

MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO METABOLISMO ÓSSEO

M^a HELENA RAPOSO FERNANDES

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

RESUMO

O tecido ósseo está continuamente num processo de remodelação. A massa óssea é mantida através de um balanço contínuo entre a sua destruição e formação. A remodelação óssea verifica-se num ciclo extremamente bem regulado no qual, os osteoclastos aderem ao tecido ósseo e o removem por acidificação e digestão proteolítica e os osteoblastos sintetizam, no mesmo local, uma matriz orgânica que é posteriormente calcificada. A remodelação óssea é a base celular do metabolismo ósseo. As alterações patológicas que se observam em muitas doenças do tecido ósseo podem ser explicadas por anormalidades nas diferentes fases do ciclo de remodelação. Os processos de regulação do metabolismo ósseo envolvem a disponibilidade de vários sais minerais e homeostasia iónica, hormonas calciotrópicas e numerosos factores locais. Neste trabalho descreve-se resumidamente o padrão geral do processo de remodelação óssea e os mecanismos celulares envolvidos na reabsorção e formação óssea, bem como, os factores sistémicos e locais responsáveis pela regulação mútua destes dois processos.

SUMMARY

Bone Metabolism Regulating Mechanisms

The bone is continuously in a remodelling process. Bone mass is maintained in a continuous balance between its destruction and formation. Bone remodelling proceeds in a highly regulated cycle in which osteoclasts adhere to bone and subsequently remove it by acidification and proteolytic digestion and the osteoblasts secrete a organic matrix which is calcified into new bone. Bone remodelling is the cellular basis of bone metabolism. Pathological changes in many metabolic bone diseases can be explained by abnormalities at some point of the remodelling cycle. The mechanisms of regulatory bone metabolism involve the availability of a number of minerals and ionic homeostasis, systemic hormones and numerous local factors. In this work the general pattern of bone remodelling and the cellular mechanisms of bone resorption and formation are briefly described. The role of systemic and local factors in the regulation and coupling of these two processes is also reported.

INTRODUÇÃO

O esqueleto humano é, do ponto de vista funcional, o suporte estrutural do organismo e constitui um reservatório complexo e dinâmico de várias moléculas orgânicas e inorgânicas. O tecido ósseo é composto por uma matriz orgânica firme e fortalecida por depósitos de sais de cálcio. A matriz orgânica é formada por fibras de colagénio numa percentagem de 90 a 95% e o restante constitui um meio homogéneo designado de substância intersticial e que é constituída por fluido extracelular e

proteoglicanos (especialmente, sulfato de condroitina e ácido hialurónico). Os sais cristalinos depositados na matriz são principalmente compostos de cálcio e fosfato e o sal mais abundante é a hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Também estão presentes compostos amorfos de fosfato de cálcio, principalmente hidrogeno-fosfato de cálcio (CaHPO_4) ou compostos similares, que estão frouxamente ligados à matriz e em equilíbrio reversível com os iões cálcio e fosfato no fluido extracelular (cálcio permutável). A deposição e solubilização destes

compostos é fácil e rápida. Estes sais existem numa percentagem de 0.5 a 1% do total de sais de cálcio do tecido ósseo (aproximadamente 5 a 10 g de cálcio) e são responsáveis pela função de tampão do tecido ósseo na manutenção da concentração plasmática de cálcio. O tecido ósseo compacto contém, em média, 30% de matriz e 70% de sais de cálcio¹⁻⁴.

O tecido ósseo está continuamente num processo de remodelação. No adulto, a massa óssea é mantida através de um balanço contínuo entre a sua destruição e formação. O "turnover" ósseo anual é de cerca de 4% no osso cortical e de 20% no osso trabecular. A contínua remodelação do osso traduz-se por funções fisiológicas importantes, nomeadamente, a regulação da homeostasia iónica e a manutenção das propriedades mecânicas do osso¹⁻⁴.

A remodelação óssea é o processo pelo qual os efeitos catabólicos dos osteoclastos (reabsorção óssea) estão em equilíbrio com os efeitos anabólicos dos osteoblastos (formação óssea). Verifica-se num ciclo extremamente bem regulado no qual os osteoclastos aderem ao tecido ósseo e o removem por acidificação e digestão proteolítica e os osteoblastos sintetizam, no mesmo local, uma matriz orgânica que é posteriormente calcificada. A remodelação óssea é a base celular do metabolismo ósseo¹⁻⁵.

A Figura 1 mostra uma representação esquemática da unidade óssea fisiológica³.

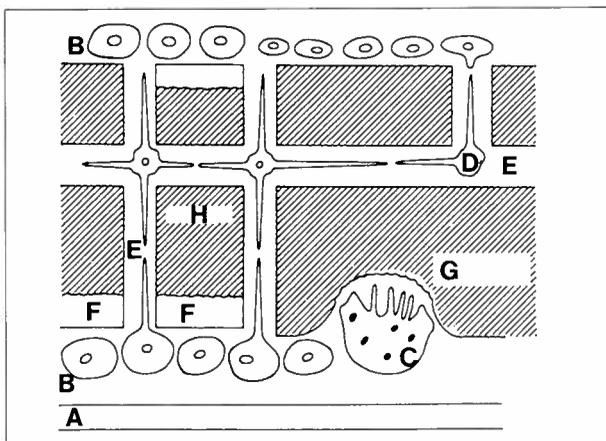


Figura 1- Representação esquemática da unidade óssea fisiológica. (A) Espaço vascular. (B) Osteoblastos activos. (C) Osteoclasto. (D) Osteócitos. (E) Canaliculo ósseo. (F) Osteoide. (G) Lacuna de reabsorção. (H) Matriz mineralizada. (Adaptado da ref. 3).

REMODELAÇÃO ÓSSEA

A remodelação óssea é um processo local que se observa em pequenas áreas designadas por unidades de remodelação óssea. O "turnover" ósseo é determinado pelo número de unidades de remodelação (que, em cada

momento, é de cerca de dois milhões no esqueleto humano) e pela frequência da sua activação⁶.

No início de cada ciclo de remodelação óssea observa-se a activação de células em repouso, nomeadamente, migração de precursores mononucleares dos osteoclastos para o local de reabsorção e a sua posterior diferenciação. Os osteoclastos são células multinucleadas que se formam por fusão de células mononucleares perto ou na superfície do osso a ser reabsorvido. São células altamente polarizadas que modificam drasticamente a sua actividade durante o ciclo de reabsorção⁷. Formam uma união firme com o osso, isolando uma pequena área na sua superfície, a lacuna de reabsorção. A solubilização da matriz mineralizada faz-se por acidificação, obtida de dois modos: (1) fusão de vacúolos acídicos intracelulares com a membrana celular e libertação do seu conteúdo, (2) existência de uma bomba de prótons na membrana⁸. A matriz orgânica é degradada por várias enzimas, nomeadamente, hidrolases lisosómicas e collagenases. Os produtos de degradação são removidos por transcitose e/ou escoamento da lacuna de reabsorção^{5,9-11}.

No final da fase de reabsorção (e após os osteoclastos terem abandonado o local) observa-se o aparecimento, na lacuna de reabsorção, de uma população heterogénea de células mononucleares. Algumas destas células têm características de macrófagos e, estão também presentes osteócitos e pré-osteoblastos. Estas células preparam o local para a fase de formação óssea, nomeadamente, a deposição de uma substância de tipo cimento na lacuna. Esta fase, designada por fase reversa, constitui um período crítico entre a fase de reabsorção e a de formação e é, possivelmente, um elemento importante de acoplamento entre os dois processos⁵.

A fase de formação óssea inicia-se com a activação de precursores de osteoblastos e a sua diferenciação em osteoblastos activos. Os osteoblastos segregam uma matriz orgânica (osteóide) que é mais tarde mineralizada. A matriz orgânica é fundamentalmente constituída por proteínas, principalmente colagénio de tipo I (e também, osteocalcina, osteonectina, osteopontina), proteoglicanos, enzimas (fosfatase alcalina, collagenase), lipoproteínas e factores de crescimento^{5,12}. A mineralização da matriz orgânica inicia-se com a deposição amorfa de cálcio e de fosfato; a adição lenta de iões hidróxido e bicarbonato a esta fase mineral resulta na formação de cristais de hidroxiapatite. À medida que a matriz mineralizada se acumula e envolve o osteoblasto, esta célula perde a sua actividade sintética e torna-se um osteócito interior^{13,14}. A regulação molecular detalhada da mineralização da matriz está ainda por esclarecer mas, a fosfatase alcalina

parece ter um papel importante no processo. Os osteoblastos segregam quantidades elevadas desta enzima durante a fase de formação da matriz orgânica. Pensa-se que esta fosfatase aumenta a concentração local de fosfato inorgânico (necessário para a deposição de hidroxiapatite) e/ou activa as fibras de colagénio de modo a tornar possível a deposição de sais de cálcio. A osteocalcina (1 a 2% da proteína óssea total) tem uma afinidade muito elevada para o cálcio e para a hidroxiapatite não cristalizada e parece integrar um mecanismo de *feedback* inibitório da mineralização^{1,15}. Parte da fosfatase alcalina e osteocalcina sintetizadas localmente difunde para a circulação e, assim, os níveis sanguíneos destas substâncias são normalmente um indicador apropriado da actividade osteoblástica.

MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA REMODELAÇÃO ÓSSEA

A massa óssea é mantida através de um balanço contínuo entre a sua formação e destruição. O metabolismo ósseo envolve a disponibilidade de vários minerais (cálcio e fosfato) e homeostase iónica, uma série de hormonas calcitropicadas e numerosos factores locais. A paratormona e a 1,25-dihidroxitamina D₃ são as principais hormonas sistémicas responsáveis pela regulação da fisiologia óssea. Contudo, muitas outras hormonas são importantes na regulação do metabolismo ósseo (estrogénios, hormonas da tireoide, glucocorticóides e hormona de crescimento). Os factores de crescimento e citocinas que existem no microambiente ósseo e que são produzidos pelas células ósseas e outras células presentes (células hematológicas) também influenciam a remodelação óssea. Alguns destes peptídeos activos são incorporados na matriz óssea durante a formação óssea e libertados mais tarde quando da reabsorção óssea. Outros, têm efeitos sistémicos e locais que se sobrepõem com os efeitos das hormonas sistémicas^{1,5}.

FACTORES SISTÉMICOS

1. Hormona da paratireoide, PTH

A hormona da paratireoide, PTH, é produzida pelas glândulas paratiróideas. A secreção desta hormona é regulada pela concentração plasmática de cálcio. Concentrações elevadas de cálcio diminuem a secreção da PTH enquanto que concentrações baixas aumentam a sua libertação^{1,16}.

A PTH regula a concentração iónica de cálcio no fluido extracelular por interferência nos mecanismos de controlo da sua absorção intestinal, excreção renal e mobilização a partir do tecido ósseo^{1,16}. O aumento da activi-

dade da glândula da paratireoide resulta em hipercalcemia no fluido extracelular por acção em três órgãos alvo: tecido ósseo, rim e, indirectamente, tracto gastrointestinal^{1,16}.

O efeito da PTH no tecido ósseo parece envolver dois mecanismos. Um efeito imediato de activação de células ósseas existentes (osteoblastos e osteócitos) que resulta na libertação de ião cálcio a partir dos sais amorfos de fosfato de cálcio e, um efeito muito mais lento que se traduz por um aumento da proliferação dos osteoclastos e consequente reabsorção do tecido ósseo^{1,16}.

Os osteoblastos e os osteócitos, células que estão normalmente associadas com a deposição óssea, comunicam entre si através de um sistema de prolongamentos celulares muito finos que se espalham por toda a estrutura óssea e que se situam no interior de canalículos preenchidos com fluido ósseo. Esta vasta rede de comunicação designa-se por sistema membranoso osteocítico. A existência de uma bomba de cálcio na membrana osteocítica permite trocas deste ião entre o fluido ósseo e o meio extracelular. A ligação da PTH a receptores específicos nos osteoblastos e osteócitos resulta numa activação da bomba de cálcio que se traduz pela transferência de cálcio do fluido ósseo para as células ósseas e depois, para o lado oposto, o fluido extracelular. Este processo é acompanhado por uma remoção rápida de sais de fosfato de cálcio a partir dos depósitos amorfos que se situam junto destas células, para que se verifique o restabelecimento dos níveis de cálcio no fluido ósseo. Este mecanismo parece ser o responsável pelo efeito imediato da PTH na concentração de cálcio^{1,14}.

A activação do sistema osteoclástico pela PTH demora vários dias ou mesmo semanas para se desenvolver completamente e traduz-se por um efeito na actividade funcional dos osteoclastos existentes e formação de novos osteoclastos. Este efeito resulta na reabsorção de tecido ósseo mineralizado. Neste processo, há libertação dos iões cálcio e fosfato por dissolução da matriz mineralizada e transferência para o fluido extracelular; a matriz orgânica é hidrolizada por acção da collagenase e enzimas lisosómicas. Devido à degradação do colagénio observa-se um aumento da concentração plasmática e urinária de hidroxiprolina¹.

Os osteoclastos não apresentam receptores para a PTH e o efeito na reabsorção óssea parece ser mediado pelos osteoblastos. A activação de receptores específicos situados na membrana dos osteoblastos pela PTH, resulta na libertação de substâncias activas que actuam de modo paracrínico na proliferação e diferenciação dos osteoclastos^{1,16-18}.

A presença de quantidades excessivas de PTH durante alguns dias resulta num sistema osteoclástico bem desenvolvido que pode continuar a crescer durante meses sob a influência de uma estimulação por esta hormona. Após alguns meses, os ossos ficam fragilizados e observa-se, em consequência desta situação, uma estimulação da actividade osteoblástica. Assim, o efeito a longo prazo de um excesso de PTH é o aumento da actividade de reabsorção e formação óssea. A reabsorção óssea é, de um modo geral, superior à formação óssea e a administração prolongada de PTH ou secreção excessiva desta hormona durante muitos meses resulta, normalmente, numa reabsorção evidente de todos os ossos com o aparecimento de grandes cavidades preenchidas com osteoclastos multinucleados de grandes dimensões. Factores que afectam a remodelação óssea como por exemplo, a disponibilidade de cálcio, fosfato e vitamina D, influenciam quantitativamente a reabsorção e formação óssea que se observam durante uma exposição prolongada à PTH^{1,16}.

2. Calcitonina

A calcitonina é sintetizada pelas células parafoliculares da tireóide. Pode também ser produzida por células semelhantes na glândula da paratireóide e timo. A libertação de calcitonina é estimulada pelo aumento da concentração extracelular de cálcio e por várias hormonas do tracto gastro-intestinal e do pâncreas exócrino.

A calcitonina diminui os níveis plasmáticos de cálcio. Tem assim um efeito oposto ao da PTH. A redução da concentração plasmática de cálcio verifica-se em consequência da ligação da calcitonina a receptores específicos na membrana citoplasmática das células alvo e ocorre de dois modos. Observa-se um efeito imediato, provavelmente por interferência com a bomba de cálcio situada na membrana osteocítica, de modo a favorecer a deposição de cálcio sob a forma de sais amorfos. A exposição prolongada à calcitonina traduz-se por uma redução na formação de novos osteoclastos e alteração da sua actividade funcional^{1,16, 19,20}.

A calcitonina parece ser um antagonista fisiológico da PTH relativamente à concentração plasmática de cálcio. A importância da calcitonina no Homem é, contudo, controversa. A deficiência em calcitonina não resulta em hipercalcemia e a hipersecreção desta hormona não produz hipocalcemia. A secreção anormal de calcitonina é facilmente compensada por um ajustamento dos níveis de PTH e vitamina D. A calcitonina parece apenas ter interesse na regulação da concentração plasmática de cálcio em períodos de tempo curtos como, por exemplo, a seguir a uma refeição rica em cálcio. A regulação, a

longo prazo, dos níveis de cálcio no fluido extracelular é feito quase exclusivamente pela PTH. Tem sido proposto um papel para a calcitonina no desenvolvimento ósseo fetal e no declínio da massa óssea durante o envelhecimento¹.

3. Vitamina D

As vitaminas D são substâncias esteróides, lipossolúveis. O termo vitamina D refere-se colectivamente ao colecalciferol (vitamina D₃) e ao seu equivalente vegetal, ergocalciferol, (vitamina D₂). A vitamina D, através dos seus metabolitos activos, é um factor importante de regulação do metabolismo ósseo. A deficiência em vitamina D traduz-se por uma diminuição na mineralização óssea e resulta em raquitismo na criança e osteomalácia no adulto.

As vitaminas D₂ e D₃ têm uma actividade semelhante no homem. A vitamina D₃ é a forma clássica de vitamina D e entra na composição de muitos alimentos, sendo absorvida no tracto gastrointestinal. No organismo, é sintetizada na pele pela irradiação ultravioleta do 7-dihidrocolecalciferol (produzido a partir do colesterol). A activação da vitamina D₃ envolve duas hidroxilações. No fígado é hidroxilada a 25-hidroxivitamina D₃ (25-OHD₃). Este composto é transportado para o rim onde tem dois mecanismos de metabolização possíveis: formação de 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃), a forma mais activa de vitamina D, ou de 24,25-dihidroxivitamina D₃ (24,25-(OH)₂D₃), composto praticamente inactivo. A activação da vitamina D obedece a um controlo de *feedback* através da regulação das actividades da 1-hidroxilase e 24-hidroxilase responsáveis pela formação de, respectivamente, 1,25-(OH)₂D₃ e 24,25-(OH)₂D₃. O resultado deste mecanismo de regulação traduz-se por um aumento da formação de 1,25-(OH)₂D₃ sempre que se verifique um decréscimo dos níveis de cálcio, fosfato ou vitamina D. A formação deste composto requer a presença de PTH (produzida em resposta à diminuição da concentração plasmática de cálcio) e depende também de várias outras hormonas (estrogénios, progestinas, testosterona, hormona de crescimento e prolactina)^{1,16}.

A 1,25-(OH)₂D₃ exerce o seu efeito de acordo com o mecanismo geral de acção das hormonas esteróides. Após a ligação a um receptor citoplasmático, o complexo penetra no núcleo estimulando a transcrição de um mRNA para pelo menos uma proteína com afinidade para o ião cálcio. Esta proteína funciona como transportador do cálcio e está presente nas células da mucosa intestinal, tecido ósseo, rim e glândulas da paratireóide¹.

O efeito mais significativo da 1,25-(OH)₂D₃ é a

estimulação da absorção de cálcio a partir do lumen intestinal contra um gradiente de concentração (também aumenta a absorção intestinal activa do fosfato e magnésio).

A $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ também influencia o transporte de cálcio através da membrana citoplasmática das células ósseas²¹, afectando o processo de mineralização. Na ausência deste composto a mineralização do osteoide é deficiente resultando a formação de um tecido ósseo enfraquecido. A $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ estimula a reabsorção óssea. Os osteoclastos não possuem receptores para este composto e este efeito parece ser mediado, indirectamente, pelos osteoblastos^{1,18,22}.

A formação de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ requer a presença de PTH. Esta hormona tem assim um papel importante no comportamento funcional da vitamina D no nosso organismo, especialmente os seus efeitos a nível da absorção intestinal de cálcio e no tecido ósseo¹.

4. Hormona de crescimento

A hormona de crescimento é produzida e armazenada nas células acidófilas do lobo anterior da hipófise e tem uma acção anabólica geral. Esta hormona estimula a deposição de proteínas e o crescimento celular em quase todos os tecidos do organismo mas, o efeito mais evidente é o de promover o crescimento ósseo. A deficiência desta hormona impede o crescimento normal e a obtenção da estatura esperada. Esta diminuição do crescimento acompanha-se de alteração dos ossos e dos músculos e aumento de depósitos de gordura. O desenvolvimento de deficiência desta hormona no adulto normal parece ter consequências mínimas e difíceis de detectar. O excesso desta hormona na infância produz gigantismo e no adulto (uma vez as epífises fundidas) acromegalia²³.

A hormona de crescimento interactua com receptores específicos situados na membrana citoplasmática de células alvo. O efeito desta hormona no crescimento celular requer a formação de peptídeos conhecidos por somatomedinas. Estes compostos são provavelmente produzidos por muitos tecidos em resposta à hormona de crescimento mas, as somatomedinas circulantes são sintetizadas principalmente no fígado. Estes peptídeos têm uma estrutura semelhante à proinsulina e partilham alguns dos efeitos da insulina pelo que são designados de *insulin growth factors* (IGFs). As somatomedinas medeiam as respostas típicas da hormona de crescimento na cartilagem, tecido ósseo, músculo, tecido adiposo e fibroblastos. Os indivíduos que não têm capacidade de sintetizar estes peptídeos apresentam um retardamento no crescimento, mesmo possuindo níveis elevados de

hormona de crescimento^{5,23-25}.

As somatomedinas actuam como hormonas circulantes e afectam de modo muito significativo o metabolismo ósseo, em particular a somatomedina C (IGF-1). Os efeitos a nível do tecido ósseo incluem: 1) aumento da deposição de proteínas pelos condrócitos e células osteogénicas responsáveis pelo crescimento ósseo, 2) aumento da proliferação celular destes dois tipos de células, 3) conversão de condrócitos em células osteogénicas, causando a deposição de tecido ósseo²³.

Os IGFs são também produzidos no microambiente ósseo pelas células locais e a sua síntese parece ser modulada por hormonas sistémicas como a hormona do crescimento e, também, estrogénios, PTH e $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Os IGFs têm um papel importante nos mecanismos locais de regulação do metabolismo ósseo, actuando de modo paracrínico e autocrínico²⁴⁻²⁸.

Os níveis circulantes da hormona de crescimento declinam a partir da adolescência. O papel menos importante desta hormona no idoso reflecte-se por uma diminuição da concentração plasmática de IGF-1^{23,29}.

4. Estrogénios

Na mulher, os estrogénios são sintetizados essencialmente pelo ovário e, durante a gravidez, a placenta é também responsável pela produção de quantidades elevadas destas hormonas.

O tecido ósseo é particularmente sensível aos estrogénios. Estas substâncias têm um papel importante na manutenção da massa óssea, na mulher. O estradiol inibe a reabsorção óssea e a perda deste importante efeito pode contribuir para um declínio da massa óssea e um aumento da taxa de fracturas. Em situações em que os níveis de estrogénios estão diminuídos (após a menopausa) observa-se um aumento na frequência de remodelação óssea e a existência de um desequilíbrio entre a actividade osteoblástica e osteoclástica. A actividade funcional dos osteoclastos está aumentada e a dos osteoblastos diminuída, resultando a formação de espaços de reabsorção profundos incompletamente preenchidos. Estes efeitos são mais significativos no osso trabecular devido à sua maior taxa de remodelação e resultam num enfraquecimento do esqueleto em regiões como as vértebras, antebraço e anca, que contêm quantidades elevadas deste tipo de tecido ósseo³⁰⁻³⁶.

Os estrogénios exercem os seus efeitos através da sua ligação a receptores específicos situados no citoplasma de células alvo. O complexo formado interactua com certas regiões da molécula de ADN, iniciando-se um processo de transcrição de que resulta uma síntese aumentada de enzimas e proteínas estruturais e subse-

quente alteração da função celular³⁷.

As células ósseas possuem receptores específicos para os estrogénios o que sugere que estas substâncias possam ter um papel importante na regulação da remodelação óssea. A ligação dos estrogénios a estes receptores parece resultar na formação e libertação de factores solúveis com acções autocrínicas e paracrínicas nas células ósseas (osteoblastos e osteoclastos), influenciando o seu recrutamento, proliferação, diferenciação e actividade metabólica³⁸⁻⁴⁰.

FACTORES LOCAIS

A remodelação óssea envolve um balanço contínuo entre a reabsorção e a formação óssea e, no adulto jovem normal, a quantidade de tecido ósseo removido pelos osteoclastos é rigorosamente substituída pelos osteoblastos. Os estudos histomorfométricos mostram que a reabsorção óssea está de algum modo acoplada com a formação óssea. Também, estudos efectuados em animais tratados com substâncias que aumentam a reabsorção óssea, como por exemplo a PTH, mostram, que para além deste efeito, se observa um aumento na formação óssea. O aumento observado na taxa de formação óssea é proporcional à taxa de reabsorção óssea, é mediado em parte por um aumento do número de osteoblastos e é um fenómeno local. Estes resultados sugerem a existência de um acoplamento entre a reabsorção óssea e a formação óssea, possivelmente mediado por factores locais.

Os resultados obtidos em estudos experimentais e *in vitro* parecem sugerir que os factores de crescimento que existem no microambiente ósseo são mediadores de uma rede de comunicação química intercelular complexa entre os osteoblastos e os osteoclastos^{5,27,28,41}.

Os mecanismos locais de regulação da remodelação óssea envolvem a actuação de factores de crescimento e citocinas, polipeptídeos que interferem com o crescimento e diferenciação celular. Algumas destas substâncias estão presentes na circulação e podem actuar como factores sistémicos (IGFs) mas, são frequentemente sintetizados por tecidos específicos nos quais funcionam como reguladores locais da actividade celular actuando de modo autocrínico e/ou paracrínico^{5,27,28,41}.

As células ósseas e outras células existentes no microambiente ósseo (células hematopoiéticas) sintetizam vários factores de crescimento. Estas substâncias têm sido isoladas a partir de extractos da matriz óssea e também do meio condicionado por culturas de células ósseas. Os factores de crescimento podem influenciar a diferenciação, mitogénese e actividade funcional das células ósseas^{27,28,41,42}.

Os estudos efectuados em culturas de células ósseas mostram que os osteoblastos produzem vários factores de crescimento. Estes peptídeos difundem para o fluido extracelular sendo alguns deles incorporados na matriz óssea durante a sua formação. Os factores de crescimento segregados são responsáveis por efeitos autocrínicos e/ou paracrínicos nas células ósseas presentes no local. Assim, imediatamente após a sua secreção, afectam o comportamento dos osteoblastos, influenciando o processo de formação óssea; actuam também na proliferação e diferenciação de pré-osteoblastos e influenciam a actividade de reabsorção de osteoclastos que se encontram na vizinhança. Os factores de crescimento depositados na matriz óssea actuam apenas após a sua libertação durante a fase de reabsorção; estas substâncias têm possibilidade de actuar de modo paracrínico, mais tarde, modulando um outro ciclo de remodelação óssea⁴³.

Os estudos *in vitro* mostram que há um elevado número de factores de crescimento que podem influenciar a remodelação óssea. Factores que parecem estimular a actividade dos osteoblastos incluem IGFs (*insulin-like growth factors*), FGFs (*fibroblast growth factors*), TGFβ (*transforming growth factor β*), PDGF (*platelet derived growth factor*) e outros peptídeos activos. A actividade osteoclástica parece ser aumentada por factores como GM-CGF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), M-CGF (*macrophage colony-stimulating factor*), TNFα (*tumor necrosis factor α*), IL1 (interleucina 1), IL6 (interleucina 6). O TGFβ e a IL4 (interleucina 4) estão descritos como factores que diminuem a reabsorção óssea^{5,27,28,41,42}.

A interacção de efeitos dos vários factores de crescimento e citocinas relativamente à proliferação e diferenciação das células ósseas é um aspecto importante a ser considerado^{44,45}.

INTERACÇÃO DE EFEITOS SISTÉMICOS E LOCAIS

As hormonas calciotrópicas têm um papel importante na regulação do metabolismo ósseo, nomeadamente, a PTH, 1,25-(OH)₂D₃, estrogénios e hormona de crescimento. Os estudos que têm sido realizados nesta área sugerem que estas hormonas podem modular a remodelação óssea a nível local, pelo menos em parte, por interferirem na síntese e libertação dos factores de crescimento e também na sua ligação a receptores específicos.

As hormonas sistémicas parecem interactuar com as células ósseas, a nível de receptor, de modo a regular o circuito de factores de crescimento e citocinas envolvidos nos mecanismos locais de regulação da remodelação

óssea^{5,39,41}. Por sua vez, há estudos que mostram que estes peptídeos podem influenciar o número de receptores para as hormonas sistémicas, nas células ósseas⁴⁶. Assim, os factores de crescimento segregados ou libertados da matriz quando da reabsorção óssea parecem ter um papel importante na regulação da resposta das células ósseas às hormonas calciotrópicas. A interacção de efeitos entre as hormonas sistémicas e os factores locais é assim um aspecto relevante na regulação do metabolismo ósseo^{27,28,46-50}.

A maior parte dos factores que regulam a remodelação óssea parecem actuar por mecanismos mediados pelos osteoblastos. Estas células parecem ser o alvo de uma variedade de hormonas calciotrópicas e factores de crescimento, mesmo para substâncias cujo efeito é visível a nível da reabsorção óssea. A ligação de substâncias activas a receptores próprios nos osteoblastos resulta na libertação de factores solúveis que actuam de modo autocrínico e/ou paracrínico na modulação do comportamento das células ósseas⁴⁶⁻⁵³. Assim, por exemplo, a PTH não actua directamente no osteoclasto, a célula responsável pela reabsorção, mas no osteoblasto, que liberta substâncias activas que induzem a actividade osteoclástica¹⁷. Alguns dos factores produzidos pelos osteoblastos por influência de factores sistémicos ficam depositados na matriz óssea durante a sua formação. Estes factores são libertados mais tarde durante a fase de reabsorção, apresentando um efeito paracrínico *tardio* na proliferação, diferenciação e actividade das células ósseas.

A variação dos níveis circulantes das hormonas calciotrópicas, em consequência de determinadas situações patológicas, resulta em alterações do metabolismo ósseo. As citocinas parecem também estar envolvidas na patogénese de várias doenças metabólicas do tecido ósseo, nomeadamente, na lesão osteolítica e perda óssea associada com os processos inflamatórios e doença periodontal⁵⁴⁻⁵⁹. A interacção entre citocinas e hormonas calciotrópicas parece ser relevante em algumas situações patológicas como por exemplo na osteólise por metástases e na hipercalemia humoral maligna⁴¹.

Os factores de crescimento e citocinas parecem representar a etapa final comum de várias cascatas de eventos que envolvem hormonas calciotrópicas e também processos inflamatórios, infecciosos e tumorais, envolvidos em alterações do metabolismo ósseo^{27,28,41}.

PERDA ÓSSEA

A remodelação óssea verifica-se durante toda a vida do indivíduo. O preenchimento completo da lacuna de reab-

sorção é de crucial importância na manutenção de um nível constante de massa óssea. A análise histomorfométrica do tecido ósseo mostra que, no adulto, se observa uma perda óssea progressiva até à velhice. O envelhecimento está associado a alterações significativas na remodelação óssea e a perda óssea observada tem provavelmente uma etiologia multifactorial^{30,60,61}.

A variação dos níveis circulantes de algumas hormonas calciotrópicas, que são próprias do processo de envelhecimento (hormona de crescimento, produção de vitamina D₃, estrogénios na mulher após a menopausa) podem afectar a produção de factores de crescimento no microambiente ósseo, resultando numa alteração dos mecanismos de regulação local da remodelação óssea^{60,62-67}.

A alteração de algumas funções fisiológicas durante o envelhecimento como, por exemplo, a diminuição de resposta imunitária, podem traduzir-se em distúrbios no metabolismo ósseo^{65,66}. A fisiologia óssea está relacionada de certo modo com o sistema imunitário, pois que, os osteoclastos e algumas células imunológicas têm a mesma origem e, também, há uma grande variedade de citocinas e interleucinas que têm um papel relevante nos mecanismos locais de regulação do metabolismo ósseo^{27,28,67}.

A alteração de resposta das células ósseas (nomeadamente, variação do número e sensibilidade dos receptores e/ou deficiência nos mecanismos intracelulares de transdução) a substâncias que interferem com a sua actividade traduzem-se por uma perturbação do seu comportamento funcional⁶⁸⁻⁷⁰. Está assim descrito que, no idoso, em determinadas circunstâncias, as células ósseas apresentam uma sensibilidade aumentada à PTH de que resulta um aumento na reabsorção óssea⁶⁸. Também, em algumas situações, observa-se uma alteração da actividade metabólica dos osteoblastos, facto que pode traduzir-se por uma variação qualitativa e quantitativa da composição da matriz óssea. Este aspecto é muito importante, pois a matriz óssea contém vários factores de crescimento sintetizados pelos osteoblastos e, assim, pode observar-se uma alteração da actividade osteoblástica e osteoclástica futura por modificação do conteúdo da matriz orgânica⁶⁹.

A perda óssea está relacionada com a frequência de activação das unidades de remodelação e também com a quantidade de tecido ósseo em cada unidade. Há assim várias possibilidades para aumentar a massa óssea. Por exemplo, a obtenção de um pequeno aumento na quantidade de tecido ósseo em cada unidade (por diminuição da reabsorção ou aumento da formação óssea) e, depois,

a amplificação deste efeito por estimulação da frequência de activação, parece constituir uma abordagem possível. A compreensão dos processos moleculares e celulares que se observam nas diferentes fases da remodelação óssea e a possibilidade da sua modulação abrem novas possibilidades para o desenvolvimento de vertentes farmacológicas a utilizar no tratamento de doenças metabólicas do tecido ósseo.

UTILIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS

O uso clínico de biomateriais para substituição do tecido ósseo tem importantes aplicações em cirurgia maxilo-facial e ortopédica, nomeadamente, na regeneração de defeitos ósseos (de desenvolvimento, cirúrgicos, traumáticos ou resultantes de processos patológicos). O sucesso da utilização de biomateriais é comprometido por vários factores locais que estão relacionados com as características do material, manipulação durante o processo cirúrgico e resposta do hospedeiro ao material implantado^{71,72}.

A compreensão dos fenómenos celulares e moleculares envolvidos na interacção tecido ósseo/biomaterial é fundamental. Esta interacção deve ser de molde a permitir a migração das células ósseas em direcção e para o interior do material e a produção de uma matriz calcificada semelhante ao osso⁷³⁻⁸⁵. As características físico-químicas do material (composição química, tamanho de partícula, porosidade, características de superfície) influenciam o processo de biocompatibilidade e de osteocondução⁸⁶⁻⁸⁸. O conhecimento das condições ou eventos que são responsáveis pela interacção das células de linhagem osteoblástica com o biomaterial (por exemplo, processo de adesão) e expressão do fenotipo osteoblástico são essenciais para o desenvolvimento de biomateriais que preencham os requisitos pretendidos. Devido ao facto de o tecido ósseo estar continuamente num processo de remodelação, constituindo um meio dinâmico, é também fundamental conhecer o papel dos osteoclastos na interface tecido ósseo/biomaterial⁸⁸⁻⁹⁰.

O biomaterial pode criar não apenas uma microarquitECTURA apropriada para o crescimento ósseo mas, também, estimular a diferenciação e o potencial osteogénico das células presentes no local. A incorporação no material de substâncias com perfil farmacodinâmico apropriado (factores de crescimento, citocinas) que promovam funções específicas das células ósseas (proliferação, síntese de proteínas, mineralização) e a sua libertação em condições farmacocinéticas adequadas pode também contribuir de forma decisiva para o processo de regeneração óssea⁹¹⁻⁹⁹. De referir também, que a presença de

fármacos com capacidade de modular a resposta do hospedeiro ao material implantado, nomeadamente, os processos inflamatório e infeccioso pós-cirúrgicos que por vezes se observam, pode revestir particular interesse¹⁰⁰⁻¹⁰⁵.

A utilização de materiais colonizados por células com potencial osteogénico parece constituir também uma metodologia promissora para se observar uma rápida reconstrução óssea local¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. A presença de factores osteoindutivos em materiais colonizados com células osteogénicas e a sua libertação local poderá representar um procedimento lógico para o desencadear da cascata de fenómenos responsáveis pela regeneração óssea.

CULTURAS DE CÉLULAS ÓSSEAS

A utilização de vários modelos de culturas de células ósseas humanas e de roedores tem contribuído para a elucidação de aspectos fisiopatológicos do metabolismo ósseo e a possibilidade da sua modulação farmacológica. Os sistemas que se utilizam incluem culturas primárias de células ósseas obtidas de osso trabecular, culturas de medula óssea, várias linhas celulares obtidas de tecido ósseo normal e também linhas celulares tumorais^{53,110-116}. Cada um dos modelos apresenta limitações próprias. A possibilidade de existirem variações inter-espécie deve ser sempre considerada quando se utilizam culturas de células provenientes de roedores. As linhas celulares tumorais podem não reflectir o verdadeiro fenotipo das células correspondentes, não transformadas^{53,113,114}. As culturas primárias de células ósseas humanas reproduzem, em princípio, mais fielmente a actividade óssea *in vivo*; contudo, podem perder o fenotipo característico quando se cultivam por tempo prolongado^{111,115,116}.

As culturas de células ósseas devem apresentar parâmetros morfológicos e funcionais característicos do fenotipo das células a estudar. A expressão de um determinado fenotipo celular em cultura depende fundamentalmente do material biológico utilizado (e da sua manipulação) e das condições de cultura, nomeadamente, meio de cultura, presença de substâncias que afectam a proliferação e diferenciação celular e tempo de cultura.

A presença de dexametasona em culturas de células ósseas parece induzir a proliferação e/ou a diferenciação de células com fenotipo osteoblástico em vários sistemas, entre os quais, culturas de medula óssea e osso trabecular (humanas e de roedores)¹¹⁵⁻¹¹⁹. Foram descritas recentemente culturas de células ósseas obtidas de explantes de osso alveolar humano que, na presença de dexametasona, apresentam níveis elevados de fosfatase alcalina e formação de áreas mineralizadas^{115,116}.

Na ausência deste composto, as culturas referidas apresentam uma actividade de fosfatase alcalina significativamente mais baixa e ausência de mineralização, nas condições experimentais utilizadas^{115,116}. A capacidade de mineralização *in vitro* é considerada um requisito fundamental para a utilização de culturas de células ósseas como modelo para o estudo do processo de formação óssea. As culturas celulares obtidas de osso alveolar humano, efectuadas em condições experimentais que favorecem a formação de uma matriz extracelular mineralizada, parecem constituir um modelo potencial para o estudo de aspectos fisiopatológicos do metabolismo deste tecido ósseo. Este aspecto reveste particular importância em Estomatologia, pois a incidência de situações patológicas que resultam em perda óssea alveolar (doença periodontal) é muito elevada¹²⁰ e, também, devido à crescente utilização de materiais para substituição do tecido ósseo e em implantologia^{121,122}.

A indução do fenotipo osteoclástico em culturas de células ósseas parece ser favorecido pela presença de substâncias como a PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e de certos factores de crescimento como, por exemplo, o GM-CSF¹²³⁻¹²⁶. As culturas de medula óssea (humana e de roedores) efectuadas na presença destes compostos apresentam actividade de fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico e formação de lacunas de reabsorção quando cultivadas em superfícies mineralizadas.

As culturas de células ósseas têm também sido utilizadas no estudo de aspectos biológicos envolvidos na interacção tecido ósseo/ biomaterial¹²⁷⁻¹³².

CONCLUSÃO

A manutenção do metabolismo ósseo normal envolve interacções complexas entre factores sistémicos e locais com os osteoclastos e os osteoblastos. A identificação dos factores de regulação local que actuam nestas células e o estudo dos seus efeitos no processo de remodelação óssea, bem como, a sua inter-relação com as hormonas calciotrópicas, contribuem para o esclarecimento dos mecanismos de regulação do metabolismo ósseo e da patofisiologia de doenças metabólicas do tecido ósseo.

BIBLIOGRAFIA

- GUYTON AC: Parathyroid hormone, calcitonin, calcium and phosphate metabolism, vitamin D, bone, and teeth. In: Textbook of Medical Physiology, 7th edition. W.B. Saunders Company 1986, pp 937-952
- BEORKITT HG, YOUNG B, HEATH JH: Wheater's functional histology. A text and colour atlas, 3rd edition. Churchill Livingstone 1993, pp 170-190
- GREEN J, KLEEMAN CR: Role of bone in regulation of systemic acid-base balance. *Kidney International* 1991; 39: 9-26
- BRONNER F: Bone and calcium homeostasis. *Neurotoxicol.* 1992; 13: 775-782
- VAANANEN HK: Mechanism of bone turnover. *Ann Med* 1993; 25: 353-359
- PARFITT AM: Quantam concept of bone remodeling and turnover: implications for the pathogenesis of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1979; 28: 1-5
- BARON R: Polarity and membrane transport in osteoclasts. *Connect. Tissue Res.* 1989; 20: 109-120
- BLAIR HC, TEITELBAUM R, GHISELLI R, GLUCK S: Osteoclastic bone resorption by a polarised vacuolar proton pump. *Science* 1989; 245: 855-857
- VALS G: Cell biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation and mode of action of osteoclasts. *Clin. Orthop.* 1988; 231: 239-271
- PIERCE AM, LINDSKOG S, HAMMARSTROM L: Osteoclast structure and function. *Electron Microsc. Rev.* 1991; 4: 1-45
- BLAIR HC, SCHLESINGER PH, PATRICK RF, TEITELBAUM SL: Recent advances forward understanding osteoclast physiology. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1993; 294: 7-22
- GEHRON RP, BIANCO P, TERMINE JD: The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation. In: Coe, F.L., Favus, M.J.: Disorders of mineral metabolism. New York: Raven Press 1992, pp 241-263
- OWEN M: Cell population kinetics of an osteogenic tissue. *J. Cell Biol.* 1963; 19: 19-32
- AARDEN EM, BURGER EH, NIJWEIDE PJ: Function of osteocytes in bone. *J. Cell Biochem.* 1994; 55: 287-299
- DELMAS PD: Markers of bone formation. In: Favus, M.: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. New York 1993, pp 108-112
- WARNER W: Hormones of homeostasis. In: Neidle, E.A., Yagiela, J.A.: Pharmacology and therapeutics for dentistry, third edition. New York: C. V. Mosby Company 1989, pp 471-483
- McSHEEHY PMJ, CHAMBERS TJ: Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 1986; 118: 824-828
- ISHIDA Y, KAWAI S: Effects of bone seeking hormones on DNA synthesis, cyclic AMP level, and alkaline phosphatase activity in cultured cells from human posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Min. Res.* 1993; 8: 1291-1300
- WALLACH S, CARSTENS JB, AVIOLI LV: Calcitonin, osteoclasts, and bone turnover. *Calcif. Tissue Int.* 1990; 47: 388-391
- MATTHEWS JL: Effect of calcitonin on bone cell ultrastructure. *Bone and Miner.* 1992; 16: 178-181
- KOZAWA O, TOKUDA H, KOTOYORI J, SUZUKI A, ITO Y, OISO Y: Modulation of prostaglandin E_2 -induced Ca^{2+} influx by steroid hormones in osteoblast-like cells. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 1993; 49: 711-714
- TOKUDA H, KOTOYORIG J, SUZUKI A, OISO Y, KOZAWA O: Effects of vitamin D_3 on signaling by prostaglandin E_2 in osteoblast-like cells. *J. Cell Biochem.* 1993; 52: 220-226
- GUYTON AC: Growth hormone. In: Textbook of Medical Physiology, 7th edition. W.B. Saunders Company 1986, pp 884-895
- BOUILLON R: Growth hormone and bone. *Horm. Res.* 1991; 36: 49-55
- SLOOTWEG MC: Growth hormone and bone. *Horm. Metab. Res.* 1993; 25: 335-343
- STRACKE HA, SCHULTZ D, MOELLER S, ROSSOL H, SCHATZ B: Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin C/IGF-I in bone organ culture. *Acta Endocrinol.*

- 1984; 107: 16-24
27. CANALIS E, MCCARTHY I, CENTRELLA M: Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Ann. Rev. Med.* 1991; 42:17-24
28. MOHAM, BAYLINK DJ: Bone growth factors. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1991; 263: 30-48
29. COPELAND KC, COLLETTI RB, DEULIN JT, McAULIFFE TL: The relationship between insulin-like growth factor 1, adiposity and aging. *Metabolism* 1990; 39: 584-587
30. GUYTON AC: Female physiology before pregnancy and the female hormones. In: *Textbook of Medical Physiology*, 7th edition. W.B. Saunders Company 1986, pp 968-991
31. WARNER W: Hormones of reproduction and sexual development. In: Neidle, E.A., Yagiela, J.A.: *Pharmacology and therapeutics for dentistry*, third edition. New York: C. V. Mosby Company 1989, pp, 484-492
32. PARFITT AM, MATHEWS CHE, VILLANEUVA AR, KLEEREKOPER M, FRAME B, RAO DS: relationship between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 1396-1409
33. RICHELSON LS, WAHNER HN, MELTON LJ, RIGGS BL: Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N. Engl. J. Med.* 1984; 311: 1273-1275
34. ERIKSEN EF, HODGSON SF, EASTELL R, CEDEL SL, O'FALLON WM, RIGGS BL: Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J. Bone Miner. Res.* 1990;5: 311-319
35. HOROWITZ MC: Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 1993; 260: 626-627
36. TURNER RT, RIGGS L, SPIELBERG TC: Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Rev.* 1994; 15: 129-154
37. LANDERS JP, SPELSBERG TC: New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogens and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Euk. Gene Exp.* 1992; 2: 19-63
38. ERIKSEN E, COLVARD D, BERG N; et al.: Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241: 84-87
39. OURSLER MJ, LANDERS BL, RIGGS BL, SPELSBERG TC: Oestrogen effects on osteoblasts and osteoclasts. *Ann. Med.* 1993; 25: 361-371
40. VERHAAR HJJ, DAMEN CA, DUURSMAS SA, SCHEVEN BAA: A comparison of the action of progestins and estrogen on the growth and differentiation of normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 1994; 15: 307-311
41. VERNEJOUL MC, COHEN-SOLAL M, ORCEL P: Bone cytokines. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1993; 5:332-338
42. HAUSCHKA PV, MAVRAKOS AE, IAFRATI MD, DOLEMAN SE, KAGSBRUM M: Growth factors in bone matrix. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 12665-12674
43. WERGEDAL JE, MOHAM S, LUNDY M, BAYLINK DJ: Skeletal growth factors and other growth factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells. *J. Bone Miner. Res.* 1990; 5: 179-186
44. KASPER KC, WERGEDAL JE, MOHAM S, LONG DL, LAU KHW, BAYLINK DJ: Interactions of growth factors present in bone matrix and bone cells: effects on DNA synthesis and alkaline phosphatase. *Growth Factors* 1990; 3: 147-152
45. YEH K-L, KANG Y-M, CHAIBI MS, XIE J-F, GRAVES DT: IL-1 and transforming growth factor b inhibit platelet-derived growth factor binding to osteoblastic cells by reducing platelet-derived growth factor a receptor expression. *J. Immun.* 1993; 150: 5625-5632
46. SCHNEIDER HG, MICHELANGELI VP, FRAMPTON RJ, et al: Transforming growth factor b modulates receptor binding of calcitropic hormones and G-protein mediated adenylate cyclase responses in osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1992; 131: 1383-1390
47. OURSLER MJ, CORTESE M, KEETING P, et al: Modulation of transforming growth factor beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology* 1991; 129: 3313-3320
48. OURSLER MJ, RIGGS BL, SPELSBERG TC: Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor b by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1993; 133: 2187-2196
49. GREENFIELD EM, GORNIK S A, HOROWITZ MC, DONAHUE HJ, SHAW SM: Regulation of cytokine expression in osteoblasts by parathyroid hormone: rapid stimulation of interleukin 6 and leukemia inhibitory factor mRNA. *J. Bone Miner. Res.* 1993; 8: 1163-1171
50. CHAUDHARY LR, AVIOLI LV: Dexamethasone regulates IL-1b and TNFa induced production in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. *Calcif. Tissue Int.* 1994; 55: 16-20
51. RIANCHO JA, ZARRABEITIA MT, OLMOS JM, AMADO JA, GONZALEZ-MACIAS J: Effects of interleukin 4 on human osteoblast-like cells. *Bone and Mineral* 1993; 21: 53-61
52. PITARU S, KOTEV-EMETH S, NOFF D, KAFFULER S, SAVION N: Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: enhanced development of mineralized bone like tissue in culture. *J. Bone Miner. Res.* 1993; 8: 919-929
53. LAJEUNESSE D: Effect of 17b-estradiol on the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone and Mineral* 1994; 24:1-16
54. CERAMI A: Inflammatory cytokines. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1992; 62: S3-S10
55. TATAKIS DN: Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J. Periodontol.* 1993; 64: 416-431
56. PAGE RC: The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 1991; 26: 230-242
57. GENCO RJ: Host responses in periodontal diseases: current concepts. *J. Periodont.* 1992; 63: 338-355
58. SEYMOUR RA, HEASMAN PA: The pathogenesis of periodontal disease. In: *Drugs, diseases, and the periodontium*. Oxford Medical Publications 1992, pp 1-10
59. KLEMETTI E, COLLIN HL, FORSS H, MARKKANEN H, LASSILA V: Mineral status of skeleton and advanced periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 1994; 21: 184-188
60. BENNET A, WAHNER HW, RIGGS BL, HINTZ RL: Insulin-like growth factors I and II: aging and bone density in woman. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984; 59:701-704
61. DELMAS PD: Biochemical markers of bone turnover I: theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. *Am. J. Med.* 1993; 95: 115-165
62. RAISZ LG: Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *New Engl. J. Med.* 1988; 318: 818-828
63. QUESEDA M, COOPMANS W, RUIZ B, ALJAMA P, JANS I, BOUILLON R: Influence of vitamin D on parathyroid function in the elderly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992; 75: 494-501
64. MARIE PJ, HOTT M, LAUNAY JM, GRAULET AM, GUERIS J: In vitro production of cytokines by bone surface-derived osteoblastic cells in normal and osteoporotic postmenopausal woman: relationship with cell proliferation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 77: 824-830

65. MURASKO DM, WEINER P, KAYE D: Decline in mitogen induced proliferation of lymphocytes with increasing age. *Clin. Exp. Immunol.* 1987; 70: 440-446
66. RIANCHO YA, ZARRABEITIA MT, AMADO JA, OLMOS JM, GONZALEZ-MACIAS J: Age related differences in cytokine secretion. *Gerontology* 1994; 40: 8-12
67. GLOWACKI J: Influence of age on human marrow. *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56: 550-551
68. LOMRI A, MARIE PJ: Bone cell responsiveness to transforming growth factor b, parathyroid hormone, and prostaglandin E₂, in normal and postmenopausal woman. *J. Bone Miner. Res.* 1990; 5: 1149-1155
69. GROESSNER-SCHREIBER B, KRUKOWSKI M, LYONS C, OSDOBY P: Osteoclast recruitment in response to human bone matrix is age related. *Mechan. of Ageing and Develop.* 1992; 62: 143-154
70. PFEILSCHIFFER J, DIEL I, PILZ U, BRUNOTTE K, NAUMANN A, ZIEGLER R: Mitogenic responsiveness of human bone cells in vitro to hormones and growth factors decreases with age. *J. Bone Miner. Res.* 1993; 8: 707-717
71. COURTNEY LI, JONES C, MOSA SM, ROBERTSON LM, SRIVASTAVA S: Biomaterials in medicine-a bioengineering perspective. *Int. J. Artif. Organs* 1993; 16: 164-171
72. PEPPAS NA, LANGER R: New challenges in biomaterials. *Science* 1994; 263: 1715-1720
73. SPECTOR M, CEASE C, TONG-LI X: The local tissue response to biomaterials. *Crit. Rev. Biocompat.* 1989; 5: 269-295
74. van BLITTERSWIJK CA, BAKKER D, HESSELING SC, KOERTEN HK: Reactions of cells at implant surfaces. *Biomaterials* 1991; 12: 187-193
75. BRUIJN JD, DAVIES JE, FLACH JS, de GROOT K, van BLITTERSWIJK CA: Ultrastructure of the mineralized tissue/calcium phosphate interface in vitro. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 1992; 252: 63-70
76. PULEO DA, BIZIOS R: Formation of focal contacts by osteoblasts cultured on orthopedic biomaterials. *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 291-301
77. SHEN X, ROBERTS E, PEEL SAF, DAVIES JE: Organic extracellular matrix components at the bone cell/substratum interface. *Cells and Mat.* 1993; 3: 257-272
78. SERRE CM, PAPILLARD M, CHAVASSIEUX P, BOIVIN G: In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. *Biomaterials* 1993; 14: 97-106
79. BAGAMBISA FB, KAPPERT HF, SCHILLI W: Interfacial reactions of osteoblasts to dental and implant materials. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 1994; 52: 52-56
80. BRUIJN JD, van BLITTERSWIJK CA, DAVIES JE: Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 89-99
81. MEYLE J, GUTIG K, NISCH W: Variation in contact guidance by human cells on a microstructured surface. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 81-88
82. YUN JK, DeFIFE K, COLTON E, et al: Human monocyte/macrophage adhesion and cytokine production on surface-modified poly(tetrafluoroethylene/hexafluoropropylene) polymers with and without protein preadsorption. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 257-268
83. EL-GHANNAM A, DUCHEYNE P, SHAPIRO IM: Bioactive material template for in vitro synthesis of bone. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 359-370
84. YUKNA R: Clinical evaluation of coralline calcium carbonate as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects. *J. Periodontol.* 1994; 65: 177-185
85. HILLSLEY MV, FRANGOS JA: Review: Bone tissue engineering: The role of interstitial fluid flow. *Biotechnol. and Bioengin.* 1994; 43: 573-581
86. van EEDEN SP, RIPAMONTI U: Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery. *Plastic and Reconst. Surg.* 1994; 93: 957-966
87. CHESMEL KD, BLACK J: Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. I. A novel in vitro model system. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 1089-1099
88. GOMI K, BRUIJN JD, OGURA M, DAVIES JE: The effect of substratum roughness on osteoclast-like cells in vitro. *Cells and Mat.* 1993; 3: 151-160
89. BASLÉ MF, CHAPPARD D, GRIZON F, et al: Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif. Tissue Int.* 1993; 53: 348-356
90. BRUIJN JD, BOVELL YP, DAVIES JE, van BLITTERSWIJK CA: Osteoclastic resorption of calcium phosphates is potentiated in postosteogenic culture conditions. *J. Biomed. Mat. Res.* 1994; 28: 105-112
91. LYNCH SE, BUSER D, HERNANDEZ RA, et al: Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J. Periodontol.* 1991; 62: 710-716
92. RIPAMONTI U: Delivery systems for bone morphogenetic proteins. A summary of experimental studies in primate models. *Ann. Chir. Gynaecol. Suppl.* 1993; 207: 13-24
93. HERR G, WAHL D, KUSSWETTER W: Osteogenic activity of bone morphogenetic protein and hydroxyapatite composite implants. *Ann. Chir. Gynaecol.* 1993; 82: 99-108
94. KAWAIT T, MIEKI A, OHNO Y, et al: Osteoinductive activity of composites of bone morphogenetic protein and pure titanium. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1993; 290: 296-305
95. MEIKLE MC, MAK W-Y, PAPAIOANNOU S, et al: Bone-derived growth factor release from poly(a-hydroxyl acid) implants in vitro. *Biomaterials* 1993; 14: 177-183
96. HOLLINGER J: Factors for osseous repair and delivery: part I. *J. Craniofac. Surg.* 1993; 4: 102-108
97. HOLLINGER J: Factors for osseous repair and delivery: part II. *J. Craniofac. Surg.* 1993; 4: 135-141
98. HOLLINGER JO, SEYFER AE: Bioactive factors and biosynthetic materials in bone grafting. *Clin. Plast. Surg.* 1994; 21: 415-418
99. COOK SD, BAFFES GC, WOLFE MW, SAMPATH TK, RUEGER DC: Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin. Orthop.* 1994; 301: 302-312
100. HUO MH: The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J. Orthop. Res.* 1991; 9: 383-390
101. HUNT JA, WILLIAMS DF: Modification of the soft tissue response to implanted materials through the use of an anti-inflammatory drug. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 1992; 3: 160-169
102. YAMAMURA K, IWATA H, YOTSUYANAGI T: Synthesis of antibiotic-loaded hydroxyapatite beads and an in vitro drug release testing. *J. Biomed. Mat. Res.* 1992; 26: 1053-1064
103. MICLAU T, DAHNERS LE, LINDSEY RW: In vitro pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials. *J. Orthop. Res.* 1993; 11: 627-632
104. OTSUKA M, MATSUDA Y, KOKUBO T, YOSHIHARA S, NAKAMURA T, YAMAMURO T: Drug release from a novel self-setting bioactive glass bone cement containing cephalixin and its physico-

- ochemical properties. *J. Biomed. Mat. Res.* 1995; 29: 33-38
105. JEFFCOAT MK, REDDY MS, WANG IC, MEUNINGHOFF LA, FARMER JB, KOTH DL: The effect of systemic flurbiprofen on bone supporting dental implants. *JADA*, 1995; 126: 305-311
106. GOSHIMA J, GOLDBERG VM, CAPLAN AL: The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 1991; 262: 298-311
107. HAYNESWORTH SE, GOSHIMA J, GOLDBERG VM, CAPLAN AL: Characterisation of cells with osteogenic potencial from human marrow. *Bone* 1992; 13:81-88
108. OHGUSHI H, DOHI Y, TAMAI S, TABATA S: Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxiapatite ceramics. *J. Biomed. Mat. Res.* 1993; 27: 1401-1407
109. GUNDLE R, JOYNER CJ, TRIFFITT JT: Human bone tissue formation in diffusion chamber culture in vivo by bone derived cells and marrow stromal fibroblastic cells. *Bone* 1995, 16: 597-601
110. MUNDY GR, ROODMAN GD, BONEWALD LF, OREFFO ROC, BOYCE B: Assays for bone resorption and bone formation. In: *Peptide Growth Factors Part C. Methods in Enzymology* 1991; 132: 823-831
111. SCHMIDT R, KULBE KD: Long term cultivation of human osteoblasts. *Bone and Mineral* 1993; 20: 211-221
112. STEIN GS, LIAN JB: Molecular mechanisms mediated proliferation-differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype: Update 1995. *Endocrine reviews* 1995; 4: 290-297
113. KEETING PE, SCOTT RE, COLVARD DS, et al.: Development and characterisation of a rapid proliferating, well-differentiated cell line derived from normal adult human osteoblast-like cells transfected with SV40 large T antigen. *J. Bone Min. Res.* 1992; 7: 127-132
114. HARRIS SA, ENGER RJ, RIGGS BL, SPELSBERG TC: Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J. Bone Min. Res.* 1995; 10: 178-186
115. FERNANDES MH, COSTA MA, CARVALHO GS: In vitro osteogenesis by human alveolar bone cells in the presence of dexamethasone. *Pharmacol. Res.* 1995; 31 (suppl): 8
116. FERNANDES MH, COSTA MA, CARVALHO GS: Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 1996, em publicação.
117. MANIATOPOULOS C, SODEK J, MELCHER AH: Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* 1988; 254: 317-330
118. CHENG S-L, YANG JW, RIFINS L, ZHANG SF, AVIOLI LV: Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro. Induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994; 134: 277-286
119. BERESFORD JN, JOYNER CJ, DEVLIN C, TRIFFITT JT: The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteogenic differentiation of human stromal cells in vitro. *Arch. Oral Biol.* 1994, 39: 941-947
120. SEYMOUR RA, HEASMAN PA: *Drugs, diseases, and the periodontium.* Oxford Medical Publications 1992
121. MEFFERT RM, LANGER B, FRITZ ME: Dental implants: a review. *J. Periodontol.* 1992; 63: 859-870
122. MISCH CE, DIETSH F: Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.* 1993; 2: 158-167
123. LIGGETT W, SHEVDE N, ANKLESARIA P, SOHONI S, GREENBERGER J, GLOWACKI J: Effects of macrophage colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor on osteoclastic differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 1993; 11: 398-411
124. LEE TH, FEVOLV KL, MUGURUMA Y, LOTTSFELDT JL, LEE MY: Relative roles of osteoclast colony-stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor in the course of osteoclast development. *Exp. Hematol.* 1994; 22: 66-73
125. BISKOBING DM, NANES MS, RUBIN J: 1,23-Dihydroxyvitamin D₃ and phorbol myristate acetate synergistically increase carbonic anhydrase-II expression in a human myelomonocytic cell line. *Endocrinology* 1994; 134: 1493-1498
126. SUDA T, TAKAHASHI N, MARTIN TJ: Modulation of osteoclast differentiation: update 1995. *Endocrine reviews* 1995 266-270
127. KIRKPATRICK CJ, MITTERMAYER C: Theoretical and practical aspects of testing potential biomaterials in vitro. *J. Mat.: Mat. Med.* 1990; 1: 9-13
128. KIRKPATRICK CJ: A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro. *Regulatory Affairs* 1992; 4: 13-22
129. PIZZOFERRATO A, CIAPETTI G, STEA S, et al: Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin. Mat.* 1994; 15: 173-190
130. BIZIOS R: Mini-review: osteoblasts: an in vitro model of bone-implant interactions. *Biotechnol. and Bioeng.* 1994; 43: 582-585
131. TOMÁS H, CARVALHO GS, FERNANDES MH, FREIRE AP, ABRANTES LM: The use of rat, rabbit or human bone marrow derived cells for cytocompatibility evaluation of metallic elements. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 1996, em publicação.
132. TOMÁS H, CARVALHO GS, FERNANDES MH, FREIRE AP, ABRANTES LM: Effects of Co-Cr corrosion products and corresponding separate metal ions on human osteoblast-like cell cultures. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 1996; 7: 291-296 .