prevenção da perda de massa óssea e fracturas com ou sem osteoporose estabelecida.

Os seus efeitos sobre os receptores de estrogénios (presentes nas células das linhagens monocitária e osteoblástica) conduzem a uma redução na expressão de RANKL e a um aumento a secreção de OPG. Também suprime a produção de IL-1, IL-6, IL-7 e TNF- α e aumenta a produção de IGF-1 e TGF- β nos osteoblastos.

A maior limitação a este tratamento reside nos seus efeitos adversos, principalmente em mulheres idosas, sendo no entanto, uma terapêutica muito eficaz na prevenção e tratamento da osteoporose pós-menopáusicas.

(3) calcitonina: suprime directamente a função osteoclástica, ligando-se ao receptor de calcitonina dos osteoclastos . Devido à relativamente fraca potência da calcitonina, esta está reservada só para o tratamento da osteoporose em mulheres com mais de 5 anos de menopausa e que não podem tomar outras medicações ou em homens idosos com ligeira perda de massa óssea.

Num grande estudo envolvendo 1255 mulheres pós-menopausicas com osteoporose estabelecida, o spray nasal de calcitonina teve uma redução

significativa no risco de fracturas vertebrais em 33%, o efeito em fracturas vertebrais não foi significativo.

(4)bifosfonatos: São actualmente os medicamentos de escolha para a prevenção e tratamento da osteoporose. Reduzem o risco de fractura vertebral em 50 a 60%.

Os bifosfonatos ligam-se à hidroxiapatite no tecido ósseo e entram no osteoclasto quando se dá a reabsorção óssea.

Os bifosfonatos sem um átomo de azoto na molécula (etidronato, clodronato, tiludronato) são incorporados no ATP e causam apoptose dos osteoclastos, enquanto que os bifosfonatos com um átomo de nitrogénio na molécula (pamidronato, alendronato, ibandronato, risedronato, zolendronato) modificam o citosqueleto dos osteoclastos e diminuem a sua actividade. [64, 28, 65]

1.2. Agentes anabólicos

(1). PTH (hormona paratiróide).

Sumarizando e reforçando o que já foi dito em capítulo precedente, a PTH tem um papel fundamental na homeostase do cálcio e na remodelação óssea. A acção da PTH no tecido ósseo depende da duração de administração:

Níveis séricos de PTH, cronicamente elevados, causam um aumento da reabsorção ao estimularem a produção de RANKL nas células da linhagem osteoblástica

Se forem administrados pequenos bólus intermitentes de PTH verifica-se um efeito anabólico, apesar do aumento na reabsorção óssea.

Por outro lado, a PTH diminui a apoptose dos osteoblastos no tecido ósseo cortical e aumenta a sobrevivência e diferenciação dos osteoblastos e pré-osteoblastos no perióstio. A PTH reduz, ainda, a produção de esclerostina pelos osteócitos, permitindo assim a diferenciação e prolongamento da sobrevivência dos osteoblastos.

Num ensaio clínico com PTH-34 envolvendo cerca de 1600 mulheres osteoporóticas, a incidência de fracturas vertebrais reduziu-se em 65% e fracturas não vertebrais em 35% com a dose de 20 microgramas.

O PTHrP (Parathyroid hormone related peptide), descoberta como sendo causador da hipercalcémia que se verifica em processos neoplásicos, tem uma semelhança estrutural com a PTH, compartilhando o mesmo receptor que a

referida hormona. Assim, será possível que a sua utilização venha a ser desenvolvida como arma terapêutica contra a osteoporose nos próximos anos.

Uma alternativa à administração de PTH, para obtenção de picos plasmáticos transitórios, é a utilização de agentes calcilíticos ou calcimiméticos.

Outros análogos da PTH estão a ser desenvolvidos para otimizar a acção anabólica da PTH reduzindo a reabsorção óssea. Por outro lado, estão em curso pesquisas e estratégias de selecção visando formas de curta semi-vida e elevados níveis de PTH e PTHrP apenas nas regiões-alvo por curtos períodos de tempo.

(2)Ranelato de estrôncio: é um agente oral que reduz a absorção óssea e pode aumentar a formação de tecido ósseo. É incorporado nos cristais de hidroxiapatite, sendo que o átomo de estrôncio substitui um átomo de cálcio.

A investigação básica tem demonstrado que o estrôncio inibe a acção dos osteoclastos através de um efeito na alteração da sua sensibilidade ao cálcio causando a sua apoptose. Em culturas celulares verifica-se que, aumenta a proliferação dos osteoblastos, a expressão de fosfatase alcalina e a síntese de colagénio, mostrando assim um efeito anabólico. [28].

Num ensaio clínico de fase 3 envolvendo 1649 e 5092 mulheres pós - menopáusicas, o ranelato de estrôncio 2g/dia reduz o risco de novas fracturas vertebrais em cerca de 50% e 39% respectivamente. [28].

2. Novos tratamentos para a osteoporose

2.1 agentes anti-reabsortivos

(1) Inibidores da catepsina K

A catepsina K é uma protease de cisteína que é expressa selectivamente por osteoclastos e conduz à degradação de proteínas da matriz óssea. Uma deficiência na matriz óssea de catepsina K resulta em situações de Picnodisostose humana, caracterizadas por uma osteosclerose e redução na reabsorção óssea.

O Adanacatib, um inibidor selectivo da catepsina K (avaliado durante 2 anos com dose única semanal) em cerca de 400 mulheres pós-menopausicas com osteopenia/osteoporose, levou a um aumento dose-dependente na massa óssea das vértebras (5,5%) e

colo do fémur (3,2%) e diminuição dos marcadores de reabsorção óssea (NTx/Cr urinário e CTx sérico). Neste estudo não ocorreram reacções adversas significativas.

(2) Denosumab

O Denosumab é um anticorpo monoclonal contra o RANKL que bloqueia a activação dos osteoclastos, desta forma sendo um potente inibidor da reabsorção óssea.

Pode também ser usado para diminuir a reabsorção óssea na artrite reumatóide e no cancro, uma vez que é a causa principal para o aumento da reabsorção óssea em ambos os casos. Resultados preliminares em doentes com cancro da próstata ou cancro da mama são muito promissores.

Estudos clínicos recentes envolvendo 7868 mulheres osteoporóticas tratadas cada 6 meses com 1 administração subcutânea de Denosumab 60 mg, demonstraram uma redução de novas fracturas vertebrais (por controlo radiográfico) em 68%, fracturas do colo do fémur em 40%, fracturas não vertebrais em 20%. Não houve diferenças significativas na incidência de reacções adversas comparativamente ao placebo, exceptuando num ligeiro aumento de infecções da pele, incluindo celulite.

(3) Osteoprotegerina (OPG)

A ligação da OPG com o RANKL impede a sua ligação ao RANK e desta forma a activação dos osteoclastos, podendo ser considerado um anticorpo natural para o RANKL.

Num ensaio clínico de fase 1, envolvendo 52 mulheres saudáveis pós-menopáusicas (idade 40 a 70 anos), havia uma diminuição do marcador urinário de reabsorção (NTx) por acção da OPG cerca de 80% no 4º dia após dose única e o efeito gradualmente decrescia para 17% depois de 6 semanas de seguimento. No entanto, verificou-se o aparecimento de anticorpos anti-OPG vários meses depois, entre outros efeitos secundários, constituindo isto uma limitação para o uso de OPG no tratamento da osteoporose.

(4) Antagonistas da integrina $\alpha v \beta 3$ (L-000845704)

O receptor da $\alpha v \beta 3$ integrina ou receptor vitronectina existe na superfície dos osteoclastos e é necessário para a ligação dos osteoclastos às proteínas da matriz óssea. O L-000845704 é um antagonista não peptídeo do receptor da $\alpha v \beta 3$ integrina do osteoclasto, administrado por via oral, que provoca inibição da reabsorção óssea.

Num ensaio clínico de fase 2, envolvendo 227 mulheres com osteoporose pós-menopausica, o L-000845704 diminuiu significativamente os marcadores de reabsorção óssea em 40% e aumentou a densidade óssea das vértebras em

3,5% numa dose de 200 mg 2 id. Não ocorreram efeitos adversos severos. No entanto, não foram feitos ainda estudos a longo-prazo.

(5) Outros agentes anti-reabsortivos potenciais

Os canais de cloro são expressos em elevada quantidade nos osteoclastos, principalmente o CIC7 e CICIC. Entre estes, os canais CIC7 parecem estar restritos a poucos tecidos.

Num modelo experimental de osteoporose em cobaias, um inibidor do canal de cloro bloqueava a acidificação osteoclástica e a reabsorção óssea sem afectar a formação de tecido ósseo. A perda de massa óssea foi reduzida em 50%. Pode ser necessário desenhar um inibidor mais potente para seres humanos.

De forma semelhante, mutações na anidrase carbónica (CA II) conduzem à diminuição da produção de ácido pelos osteoclastos.

Recentes estudos também estabeleceram o papel das fosfatases proteicas da tirosina (PTP – protein tyrosine phosphatases) na regulação da função e sobrevivência do osteoclasto. Estas moléculas são essenciais para a migração do osteoclasto e ligação da integrina $\alpha\beta3$ da superfície do osteoclasto com a matriz óssea. A cyt-PTP-epsilon, a PTP-PEST e PTP-oc são reguladores positivos da actividade osteoclástica, enquanto que a SHP-1 é um regulador negativo.

2.2. Agentes anabólicos

(1) Anticorpos neutralizantes de esclerostina

A esclerostina é uma proteína que é secretada pelos osteócitos após a mineralização primária para limitar a continuação da formação óssea pelos osteoblastos.

A deficiência em esclerostina devido a uma mutação no gene SOST resulta na esclerostose humana, caracterizada por um aumento da densidade de massa óssea em todos os tecidos ósseos.

Em situações normais, a esclerostina é produzida pelos osteócitos e actua nos osteoblastos via receptores LRP5 e LRP6 para inibir a via Wnt, que será abordada em parágrafos posteriores

Modelos experimentais de osteoporose (cobaias e macacos) tratados com anticorpo monoclonal para esclerostina (Scl-Ab II) aumentam marcadamente a formação de tecido ósseo nas superfícies trabecular, periosteal, endocortical e intracortical, após 5 semanas de tratamento.

Ensaio clínico com anticorpos de esclerostina para osteoporose poderão começar brevemente.

(2) BMPs (bone morphogenetic proteins)

As BMPs são factores de crescimento pertencentes à superfamília TGF- β constituindo potentes indutores da osteogénese.

Rolipram é um inibidor específico da fosfodiesterase-4, o que aumenta a eficácia de rhBMP-2. No entanto, também aumenta a actividade de AMP cíclico no cérebro provocando fortes efeitos anti-depressivos. Num estudo com administração local de Rolipram em ratos ocorreu um aumento da capacidade de rhBMP-2 para induzir formação de tecido ósseo, de acordo com a medição do conteúdo mineral ósseo do tecido ósseo formado. Estas observações têm um forte impacto, uma vez que a administração local deste composto reduz a ocorrência de efeitos secundários sistémicos.

3. Algumas limitações terapêuticas actuais

Os medicamentos actualmente usados no tratamento da osteoporose dividem-se em compostos anabólicos e anti-reabsortivos. Perante este facto, naturalmente se questiona qual destas terapêuticas é mais eficaz ou se é mais vantajosa a associação das duas: combinadamente ou sequencialmente.

Combinação de tratamentos anabólicos (PTH) e anti-reabsortivos

Desconhece-se ainda se é preferível utilizar a PTH ou os anti-reabsortivos isolados ou ambos, quer seja sequencialmente quer em simultâneo.

Os agentes anti-reabsortivos aumentam a densidade mineral do tecido, enquanto a PTH leva à deposição de novo tecido ósseo, reforçando a espessura das trabéculas e do córtex.

O aumento da massa óssea após o tratamento anti-reabsortivo é um fraco preditor na redução do risco de fracturas.

Desconhece-se se o aumento da massa óssea após a administração de PTH ou tratamento combinado é equivalente a uma maior redução do risco de fractura, relativamente ao que se verificava para o mesmo período de tempo de tratamento com bifosfonatos.

Apesar da diminuição dos marcadores de remodelação (com o tratamento com anti-reabsortivos) ser habitualmente um factor preditivo na redução do risco de fractura, este facto, não pode ser aplicável ao tratamento com PTH, uma vez que aí ocorre habitualmente um aumento nos níveis séricos de ambos os marcadores.

Assim, a combinação destes tratamentos inviabiliza o uso de marcadores do *turnover* ósseo para avaliação do risco de fractura/progressão da doença, deste modo, o seu controlo fica sujeito às limitações radiológicas actuais.

É um facto que a PTH faz mais do que os anti-reabsortivos, constrói novo tecido ósseo, em vez de simplesmente impedir a continuação da perda. Porém, qual será o valor disso? Estará a qualidade do tecido ósseo melhorada? Poderemos quantificar de forma segura e eficiente os benefícios do uso de PTH relativamente aos bifosfonatos?

A PTH reduz o risco de fractura em 50% a 60% mas isso também acontece com os tratamentos anti-reabsortivos. Qual a diferença que justifica o investimento do serviço nacional de saúde na PTH em detrimento dos bifosfonatos, por exemplo.

Sabe-se que o Raloxifeno (que apareceu antes do alendronato) atrasa o aumento da massa óssea e respostas de marcadores séricos à PTH, levantando a questão se a resposta anabólica desta hormona será parcialmente mediada por factores produzidos por osteoclastos ou produtos da matriz reabsorvida. Contudo, não se sabe se este efeito também se verifica com outros anti-reabsortivos.

Quando é suspenso o tratamento com PTH, os anti-reabsortivos previnem a perda de massa óssea, mas não se sabe se isso se traduz num aumento na protecção contra fracturas.

Apesar de não haver evidências que suportem o uso clínico de terapêutica combinada, sabe-se que o uso prévio de anti-reabsortivos não parece

influenciar a resposta à PTH, pelo menos em termos de densidade óssea ou marcadores de remodelação. [66]

Atendendo às modalidades terapêuticas descritas e tomando como exemplo o aparecimento de anticorpos após o tratamento com OPG sintética, poderemos interrogar-nos sobre a segurança de alguns destes fármacos e reflectir sobre a necessidade de encontrar modelos mais satisfatórios para melhorar a identificação/deteção de reacções adversas e se possível eliminá-las.

Metástases ósseas – (alguns aspectos)

O tecido ósseo constitui um destino frequente para a instalação e formação de lesões neoplásicas secundárias. As metástases ósseas são, de longe, mais frequentes do que os tumores ósseos primitivos. De facto, os ossos reúnem um conjunto de características que faz deles um local privilegiado para a migração e colonização de células neoplásicas. [67,68]

Por sua vez, e contrariamente à metastização visceral (com um tempo de sobrevida curto), os doentes com metastases ósseas podem sobreviver até dez anos

ou mais, apresentando, no entanto, sintomas severos que vão desde uma intensa dor óssea, síndromas de compressão nervosa, hipercalcémia até fracturas patológicas, circunstâncias que, no seu conjunto, reduzem consideravelmente a sua qualidade de vida.

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

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

No entanto, está também demonstrado que a entrada das células nos sinusóides e posterior chegada à medula óssea não é suficiente para assegurar uma

colonização metastática, sendo muito mais as células cancerosas que transitam nas cavidades medulares, do que, as que efectivamente, se instalam e progridem no sentido de uma lesão secundária. Por outro lado, as células endoteliais que revestem estes sinusóides podem desenvolver particulares afinidades (expressando, por exemplo, diversas proteínas de adesão), de modo a estabelecer ligações específicas com as células tumorais, contribuindo em certas regiões (alvo) para uma adesão entre as células tumorais circulantes e as células endoteliais da microcirculação presente na medula óssea.

Está já demonstrado que as células ósseas (nomeadamente as células da linha osteoblástica) activam, nas células endoteliais adjacentes a expressão de vários tipos de moléculas de adesão. O desenvolvimento de adesões específicas entre certas células tumorais circulantes e as células endoteliais da medula óssea pode explicar em parte o osteotropismo característico de certas neoplasias (mama e próstata).

As células tumorais, depois de aderir ao endotélio vascular dos órgãos alvo, extravasam para os tecidos circundantes. Este processo é muito facilitado devido a enzimas secretadas pelas próprias células tumorais visando facilitar a sua penetração nos tecidos. Porém, as células cancerosas só permanecem e evoluem nesses locais se encontrarem um micro-ambiente apropriado que lhes permita sobreviver e proliferar.

Em síntese, a arquitectura óssea e particularmente a estrutura dos vasos sanguíneos (sinusóides) da medula óssea, facilitam imenso a circulação e transmigração das células neoplásicas. Em geral, áreas bem vascularizadas contendo abundante medula óssea constituem quase sempre locais privilegiados para a colonização metastática. Assim, e como sabemos, nem todos os ossos que compõem o esqueleto são igualmente atingidos, constituindo destinos preferenciais para a metastização, as vértebras, as costelas e as extremidades dos ossos longos, tudo regiões altamente vascularizadas e ricas em medula óssea vermelha.[68]

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

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

1. Mecanismos de metastização óssea

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

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

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

bloqueio experimental do CXCR4 (com anticorpos ou antagonistas), reduzindo notoriamente a incidência de metástases.

O sistema RANKL/RANK/OPG parece estar também muito envolvido na migração de células cancerosas que expressam RANK. Chega mesmo a existir um trabalho de investigação com um título sugestivo que fala por si: “*RANKL Acts Directly on RANK-expressing Prostate Tumor Cells and Mediates Migration and Expression of Tumor Metastasis Genes*”. Neste estudo, a utilização de OPG (inibidor natural da interacção RANK/RANKL) apresentou-se bastante eficaz, bloqueando o tropismo ósseo destas células.

Foi, ainda, demonstrado que uma maior incidência de metastização óssea do cancro da mama e do cancro da próstata podia estar relacionada com o aumento da expressão pelas células cancerosas de certas integrinas que medeiam a sua ligação à matriz óssea ($\alpha\beta3$ para a mama e $\alpha2\beta1$ para a próstata). Esta conclusão foi também confirmada quando se observou uma redução acentuada do processo metastático com a utilização de antagonistas específicos destas integrinas.

Assim, dentro do osteotropismo característico das células metastáticas é possível que certas quimioquinas (CXCR4 e RANKL) e certas integrinas ($\alpha\beta3$ e $\alpha2\beta1$) possam interagir em sinergia como recptores/ligandos promovendo a migração e colonização óssea.

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

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

Como já foi referido, os factores moleculares presentes no micro-ambiente ósseo têm um papel determinante na formação de um micro-ambiente capaz de favorecer o desenvolvimento de lesões secundárias. A este respeito, Stefan Paget (1889) propôs uma teoria conhecida por teoria do *seed and soil*, afirmando que certos micro-ambientes, como o que se encontra no tecido ósseo, proporcionam um terreno fértil onde as células cancerosas podem crescer. Em paralelo, os mecanismos de remodelação óssea contribuem para uma renovação constante

deste *soil*, desempenhando os osteoclastos um papel crucial neste processo. Roodman (2004). Refere que « *the osteoclasts act as plows to break up the “soil” and release its nutrients*», mantendo deste modo um ambiente muito “hospitaleiro” para as células tumorais.

Parece cada vez mais evidente que as células tumorais, ao chegarem à medula óssea, desencadeiam uma resposta inflamatória (estimulando a produção de RANKL pelas células osteoblásticas e inflamatórias) que leva ao recrutamento e activação das células da linha osteoclástica e conseqüentemente a uma reabsorção óssea, criando um **ciclo vicioso**, reconhecido há já alguns anos por Yoneda et al (2004) entre as células ósseas e as células tumorais. O *turnover* ósseo vai «abrigar e alimentar» as células cancerosas.

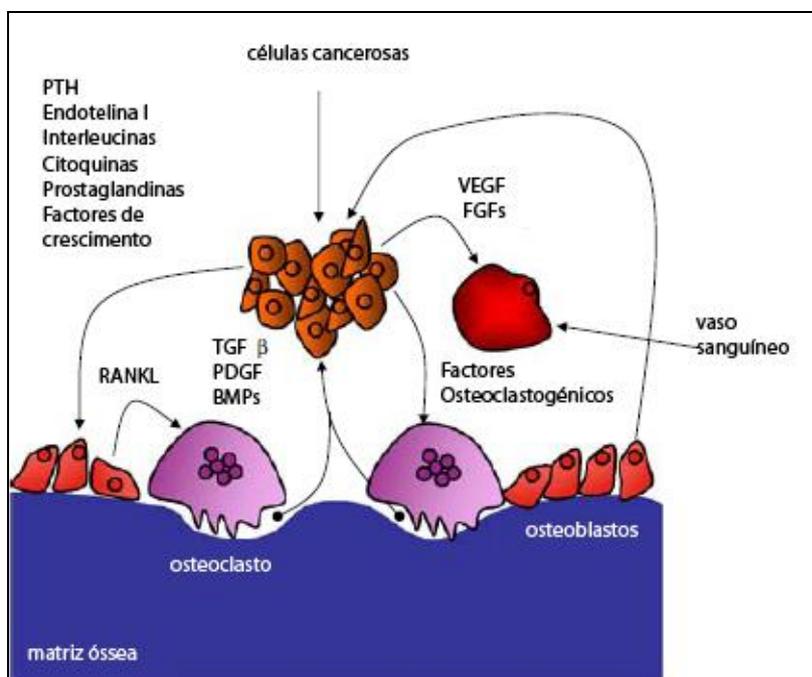


Figura 14. Representação esquemática do “ciclo vicioso” estabelecido entre as células cancerosas, os osteoblastos e os osteoclastos. As células cancerosas pela produção de certos factores (PTH, endotelina 1, interleucinas, citoquinas, prostaglandinas e factores de crescimento) estimulam nos osteoblastos a síntese de RANKL, induzindo a formação de osteoclastos. A reabsorção da matriz (pelos osteoclastos) conduz à libertação de TGF β , PDGF e BMPs, factores que vão contribuir para o crescimento e proliferação das células cancerosas. Estas células expressam também VEGF e FGFs, factores angiogénicos responsáveis pelo desenvolvimento de uma rede vascular de suporte.

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

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

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

Em síntese, o micro-ambiente exerce uma influência extraordinária no processo de localização e desenvolvimento das metástases ósseas. O “diálogo”

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

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

As células metastáticas que alcançam a medula óssea podem manter-se num estado quiescente durante vários anos antes de formarem metástases ósseas activas. Este facto, pode justificar o aparecimento de metástases ósseas muito

tempo após a remoção cirúrgica do tumor primitivo, é neste âmbito que os nichos endosteais ou osteoblásticos podem ter grandes implicações.

Nichos osteoblásticos

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

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

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

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

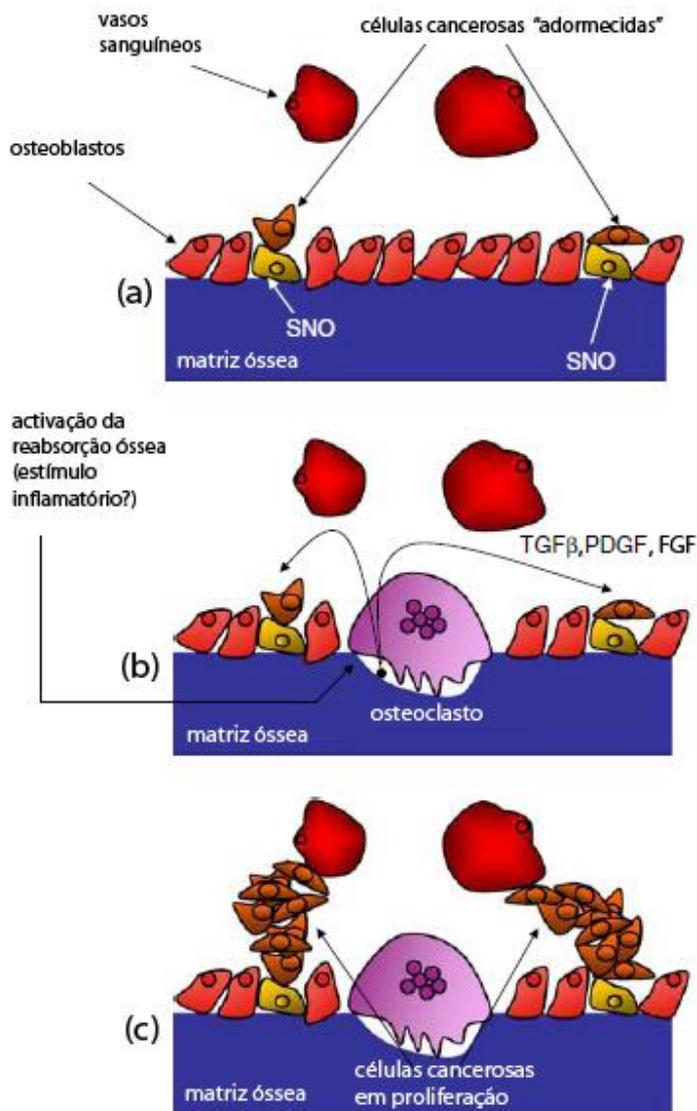


Figura 15. Papel do nicho osteoblástico na regulação das células cancerosas. (a) Entre as células osteoblásticas que revestem a superfície óssea encontram-se alguns *Spindle-shaped, N-cadherin osteoblasts (SNO)*, responsáveis pela sequestração e manutenção das células cancerosas “adormecidas”. (b) Qualquer alteração das condições do micro-ambiente ósseo pode estimular os processos de reabsorção óssea (pelos osteoclastos), levando à libertação de TGFβ, PDGF, FGF, factores que, por sua vez, desencadeiam a activação das células cancerosas “adormecidas”. (c) As células cancerosas, uma vez activadas, proliferam activamente, levando ao aparecimento de lesões metastáticas activas.

São várias as circunstâncias que podem desencadear a activação osteoclástica, levando à libertação dos factores de crescimento existentes na matriz óssea para o micro-ambiente medular e deste modo «despertar» as células tumorais «adormecidas». Os mecanismos inflamatórios serão os principais candidatos responsáveis pela activação dos osteoclastos, desencadeando toda esta cascata de eventos. Esta problemática foi muito bem sintetizada por Lu H.(2006) que intitulou desta forma um dos seus trabalhos de investigação: «*Inflammation, a key event in cancer development*».

De referir, para terminar, uma das questões, ainda por resolver e cujo esclarecimento em muito ajudaria o prognóstico, prevenção e terapêutica dos processos de metastização.

Será possível determinar a “metastatic signature” de um tumor primitivo de modo a estabelecer um conjunto de características que pudessem prever precocemente as suas possibilidades de metastização?

Bibliografia

1. Cohen M. (2006),The new Bone Biology: pathologic, Molecular and clinical correlates; American Journal of Medical Genetics Part A. 140A:2646-2706
2. Jilka R.(2003).Biology of the Basic Multicellular Unit and the Pathophysiology of osteoporosis; Med Pediatr Oncol 2003; 41:182-185.
3. Nulend J(2005). Mechanobiology of Bone Tissue. Pathologie Biologie S3 (2005) 576-580.
4. Turner CH(1998).Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. J Orthop Sci 1998;3(6):456-55
5. Robling et al(2006).Biomechanical and molecular regulation of bone remodelling. Annual Reviews Biomed Eng.2006;8:455-498.
6. Martin T et al(2008) Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility;Best practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism vol.22 n°. 5,pp 701-722
7. Szule et al(2009).Thinking inside and outside the envelopes of bone. Osteoporos Int 20:1281-1288.
8. Seeman E. (2006) Osteocytes-martyrs for integrity of bone strength.Osteoporos Int 17:1443-1448.

9. Schindeler A. et al(2008). Bone remodelling during fracture repair: the cellular picture. *Seminars in cell & Developmental Biology* 19:459-466
10. Kierszenbaum Al. *Histologia e biologia celular*. In: Kierszenbaum AL, Editor. Tradução da 2ª edição ed: Mosby-Elsevier 2008.p.136-59.
11. Väänänen H K, e tal.(2008) Osteoclast lineage and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473: 132-138.
12. Schilling et al(2006).Osteoclasts and biomaterials.*European Journal of trauma* 2006,vol 1 ,p.107-113.
13. Palma,P. (2009) Estudo de novas formulações para a regeneração óssea em defeitos de dimensão crítica [Tese de mestrado apresentada à FMUC], Coimbra: Universidade de Coimbra.
14. Henriksen K. et al(2009).Local communication on and within bone controls bone remodelling. *Elsevier Bone* 44:1026-1033.
15. Sims N. et al(2008).Bone remodelling:multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell & Developmental biology* 19: 444-451.
16. Martin R.(2007) Targeted bone remodelling involves BMU steering as well as activation.*Elsevier Bone* 40: 1574-1580
17. Mödder U.(2008).SkeletalStem/Osteoprogenitor Cells: Current Concepts, alternate hypotheses and relationship to the Bone Remodeling Compartment.*Journal of Cellular Biochemistry* 103: 393-400.

18. Grellier M. (2009) Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *cell*.
19. Eriksen E (2007). Perspective remodelling and vascular spaces in Bone. *Journal of bone and mineral research*, vol 22,1-6.
20. Andersen T. et al (2009). A physical Mechanism for Coupling Bone Resorption and Formation in Adult Human Bone. *The American Journal of Pathology*, vol. 174: 239-247
21. Pettit A. et al (2008). Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. *Elsevier Bone*, 43: 976-982.
22. Chang M. et al (2008). Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and Mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology* 181:1232-1244.
23. Lourenzo J. (2008). Osteoimmunology: interactions of the bone and Immune System. *Endocrine Reviews* 29: 403-440.
24. Nakashima T. (2009). Osteoclasts and the immune system. *J. bone mineral Metab* 27:519-529.
25. Boyce B (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modelling and remodelling. *Arch Biochem Biophys*. 473(2):139-146.
26. Nakashima T. (2009). Osteoimmunology: crosstalk between the Immune and bone systems. *J. Clin. Immunol.* 29: 555-567.
27. Gillespie M. (2007). Impact of cytokines and T lymphocytes upon

- osteoclast differentiation and function; *Arthritis Research & Therapy* 2007,9:103.
28. Gallagher J. et al(2010).Molecular biology of bone remodelling: Implications for new therapeutic targets for osteoporosis. Elsevier Maturitas.
29. McNamara L. (2009).Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures.*Journal of the Royal Society* 7, 353-372.
30. Sipos w. et al(2009).Pathophysiology of osteoporosis.*Wien Med Wochenschr* 159/9-10: 230-234.
37. Bailey ,A.J. (1993).Biochemical changes in the collagen of human osteoporotic bone matrix.*Connect.Tissue Res.*29,119-132
49. Bell,K. (1996).Oestrogen suppression increases Haversian resorption depth as well as remodelling activity in woman with endometriosis.*Bone* 19, 131S
31. Bell,K.L.(1999).Regional defferences in cortical porosity in the fractured femoral neck.*Bone* 24, 57-64
- 58.Boyde, A(1998)Effect of estrogen suppression on the mineralization density of iliac crest biopsies in young woman as assessed by backscattered electron imaging. *Bone* 11,241-250.
51. Braidman I.P.(2001).Location of estrogen receptor beta protein

expression in adult human bone. *J. Bone Miner. Res.* 16,214-220

47. Brockstedt, H.(1993).Age and sex related changes in iliac cortical bone mass and remodelling. *Bone* 14,681-691

43. Burr, D.B.(1997) Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures. *J. Bone Miner. Res.* 12,6-15.

39. Burr, D.B.(1998) Does microdamage accumulation affect the mechanical properties of bone? *J. Biomech* 31, 337-345

34. Cordey, J.Schneider(1992).Effect of bone size, not density, on the stiffness of the proximal part of normal and osteoporotic human femora. *J. Bone Miner. Res.* 7 (Suppl 2), S437-S44

*** Restantes referências, entre o nº31 e o 62 inclusivé, omitidas por serem referências do artigo nº29 desta bibliografia (Perspective on post-menopausal osteoporosis: establishing an interdisciplinary understanding of the sequence of events from the molecular level to whole bone fractures).

63. Wauquier F.(2009)Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Cell trends in Molecular Medicine* vol.15 nº10.

64. Nguyen T.(2004).Osteoporosis: underrated, underdiagnosed and undertreated. *MJA* 180(5 Suppl) S 18-S 22.

65. Russell R. (2007).Mechanisms of action of biphosphonates: similarities and differences and their potencial influence on clinical efficacy. *Osteoporos. Int.*

66. Martin T.(2008).Regulatory pathways revealing new approaches to the development of anabolic drugs for osteoporosis. *Osteoporosis Int.*19:1125-1138.
67. Clezardin P(2007) Bone metastasis:pathogenesis and therapeutic implications *Clin Exp.Metastasis* 24: 599-608.
68. Bussard K(2008).The bone microenvironment in metastasis:what is special about bone?.*Cancer metastasis Rev* (2008) 27: 41-55.
69. Paget S(1889)The distribution of secondary grwths in cancer of the breast.*Lancet* 1:571-573
70. Roodman, G.D.(2004).Mechanisms of bone metastasis. *New England Journal of Medicine*, 350,1655-1664
71. Lou H. (2006).Inflammation, a key event in cancer development.*Mol.Cancer Res.*4:221-233.

