



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO DE TECIDOS
PERIODONTAIS**

Trabalho submetido por

Ana Cláudia Ribeiro Carrasco

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2017



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO DE TECIDOS
PERIODONTAIS**

Trabalho submetido por
Ana Cláudia Ribeiro Carrasco
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Pedro Abecasis

Outubro de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Pedro Abecasis, como aluna e agora orientanda, pelo de trabalho, dedicação, orientação e disponibilidade, ajudando-me a concluir mais uma etapa da minha vida, etapa esta uma das mais importantes a conquistar.

À Mafalda dos Santos Vilhena, pela ajuda na escolha do tema. A sua experiência, aconselhamento, apoio e carinho foram muito importantes para mim, sendo um enorme pilar.

Agradecer aos meus pais pelo trabalho incansável e espetacular que tiveram comigo não só agora, mas ao longo de toda a minha existência, pela sua formação e princípios que tanto me ajudaram ao longo destes 5 anos.

À minha família, que em parte nunca me deixaram desistir do meu foco.

Ao Tiago, agradeço toda a paciência, carinho, amor e motivação incondicional.

Aos meus amigos e colegas de curso, que acreditaram em mim e me apoiaram neste trabalho, motivando e alegrando-me. Foram longos 5 anos de luta e alguns sacrifícios, camaradagem e amizade, dos quais levo comigo muitas recordações.

RESUMO

A evolução na periodontologia tem sido uma constante ao longo dos últimos anos. Esta evolução somente é possível com a compreensão dos processos biológicos e patológicos, com o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que promovem melhorias significativas na reabilitação oral.

Na área de periodontologia a história é marcada pela reconstrução anatômica e funcional dos tecidos periodontais. Ao longo dos anos surgiram várias técnicas de regeneração dos tecidos periodontais, como a regeneração óssea guiada, proteínas derivadas da matriz de esmalte, plasma rico em plaquetas e enxertos ósseos.

A importância dos fatores de crescimento no processo de regeneração dos tecidos periodontais tem ganho especial relevância pela compreensão do seu mecanismo de ação na cascata de eventos que leva à regeneração dos tecidos e acelera o processo de cicatrização. Por outro lado, atualmente já existem avanços em novas tecnologias para a regeneração dos tecidos periodontais como a aplicação de células estaminais.

Apesar de todos os avanços nesta área existe ainda muito a explorar, por um lado importa compreender melhor até que ponto as células estaminais podem ser aplicadas na terapia de lesões periodontais, por outro lado é preciso ainda recuar e compreender aprofundadamente os mecanismos de ação das terapias já existentes.

Palavras chave: periodontologia; regeneração tecidos; fatores de crescimento; células estaminais

ABSTRACT

The evolution in periodontology has been a constant throughout the last years. This evolution is only possible with the understanding of biological and pathological processes, with the development of new therapeutic modalities that promote significant improvements in oral rehabilitation.

In the area of periodontics the history is marked by the anatomical and functional reconstruction of the periodontal tissues. Throughout the years, several techniques of regeneration of periodontal tissues have emerged, such as guided bone regeneration, enamel matrix derived proteins, platelet rich plasma and bone grafts.

The importance of growth factors in the regeneration process of periodontal tissues has gained special relevance by understanding its mechanism of action in the cascade of events that leads to regeneration of tissues and accelerates the healing process. On the other hand, there are now advances in new technologies for the regeneration of periodontal tissues such as the application of stem cells.

In spite of all the advances in this area there is still a lot to be explored - on the one hand it is important to understand better to what extent the stem cells can be applied in the therapy of periodontal lesions, on the other hand it is still necessary to go back and understand in depth the mechanisms of action of the therapies already existing.

Keywords: periodontics; regeneration fabrics; growth factors; Stem Cells

ÍNDICE GERAL

Resumo	1
Abstract	3
Introdução	8
Desenvolvimento	10
1. Composição e função do tecido ósseo	10
1.1. Osteoblastos	13
1.2. Osteoclastos	15
1.3. Osteócitos	17
2. Osteogénese	19
2.1. Vias de sinalização dos osteoblastos.....	21
2.2. Vias de sinalização dos osteoclastos	31
3. Fatores de crescimento e plaquetas	38
4. Técnicas de regeneração óssea	41
4.1 – Regeneração óssea guiada.....	43
4.2 – Proteínas derivadas da matriz de esmalte.....	46
4.3 – Plasma rico em plaquetas	48
4.4 – Enxertos ósseos	49
5. Fatores de crescimento na Periodontologia	51
5.1 – Novas abordagens terapêuticas	54
Conclusão	56
Bibliografia	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de cortes verticais das várias regiões ósseas e sua espessura. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).....	12
Figura 2 – Representação de osteócitos, presentes no osso mineralizado em comunicação com os osteoblastos na superfície óssea através dos canaliculos. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).....	14
Figura 3 - Representação de uma área de osso em que está a ocorrer formação óssea. Os osteoblastos estão a produzir matriz óssea. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).....	14
Figura 4 - Representação de reabsorção ativa e capacidade de adesão à superfície dos osteoclastos. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).....	16
Figura 5 - Representação de uma unidade óssea em remodelação. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).....	16
Figura 6 - Representação de como os osteócitos mantêm contato entre si, com o auxílio dos seus prolongamentos citoplasmáticos por intermédio dos canaliculos. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).....	18
Figura 7 - Representação das vias de sinalização Wnt. (Fonte: Maeda, Takahashi & Kobayashi, 2013).....	26
Figura 8 - Representação da via de sinalização da Wnt não canónica. (Fonte: Piters, Boudin, & Van Hul, 2008).	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP - Fosfatase Alcalina

BMP – Proteínas Ósseas Morfogénicas

DHh - *Desert Hedgehog*

FDA – Food and Drugs Administration

IGF - Insulin Growth Fator

ITAM - *ImmunorRceter Tyrosinebased Activation Motif*

JNK - Quinase c-Jun N-terminal

LAP - Proteína Associada à Latência

MAPK - Aelective Mitogen Activated Protein Kinases

MMPs - Metaloproteases de Matriz

PPAR γ - Peroxisome Proliferator Activated Recetor γ

Runx2 - Fator de Transcrição 2 Relacionado com *runt*

Wnt - *Wingless-int*

INTRODUÇÃO

A engenharia dos tecidos dentários tem sofrido uma evolução considerável graças à evolução de áreas como a biologia celular e molecular, fundamentais para o desenvolvimento de técnicas regenerativas. As técnicas regenerativas apresentam diferentes potencialidades de acordo com o tipo de tecido e a sua aplicação em tecidos como músculos e estruturas nervosas e mais reduzida quando comparada com tecidos conjuntivos (Kaigler, Cirelli & Giannobile, 2008).

O tecido ósseo revela uma capacidade regenerativa intermédia relativa essencialmente pela sua estrutura funcional, isto é, tanto as células que constituem o tecido como as células regenerativas têm origem mesenquimatosa, pelo que perpétua a dinâmica remodeladora, marcada pela justaposição constante de osteoblastos e a reabsorção por osteoclastos (Thesleff & Tummers, 2003). A matriz óssea possui capacidade regenerativa intrínseca por se tratar de uma matriz rica em fatores de crescimento, que permitem a diferenciação de células estaminais em osteoblastos (Thesleff & Tummers, 2003).

A American Academy of Periodontology (AAP, 2005) afirma que a regeneração dos defeitos ósseos e periodontais é a área de eleição da periodontologia e da cirurgia oral. Por sua vez, a regeneração é definida como a reconstituição de um tecido lesado ou perdido, ao contrário da reparação onde a cicatrização não consegue restaurar integralmente a arquitectura anatomofisiológica do tecido sujeito à agressão (AAP, 2005; Bashutski & Wang, 2009; Kaigler, Cirelli & Giannobile, 2008).

Na histologia, a regeneração periodontal surge como a reorganização dos tecidos de suporte dentário, incluindo osso alveolar, ligamento periodontal e cimento da superfície radicular exposta à patologia (AAP, 2005). Bashutski e Wang (2009) definem como a união do tecido conjuntivo ou epitelial com a superfície radicular após uma perda da inserção, onde os tecidos retomam ao seu estado original.

Em condições fisiológicas normais as células com capacidade regenerativa migram rapidamente para a porção mais apical da superfície radicular instrumentada, determinando o tipo de adesão, ou seja, a reparação. De forma a que este fenómeno não ocorra são utilizados diversos materiais como membranas de barreira, enxertos e implantes que funcionam como possíveis terapêuticas regenerativas que promovem a

proliferação de células com capacidade regenerativa e excluem as células indesejadas, como as células epiteliais (Bashutski & Wang, 2009).

Diversos estudos têm demonstrado a eficácia da regeneração dos tecidos periodontais através da aplicação de técnicas convencionais de regeneração, como a regeneração óssea guiada, as proteínas derivadas da matriz de esmalte, o plasma rico em plaquetas e os enxertos ósseos, ou a combinação destas técnicas (Simsek et al., 2012).

Mesmo com os bons resultados verificados, estes por vezes são variáveis e imprevisíveis, pelo que continua a apostar-se na investigação de novas técnicas para a regeneração tecidular. Algumas das novas terapias propostas são baseadas na utilização de células estaminais, isto é, células indiferenciadas com capacidade de autorenovação e gerar diversas linhas celulares, dependendo do estímulo que recebem (Simsek et al., 2012).

Com o presente trabalho pretende-se avaliar os fatores de crescimento associados à regeneração óssea periodontal, abordando as técnicas atualmente utilizadas para a regeneração periodontal. Para tal foi efetuada uma revisão bibliografia estruturada em cinco grandes capítulos. Inicialmente irá ser abordada a composição e função do tecido ósseo, seguida do processo de osteogénese. Posteriormente, serão desenvolvidas as técnicas de plaquetas e fatores de crescimento, bem como as técnicas de regeneração óssea e, por fim, a aplicação dos fatores de crescimento em periodontologia.

DESENVOLVIMENTO

1. COMPOSIÇÃO E FUNÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que é constituído por células de uma matriz extracelular com a característica única de mineralizar. A dureza deste tecido advém da mineralização da matriz, pelo que é capaz de desempenhar funções importantes de sustentação e proteção. Já a matriz colagénica confere ao tecido alguma maleabilidade, fornecendo alguma possibilidade de extensão e flexão (Judas et al., 2012).

A matriz óssea é o maior reservatório de iões minerais, essencialmente cálcio e fósforo, agindo de forma activa na manutenção da homeostase dos níveis sanguíneos de cálcio, bem como em todos os fluidos tecidulares (Judas et al., 2012).

Em condições fisiológicas normais apresenta um equilíbrio estável na função de suporte estrutural e de reserva metabólica, mas quando esse equilíbrio é alterado a função estrutural é passada para segundo plano para favorecer a função metabólica (Judas et al., 2012).

O tecido ósseo é uma estrutura altamente dinâmica, este cresce, remodela-se e mantém-se activo ao longo de todo o desenvolvimento. O tecido ósseo reorganiza-se pela ação de diferentes células, com formas e funções diferentes que, globalmente, constituem a série osteoblástica e osteoclástica, responsáveis pela formação, reabsorção, reparação e manutenção da microarquitetura óssea (Judas et al., 2012).

De forma a manter a massa óssea constante das várias células, tais como os osteoblastos e osteoclastos, que se encontrem associados no tempo e no espaço, sob o ponto de vista funcional, é necessário que exista uma elevada coordenação e integração dos eventos celulares (Judas et al., 2012).

A nível celular, o tecido ósseo é apenas constituído por duas linhagens celulares, sendo que as células apresentam diferentes formas e designações, de acordo com a sua morfologia, atividade e localização na matriz calcificada. As duas linhas celulares são a osteoblástica e osteoclástica (Judas et al., 2012). Enquanto a primeira é responsável pelo processo de formação da matriz óssea, a linha osteoclástica encontra-se relacionada com a sua reabsorção.

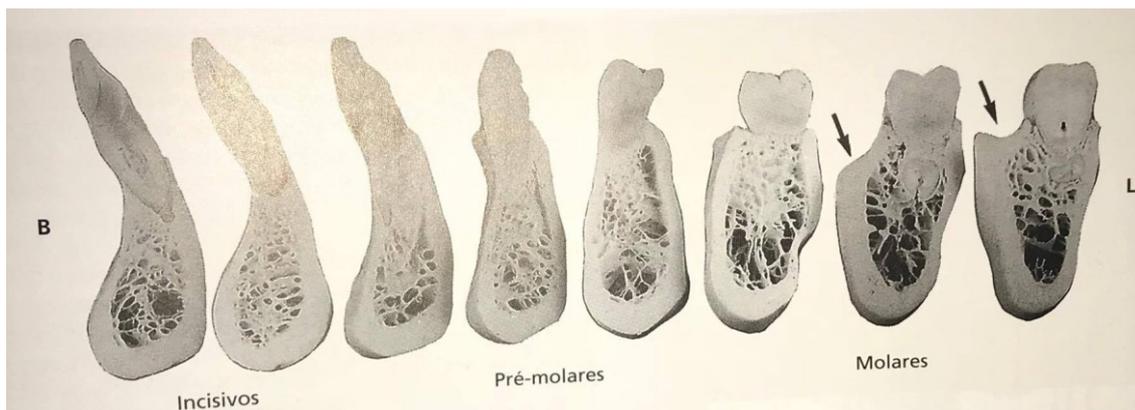
Na diferenciação, as células mesenquimatosas transformam-se em osteoblastos maduros, conhecendo-se alguns dos genes e fatores de transcrição e regulação genética envolvidos em todo o processo. Um dos genes que é sempre ativo na diferenciação das células da linha osteoblástica é o gene *Cbfa1* (*core-binding factor family 1*) que codifica o fator de transcrição pelo qual ocorre a expressão de proteínas específicas da matriz óssea (Judas et al., 2012).

O processo de formação de osteoblastos também é influenciado por diversos fatores de crescimento que actuam pela acção reguladora do *Cbfa 1*. As proteínas morfogenéticas do osso apresentam a capacidade de iniciar a cascata de eventos, que irá formar a matriz óssea, pelo que são indutoras dos processos de osteogénese pela estimulação de células mesenquimatosas em células osteoblásticas. Mais ainda, estes fatores são aproveitados para a promoção da formação óssea, atribuindo capacidades osteoindutivas a diversos materiais de substituição óssea (Judas et al., 2012).

Nas áreas muito vascularizadas a diferenciação das células mesenquimatosas com potencial osteogénico conduz ao surgimento de osteoblastos e de matriz óssea. Já em áreas pouco vascularizadas estas células dão origem a condroblastos ou até fibroblastos, por se tratarem de áreas com baixos níveis de oxigénio (Judas et al., 2012).

A linhagem osteoblástica tem quatro subpopulações, os pré-osteoblastos, osteoblastos maduros, células de revestimento ósseo e osteócitos, representando estádios funcionais diferentes da mesma célula.

Apesar das células mesenquimatosas apresentarem um elevado índice mitótico a sua expressão de proteínas é reduzida. Os pré-osteoblastos são tidos como as células precursoras mas comprometidas na linha osteoblástica, tratando-se de uma fase intermédia da diferenciação. Regra geral, estas células encontram-se nas superfícies de formação óssea e tem uma baixa capacidade proliferativa, porém progressivamente vão adquirindo características que marcam um fenótipo osteoblástico (Judas et al., 2012).



Legenda: B – Parede óssea das faces vestibulares; L – Parede óssea das faces linguais

Figura 1 – Representação de cortes verticais das várias regiões ósseas e sua espessura. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).

1.1. Osteoblastos

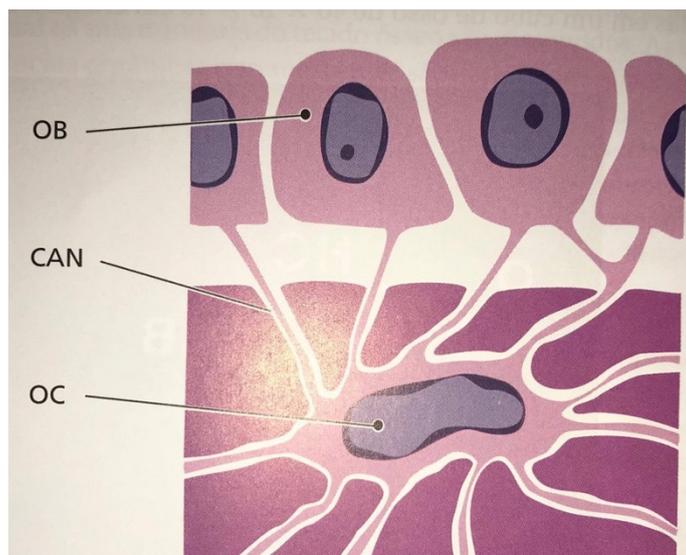
Estas são células diferenciadas que são responsáveis pela produção de matriz óssea, com secreção de colagénio e substância fundamental, localizando-se na extremidade do osso em formação. Os osteoblastos encontram-se também envolvidos na calcificação da matriz pela secreção de pequenas vesículas ricas em fosfatase alcalina para o interior da matriz durante a sua produção. A fosfatase alcalina degrada o pirofosfato, pelo que funciona como estabilizadora, e simultaneamente aumenta o fosfato no local para posterior cristalização. Tanto durante o crescimento como na reparação do osso adulto, os osteoblastos secretam vesículas ricas em cálcio para o osso em calcificação (Jonhson, 2000).

Os osteoblastos apenas atingem a maturidade quando atingem a superfície óssea, tratando-se, nesta fase, de células cúbicas, muito polarizadas e dispostas em paliçada. Apesar de não apresentarem capacidade de divisão, os osteoblastos maduros são metabolicamente muito activos, sendo responsáveis pela síntese de múltiplos fatores de crescimento que ficam incorporados na matriz óssea, por exemplo (Judas et al., 2012).

Os osteoblastos apresentam prolongamentos que se projetam para a matriz óssea e comunicam com os prolongamentos dos osteócitos, estabelecendo desta forma um relacionamento entre os osteoblastos ativos na superfície óssea e os osteócitos no meio da matriz calcificada (Judas et al., 2012).

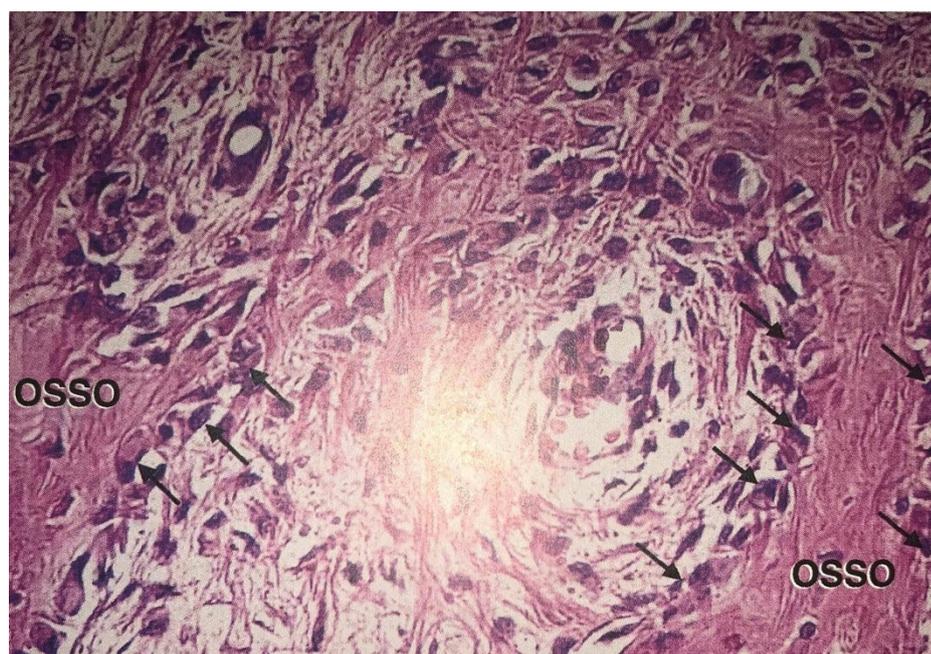
Após o seu período de secreção ativa, os osteoclastos tomam uma forma achatada e transformam-se em células de revestimento ósseo ou osteócitos, podendo mesmo desaparecer da área de formação óssea por apoptose (Judas et al., 2012).

Quando o osteoblasto se envolve completamente na matriz óssea calcificada ficando preso em cavidades, as lacunas ou osteoplastos, diferenciando-se em osteócitos (Judas et al., 2012).



Legenda: OB – Osteoblastos; CAN – Canaliculos; OC - Osteócitos

Figura 2 – Representação de osteócitos, presentes no osso mineralizado em comunicação com os osteoblastos na superfície óssea através dos canaliculos. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).



Legenda: As setas representam osteoblastos

Figura 3 – Representação de uma área de osso em que está a ocorrer formação óssea. Os osteoblastos estão a produzir matriz óssea. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).

1.2. Osteoclastos

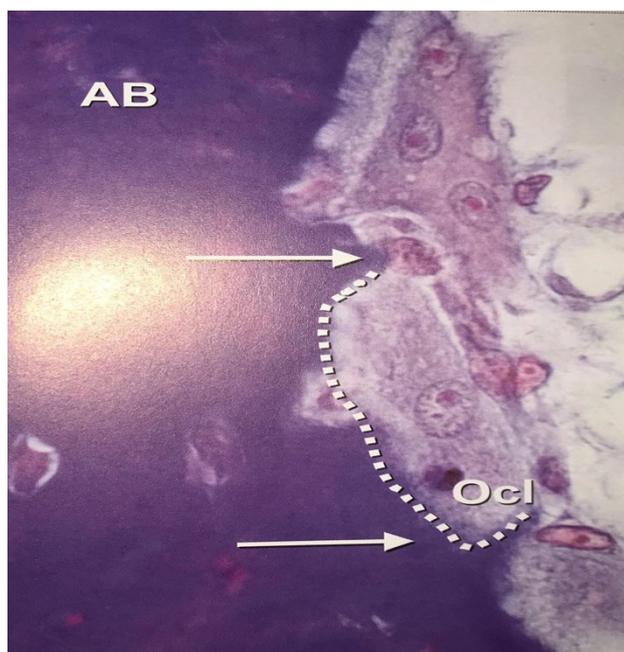
Os osteoclastos, células polinucleadas grandes que resultam da junção de células mononucleadas, são responsáveis pela reabsorção óssea. Atualmente considera-se que os precursores dos osteoblastos surgem na medula óssea e migram através da corrente sanguínea a partir do timo e outros tecidos endoteliais para os locais de reabsorção. Por sua vez, estes atraem os osteoclastos através de produtos parcialmente degradados do osteóide (Jonhson, 2000).

A parte do osteoclasto em contacto com o osso designa-se de borda estriada por se apresentar altamente pregueada, sendo que percorre toda a superfície do osso alterando a sua configuração enquanto liberta ácidos e enzimas hidrolíticas que dissolvem a matriz proteica e os cristais minerais (Jonhson, 2000).

Quando a reabsorção se encontra completa os osteoclastos são inativados e perdem os núcleos, havendo a uma quebra da célula polinucleada gigante, voltando a tornar-se em células mononucleadas (Jonhson, 2000).

A reabsorção em si é um fenómeno muito organizado e sequencial formado por duas fases consecutivas. Inicialmente ocorre um processo de acidificação através da produção de H^+ e Cl^- e dissolução dos cristais de hidroxiapatite, que constituem a fase mineral da matriz óssea. Posteriormente, ocorre a degradação completa da fase orgânica através de várias enzimas proteolíticas, as catepsinas e metaloproteínas da matriz (Judas et al., 2012).

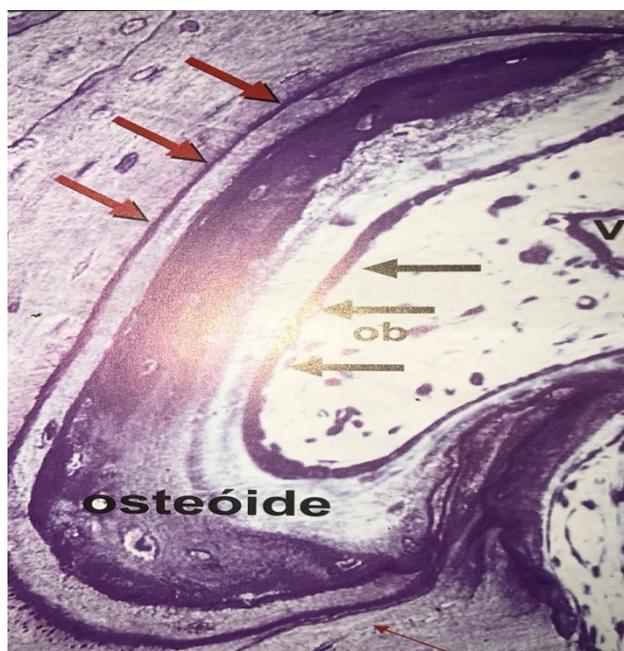
Por conseguinte, os osteoclastos são as células com mais responsabilidade na dinâmica dos processos de remodelação óssea.



Legenda: AB – Actividade osteoclástica na superfície do osso alveolar; Ocl – Osteoclastos;

Linha de pontos – Lacunas de Howship

Figura 4 – Representação de reabsorção ativa e capacidade de adesão à superfície dos osteoclastos. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).



Legenda: OB – Osteoblastos; As setas – Linha reversa (indica em que nível está a reabsorção óssea) ;

V – Estruturas vasculares

Figura 5 – Representação de uma unidade óssea em remodelação. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).

1.3. Osteócitos

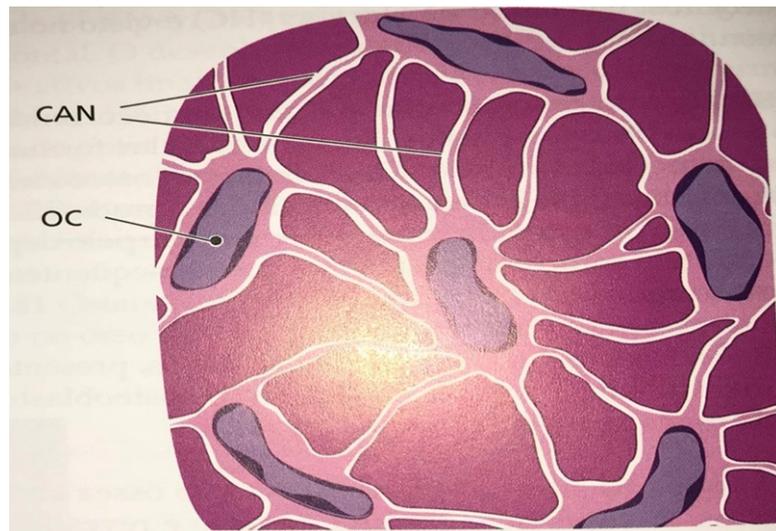
Os osteócitos apresentam uma organização tridimensional muito complexa, colocados estrategicamente e, por norma, espaçados no interior da matriz mineralizada. Estas células encontram-se nas lacunas ósseas e são muito ramificadas, comunicando entre si e com as células da superfície óssea pela rede de canaliculos. Nesta rede a troca de nutrientes e outras substâncias é efetuada pelos prolongamentos (Judas et al., 2012).

Os osteócitos são as células mais numerosas, fenómeno que, aliado à sua elevada organização e disposição, permite que estas células captem as alterações da matriz óssea e os estímulos mecânicos que atuam sobre o osso, funcionando como mecanosensores (Judas et al., 2012).

A mecanotransdução, mecanismo pelo qual as forças mecânicas regulam os processos celulares, trata-se da conversão de um sinal mecânico, como força, numa resposta celular de natureza bioquímica. No tecido ósseo, os osteócitos são as células recetoras e as células efectoras são os osteoblastos e osteoclastos (Judas et al., 2012).

Em condições fisiológicas verifica-se uma relação e integração entre os estímulos mecânicos e as respostas da célula, numa tentativa de sobrevivência e funcionalidade dos osteócitos (Judas et al., 2012).

A remodelação reflete as respostas celulares onde os osteócitos são tidos como os vigilantes das alterações do tecido ósseo (Judas et al., 2012).



Legenda: CAN– Canaliculos com longos prolongamentos citoplasmáticos; OC – Osteócitos

Figura 6 – Representação de como os osteócitos mantêm contato entre si, com o auxílio dos seus prolongamentos citoplasmáticos por intermédio dos canaliculos. (Fonte: Lindhe, Karring & Araújo, 2008).

2. OSTEOGÉNESE

O desenvolvimento ósseo inicia-se ainda na fase fetal através de duas vias, a ossificação membranosa e a ossificação endocondral. Esta classificação tem como base o tecido de origem que daí advém, tecido conjuntivo ou cartilagem, respetivamente. Ambas as vias iniciam-se com a produção de osso reticular que posteriormente é remodelado, processo que deixa o osso formado semelhante em ambas as vias (Seeley, Stephens & Tate, 2000).

Na ossificação membranosa ocorre por volta da 5ª semana de gestação, nesta verifica-se a formação de uma membrana de tecido conjuntivo, delicada e rica em fibras de colagénio, disposta de forma aleatória. A ossificação propriamente dita verifica-se por volta da 8ª semana de desenvolvimento e apenas termina por volta dos 2 anos de idade, após as células mesenquimatosas, que inicialmente originaram a membrana de tecido conjuntivo, se transformassem em células osteoprogenitoras e, posteriormente, em osteoblastos ativos. Nesta fase a matriz óssea produzida rodeia os osteoblastos que se transformam em osteócitos, formando muitas trabéculas de osso reticuladas de pequenas dimensões. Com a formação de trabéculas os osteoblastos produzem mais osso, alongando estas, sendo que é com a formação e aproximação das trabéculas que se forma o osso esponjoso (Seeley, Stephens & Tate, 2000).

Nos espaços das trabéculas encontram-se células especializadas na formação da medula óssea vermelha. As células da parte exterior do osso sofrem diferenciação e formam o perióstio, já os osteoblastos do perióstio contribuem para a formação do osso compacto pela deposição de matriz óssea, findando com a ossificação membranosa que produz ossos cuja fase externa do osso é compacta e interior esponjoso, como é o caso dos ossos cranianos, as fontanelas (Seeley, Stephens & Tate, 2000).

Por sua vez, a ossificação endocondral inicia-se na 8ª semana de gestação com o tecido cartilágneo. As células mesenquimatosas transformam-se em condroblastos para iniciar o processo de ossificação endocondral. Neste processo os condroblastos formam um modelo de cartilagem que serve de molde ao osso e que já apresenta uma forma semelhante ao osso. Enquanto a matriz óssea rodeia os condroblastos estes transformam-se em condrócitos, sendo que o pericôndrio forma-se em torno do modelo de cartilagem, excetuando os locais onde são rodeados pela articulação, existindo uma continuidade entre o pericôndrio e o tecido que posteriormente forma a cápsula articular (Seeley, Stephens & Tate, 2000).

As células osteoprogenitoras localizadas no pericondrio transformam-se em osteoblastos durante a invasão dos vasos sanguíneos no pericondrio, envolvendo o modelo de cartilagem. Com a produção de tecido ósseo pelos osteoblastos o pericondrio transforma-se em perióstio pela produção de osso compacto à superfície, com a formação de um colar ósseo ou bainha. Este modelo acompanha o aumento das dimensões pelo crescimento aposicional e intersticial da cartilagem e com a hipertrofia dos condrócitos situados no centro do modelo e da mineralização da matriz em torno das células com carbonato de cálcio, originando cartilagem calcificada (Seeley, Stephens & Tate, 2000).

Nas partes calcificadas os condrócitos morrem, formando lacunas na cartilagem que permitem a passagem de vasos sanguíneos que transportam osteoblastos e osteoclastos do perióstio para as lacunas. Os osteoblastos produzem osso na cartilagem calcificada com a promoção da formação de trabéculas ósseas que possibilitam a transformação da cartilagem calcificada em osso esponjoso na diáfise. Todo este processo é denominado de centro de ossificação primário (Seeley, Stephens & Tate, 2000).

Ao longo do desenvolvimento ósseo ocorre também o crescimento do modelo de cartilagem. Na remodelação óssea o osso reticular é convertido em osso lamelar, configurando o osso. Neste processo os osteoclastos são responsáveis pela promoção do tecido ósseo no canal medular procurando formá-lo pela especialização de células *in loco* para formação da medula óssea vermelha (Seeley, Stephens & Tate, 2000).

Nos ossos longos o centro de ossificação primário é na diáfise e a ossificação secundária ocorre nas epífises. Os processos que ocorrem nas epífises são semelhantes à ossificação primária modificando-se os espaços da epífise que não se alargam para acolher o canal medular, os centros de ossificação secundária ocorrem somente um mês antes do nascimento na tíbia, úmero e fêmur enquanto os centros primários surgem durante o desenvolvimento fetal (Seeley, Stephens & Tate, 2000). A substituição de toda a cartilagem pelo osso ocorre quando esta é substituída, exceptuando nas superfícies auriculares e placas epifisárias (Seeley, Stephens & Tate, 2000).

Todo o processo de osteogénese é influenciado por diversos fatores. Os fatores genéticos são determinantes para toda a formação do esqueleto humano, mas outros fatores também influenciam o processo como fatores enzimáticos, farmacológicos e minerais que afetam o crescimento (Phipps, Sands & Marek, 2003).

2.1. Vias de sinalização dos osteoblastos

A produção e diferenciação dos osteoblastos é regulada por várias vias de sinalização, como a via de sinalização Hedgehog, PTH, PDGF, IGF, FGF, Wnt, Eferina (Eph) e pela super família TGF-B (Arvidson et al., 2011; Kular et al., 2012; Maeda, Takahashi & Kobayashi, 2013; Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

2.1.1. Via de sinalização Simpática

Os osteoblastos têm a capacidade de expressar recetores para diversos neuropéptidos, isto é, apresentam atividade simpática. Um exemplo desta atividade é a forma como os níveis de atividade de ligação do ADN e a expressão de Runx2 diminuem com o bloqueio de recetores de glutamato (Soltanoff et al., 2012).

Primeiro os recetores β 2-adrenérgicos ativam o fator de transcrição CREB. O CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP, promove a proliferação dos osteoblastos estimulando os genes *clock* com mediação pela função anti-proliferativa da inibição da expressão da ciclina G1 e dos genes da proteína activadora 1 (AP1) (Soltanoff et al., 2012).

O círculo circadiano encontra-se relacionado com a regulação dos níveis de leptinas no hipotálamo. Quando as leptinas se ligam ao seu recetor este dimeriza-se e desencadeia a activação de múltiplos fatores, MAPKs, Akt, PIP³, entre outros, que regulam diferentes aspetos de diferentes tipos celulares, como o fator de activação NF κ B/IKK (Upadhyay, Farr & Mantzoros, 2015).

2.1.2. Via de sinalização Hedgehog

A via de sinalização Hedgehog é importante durante o desenvolvimento embrionário, garantindo a correta posição da formação do esqueleto e manutenção das células progenitoras nos tecidos adultos, iniciando e/ou mantendo a diferenciação celular que regula quer a formação óssea, quer a formação cartilaginosa (Arvidson et al., 2011).

Esta via de sinalização é constituída por proteínas da mesma família que controlam a proliferação celular, a diferenciação e morfologia dos tecidos e por ligandos como o *Desert Hedgehog* (Dhh), o *Indian Hedgehog* (Ihh) e o *Sonic Hedgehog* (Shh).

O Ihh é o mais importante na diferenciação osteoblástica com um papel importante na regulação temporal e espacial do desenvolvimento osteoblástico (Soltanoff et al., 2012). Este ligando é produzido por condrócitos hipertróficos, pelo que se percebe a relação entre o aparecimento primário dos progenitores de osteoblastos no *periósteo* adjacente ao mesmo tempo que os condrócitos hipertróficos surgem, actuando diretamente sobre os osteoblastos progenitores situados no pericondrio e também define os precursores de osteoblastos (Soltanoff et al., 2012).

Nesta via existem três fatores transcricionais, o GLI1 (forte ativador transcricional), o GLI2 (funciona como ativador ou repressor dependendo do estímulo que recebe), e o GLI3 (tem uma função essencialmente repressora) (Das, Samant & Shevde, 2012). Alguns autores consideram que o GLI2 encontra-se envolvido de forma activa na diferenciação osteoblástica, favorecendo a expressão da BMP-2 nestas células e potenciando sinergeticamente o seu efeito. Já outros investigadores consideram que nesta via de sinalização assiste-se à diminuição da expressão do RUNX2, pelo que estes consideram que a via Ihh encontra-se envolvida noutras partes da formação óssea (Das, Samant & Shevde, 2012).

Das, Samant e Shevde (2012) afirmam que a via de sinalização Hedgehog regula a osteopontina (OPN), isto é, uma glicoproteína fundamental na formação, migração e função osteoclástica.

Quando o ligando Ihh se liga ao seu recetor transmembranar *Patched 1* ou *Patched 2* (PTCH1/2) activa a proteína *Smoothed 7* (Smo7). Desta forma inicia-se a activação da cascata de transdução de sinal que possibilita a activação da GLI1 que é translocada para o núcleo e este regula a proliferação celular e activa os genes alvos da diferenciação osteoblástica (Arvidson et al., 2011). Quando a Smo é inibida as células não sofrem diferenciação uma vez que se verifica a inactivação da via de sinalização. Quando se verifica este acontecimento ocorre a anulação da actividade da proteína Smo em precursores osteoblásticos Osx positivos ao nível embrionário, gerando osteoblastos normais e o esqueleto endocondral (Arvidson et al., 2011; Das, Samant & Shevde, 2012).

Existe uma interacção complexa e uma cooperação entre as vias de sinalização Wnt e Ihh no controlo de diferentes aspetos no desenvolvimento ósseo (Kular et al., 2012).

Segundo Das, Samant e Shevde (2012) a sinalização por Ihh funciona como jusante da sinalização Wnt e a sua atividade parece estar relacionada com o início da osteoblastogénese, mas é necessário desenvolver mais estudos para melhor compreender a forma de operar desta via de sinalização e avaliar se esta desempenha a mesma função na fase embrionária e adulta.

2.1.3. Via de sinalização PTH

O único medicamento autorizado pela FDA no tratamento da osteoporose é a hormona da paratiróide (PTH) que, consoante a sua forma de administração, pode ter um efeito anabólico ou catabólico (Soltanoff et al., 2012).

A PTH aumenta a proliferação celular e encontra-se associada ao ácido azelendróico que, por sua vez, apresenta uma redução significativa da proliferação óssea sem influência no volume ósseo (Soltanoff et al., 2012).

O complexo PTH/PTHrP-G é formado quando proteínas G se ligam ao recetor da PTH, ativando o cAMP que promove a libertação das unidades catalíticas da enzima PKA. Esta enzima fosforila algumas proteínas responsáveis por alterações estruturais e de função do Runx2. Não obstante existem outras proteínas G que interagem com a fosfolipase C de forma a activar o PKC (Soltanoff et al., 2012).

Soltanoff et al. (2012) demonstraram que a PTH interage com a via de sinalização Wnt, pela Wnt4, via não canónica, onde a Wnt4 responde a estímulos da PTH por vias diferentes, denotando a sua capacidade anabólica. Por outro lado, os mesmos autores verificaram a relevância da activação da fosfolipase C na diferenciação dos condrócitos e no atraso na proliferação celular pela sua inactivação, decorrente de mutações no complexo PTH/PTHrP.

2.1.4. Via de sinalização PDGF

O PDGF é um fator extracelular relevante no controlo de funções de células ósseas como na migração de osteoprogenitores, na proliferação e diferenciação celular, bem como na osteoclastogénese. Este fator apresenta três isoformas que se ligam aos recetores α e ao recetor β (PDGR α e PDGR β) e dimeriza-os, originando outros três recetores padronizados ($\alpha\alpha$, $\beta\beta$ e $\alpha\beta$) (Arvidson et al., 2011).

Das isoformas activas do PDGF a PDGF-BB inibe a diferenciação osteogénica com a diminuição da ALP. Por conseguinte, há uma deleção do recetor β que promove uma resposta contrária, ou seja, aumenta a diferenciação osteogénica com o aumento da ALP, assim como dos níveis de ARN mensageiro e Runx2, por exemplo (Arvidson et al., 2011).

2.1.5. Via de sinalização IGF

Na via de sinalização IGF encontram-se envolvidos dois fatores da família IGF, o IGF-I e IGF-II. Estes são expressos em osteoblastos e têm actividade semelhante na regulação dos osteoblastos, estimulando a função com a promoção da deposição de matriz óssea. Além dos seus recetores (IGF-1R e IGF-2R) existem diversas proteínas de elevada afinidade de ligação implicadas no processo, como as proteínas recetoras do substrato de insulina (Arvidson et al., 2011).

De acordo com Arvidson et al. (2011) o IGF-I é mais potente quando comparado com o IGF-II e não afecta diretamente a diferenciação de células mesenquimatosas em osteoblastos nem o crescimento celular.

2.1.6. Via de sinalização FGF

Os fatores de crescimento fibroblástico (FGF) são importantes na regulação do processo de ossificação endocondral e intramembranosa pela sua ligação a recetores tirosina quinase (FGFr) (Arvidson et al., 2011). Existem quatro FGFr onde alguns se encontram envolvidos em diferentes fases do ciclo de diferenciação celular, como é o caso do FGFr1 que actua na maturação dos osteoblastos estimulando a diferenciação

celular dos osteoprogenitores e podem impedir a maturação dos osteoblastos já diferenciados (Arvidson et al., 2011).

Os FGF são expressos em mais do que um tipo de células ósseas. Alguns autores consideram que o FGF2 apresenta uma actividade mais acentuada num estadio pós-natal, uma vez que este apresenta uma diminuição da sua capacidade de mineralização quando comparado com o FGF9 e FGF18, que parecem estar mais relacionados com a formação do esqueleto durante a fase embrionária (Arvidson et al., 2011).

Por outro lado os FGF são expressos em diferentes fases do metabolismo ósseo, inclusive na diferenciação óssea. Por exemplo, os FGF1, 2 e 3 são expressos durante o término da fase de desenvolvimento do esqueleto, mas os FGF1 e 2 também são expressos na matriz que origina o tecido cartilaginoso (Arvidson et al., 2011).

O FGF1 é expresso em condrócitos hipertróficos enquanto o FGF2 é expresso também nos condrócitos em reserva e aparentemente é regulado em níveis abaixo do normal na proliferação dos condrócitos. Não obstante, a expressão de FGF2 relaciona-se com o aumento da expressão de Runx2 e com a diminuição de PPAR γ 2 (Marie, 2008).

Quando o FGF3 se liga ao FGF18 parece apresentar dois papéis em diferentes células, um de regulação do crescimento e outro de diferenciação de condrócitos em proliferação, mesmo que na diferenciação osteoblástica regule a densidade óssea e a espessura cortical (Arvidson et al., 2011).

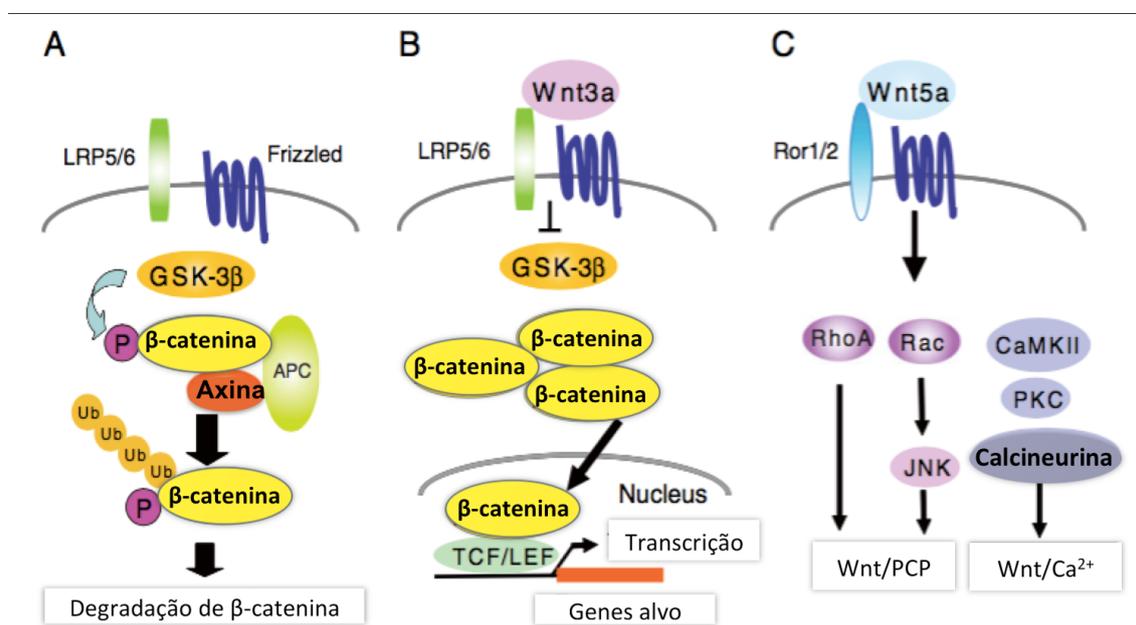
Na presença de mutações nos FGFr verifica-se a anulação precoce da estrutura óssea, com o desenvolvimento de craniossinostose e condrodismplasias, por exemplo (Marie, 2008).

2.1.7. Via de sinalização Wnt

A família Wnt é uma família de proteínas codificadas por genes cujos produtos de transdução afetam a orientação e características das células (Soltanoff et al, 2012). Estas são proteínas morfogénicas que se encontram em diferentes espécies animais e que contêm 350-400 resíduos aminoácidos. As Wnt encontram-se envolvidas na definição do esqueleto na fase embrionária, no desenvolvimento do feto e na remodelação óssea, bem como na fase adulta (Soltanoff et al, 2012).

De acordo com Arvidson et al. (2011) a via de sinalização Wnt pode apresentar-se de duas formas utilizando o mesmo recetor que se liga a ligandos diferentes,

utilizando uma via de sinalização Wnt canônica dependente da β -catenina e uma via de sinalização Wnt não canônica independente da β -catenina (figura 1).



Legenda: A, B – via de sinalização canônica; C – via de sinalização não canônica

Figura 7 – Representação das vias de sinalização Wnt. (Fonte: Maeda, Takahashi & Kobayashi, 2013).

Pela leitura da figura 1 podemos verificar que na via canônica a proteína Wnt liga-se a um recetor *transmembranar frizzled* (FZL) ligado ao LPR5/6, enquanto na via não canônica o recetor FZL encontra-se ligado ao recetor da tirosina quinase (Ror) (Arvindson et al., 2011; Soltanoff et al., 2012).

A via de sinalização Wnt canônica dependente da β -catenina é uma das principais vias de sinalização na regulação do desenvolvimento ósseo, sendo que foi nos indivíduos com mutações, com o seu co-recetor LPR5/6, que foram detetadas as primeiras evidências do seu envolvimento nas alterações da massa óssea nos humanos (Maeda, Takahashi & Kobayashi, 2013). Mais ainda, esta via de sinalização activa outros fatores de transcrição importantes na continuidade da osteoblastogénese e funciona como antagonista da C/EBP α e do PPAR γ que, por sua vez, quando ausentes, desencadeiam o desenvolvimento espontâneo de osteoblastos (Soltanoff et al., 2012). Em suma, a capacidade de estimular a osteoblastogénese é um mecanismo de sinalização para o aumento da formação óssea.

A via de sinalização canónica Wnt dependente da β -catenina participa na formação de células óssea e regula o crescimento, diferenciação, função e morte celular em alguns tipos celulares (Soltanoff et al., 2012).

Sem a presença de Wnt a β -catenina sofre ubiquitinação proteossomal e não participa na regulação da osteoblastogénese, isto é, sem Wnt a β -catenina é fosforilada pela quinase de glicogénio sintetase 3 β (GSK-3 β) e não existe transdução de sinal (Thompson, Rubin & Rubin, 2012).

A Wnt3a e a Wnt1 ativam a via de sinalização pela formação do complexo Wnt-FZL-LPR5/6 que transmite o sinal pelas proteínas Dvl, axina e Frat-1 inibidoras da atividade celular pela perturbação da ligação do GSK-3 β (Soltanoff et al., 2012). Desta forma, a acumulação de β -catenina no citoplasma da célula-alvo promove a sua translocação para o núcleo onde forma heterodímeros com o complexo formado pelo fator celular ligado a células T e pelo fator potenciador linfocítico (TCF/ LEF), afastando os seus co-repressores e iniciando a transcrição, aumentando desta forma a expressão e atividade do Runx2 (um promotor osteogénico) (Maeda, Takahashi & Kobayashi, 2013).

Em situações de ausência da expressão do Wnt verifica-se a degradação da β -catenina através da formação do complexo GSK-3 β e pela axina e polipose adenomatosa coli (APC). Por conseguinte, os genes desta via de sinalização continuam reprimidos pela acção dos respetivos co-recetores (Soltanoff et al., 2012).

Quando os níveis de β -catenina no citoplasma são baixos é induzida a diferenciação em condrócitos e uma diferenciação anormal de osteoblastos, mesmo quando estão presentes na membrana caderinas, que não são degradadas. Soltanoff et al. (2012) afirmam que a β -catenina tem potencial duplo para a produção de condrócitos e osteoblastos, visto que a sua ausência permite que as células mesenquimatosas se diferenciem para a condrogénese e o contrário, na sua presença, as células mesenquimatosas diferenciam-se para a osteoblastogénese.

De acordo com Maeda, Takahashi e Kobayashi (2013) o sFRP e o inibidor Wif-1 são fatores antagonistas que interagem como ligandos extracelulares da Wnt. A interrupção desta via de sinalização pela sFRP induz precocemente o CollA1 e ativa o fator de transcrição Runx2, desencadeando o aumento da diferenciação de condrócitos e da massa óssea. Apesar de se verificar uma diminuição da apoptose osteoblástica na ausência destas proteínas, verifica-se um aumento da diferenciação e proliferação dos osteoblastos bem como um aumento significativo da massa óssea trabecular.

Resumindo, a β -catenina é fundamental na diferenciação de osteoblastos maduros e formação óssea, tanto endocondral como membranosa (Maeda, Takahashi & Kobayashi, 2013).

De acordo com Maeda, Takahashi e Kobayashi (2013) na via de sinalização Wnt não canónica, as vias independentes são ativadas pela presença da β -catenina, como a via Wnt/ Ca^{2+} e via Wnt/PCP (Maeda, Takahashi & Kobayashi, 2013). Pela análise da figura 2 podemos verificar que a via Wnt/ Ca^{2+} é mediada por enzimas, como a proteína quinase II calmodulina dependente de cálcio e a quinase C (PKC), e a via Wnt/PCP é mediada por proteínas G pequenas (RhoA e RAC) e pela quinase c-jun-N-terminal (JNK).

O ligando Wnt5a liga-se ao complexo FZL-Ror pelo domínio rico em cisteína, a ligação activa a via de sinalização Wnt/PCP pela activação RhoA- e RAC- e pela sinalização dependente de JNK. Pode ainda haver a activação da via Wnt/ Ca^{2+} pela sinalização por PKC, CAMKII e sinais dependentes de calcineurina (Maeda, Takahashi & Kobayashi, 2013).

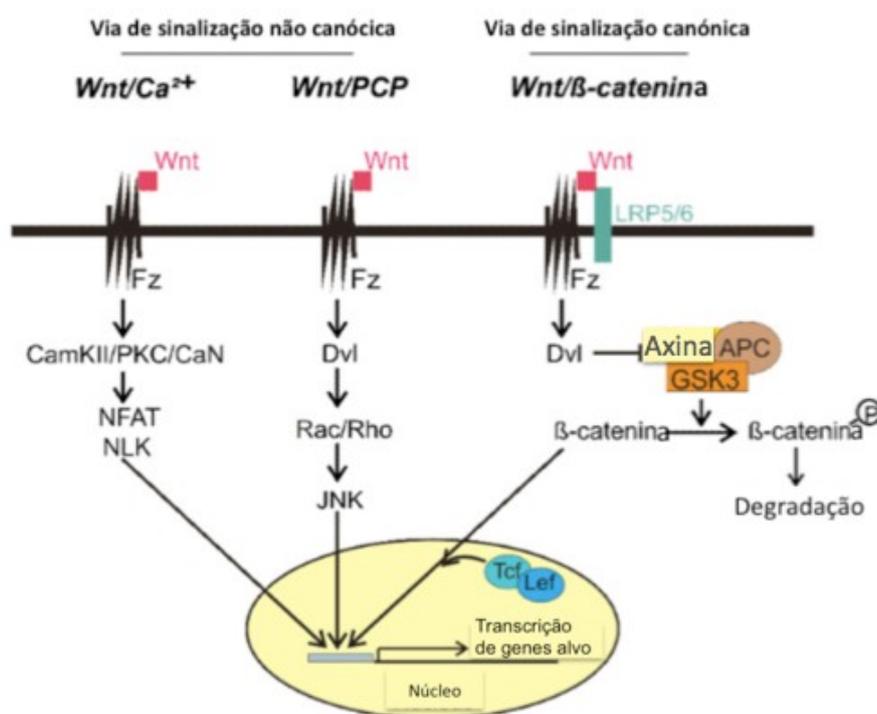


Figura 8 – Representação da via de sinalização da Wnt não canónica. (Fonte: Piters, Boudin, & Van Hul, 2008).

A via de sinalização Wnt não canónica independente da β -catenina é importante no desenvolvimento osteoblastogénico pela repressão do fator PPR γ e indução do RUNX2 (Maeda, Takahashi & Kobayashi, 2013).

2.1.8. Via de sinalização Eferina (Eph)

Os recetores tirosina quinase e os seus ligandos de eferina (Eph) estão envolvidos na regulação de interacções celulares diretas. A via de sinalização Eph baseia-se numa sinalização bidirecional onde a célula apresenta à superfície um recetor para a Eph que ao ligar-se à célula expressa o ligando eferina, permitindo a transdução de sinal nas duas células, quer de forma direta como de forma reversa (Arvidson et al., 2011).

Os ligandos Eph podem ser agrupados em classe A (A1-A5) e classe B (B1-B5). Enquanto a classe A se liga a recetores EphA1-EphA10 ancorados a uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI), a classe B liga-se a recetores tirosina quinase EphB1-EphB6 (Arvidson et al., 2011).

A via de sinalização Eph permite que os osteoblastos se liguem a osteoclastos. Na sinalização reversa verifica-se uma ligação entre a EphB2 dos osteoclastos com o recetor EphB4, promovendo a inibição da diferenciação destas células que, por sua vez, induz outros fatores de regulação nos osteoblastos, como o Tunx2, Dlx5 e Osx. No estudo de Soltanoff et al. (2012) os autores demonstram que em mutações de perda ou ganho de função o EphB4 encontra-se o topo da regulação da diferenciação osteoblástica.

Na activação dos osteoblastos Soltanoff et al. (2012) sugere que poderá ser necessário um fator da família genética homóloga Ras (RhoA) na sinalização direta da EphB2 e EphB4 nos respetivos osteoblastos. Contudo, o envolvimento deste fator na sinalização ainda é controverso, verificando-se alguns resultados contraditórios relativamente ao bloqueio/ativação da Eph numa aexposição ativa ao recetor.

2.1.9. Via de sinalização pela super família TGF-B

A via de sinalização pela super família TGF-B é constituída por diversos fatores de crescimento e diferenciação, tais como proteínas BMP e TGF-B. A transdução de sinal destas proteínas ocorre a partir de recetores quinásicos ricos em serina/tirosina, os BMPR-IA ou ALK-3 ou ALK-6 e o activina IA (ActR-IA ou ALK-2), ou os BMPR-II, ActR-IIA e ActR-IIB. Este último grupo de recetores ligam-se aos ligandos mesmo sem possuírem recetores tipo I, apesar de na sinalização da via necessitarem destas. Por sua vez, os recetores tipo I necessitam dos recetores tipo II para se ligarem aos respetivos ligandos (Arvidson et al., 2011; Soltanoff et al., 2012).

O TGF-B é um citocina que expressa de forma abundante na matriz óssea. Esta é sintetizada por um precursor molecular formado por duas partes que podem ser clivadas, o TGF-B activo e uma proteína associada à latência (LAP). Regra geral, a proteína mantém-se ligada de forma não covalente com a parte activa do TGF-B, escondendo os seus domínios de ligação ao recetor, sendo secretada e depositada na matriz óssea a sua forma inactiva (Tang et al., 2009). Quando ligada ao recetor, a proteína passa a encontrar-se no seu estado activo, induzindo a sinalização na osteoblastogénese, mais ainda esta regula a proliferação e diferenciação de osteoprogenitores, contudo ainda não se conhece a sua função específica (Soltanoff et al., 2012; Tang et al., 2009).

Alguns investigadores avaliaram a doença Camutati-Engleman, na qual são avaliadas as mutações do gene TGF-B1, e verificaram que a maioria das mutações encontra-se na região codificada de LAP, mas não identificam mutações na parte activa do TGF-B1 (Tang et al., 2009).

As proteínas BMP estão relacionadas com a especificação de uma linhagem celular, sendo que estas proteínas são importantes, como anteriormente referido, na diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos ou condrócitos e pela sua capacidade de induzir a formação óssea endocondral. Mais ainda, estas proteínas promovem o aumento da formação óssea pela sua implicação na determinação osteogénica (Tang et al., 2009).

As proteínas BMP podem ser classificadas de acordo com o seu papel na regulação da formação óssea, isto é, podem ser classificadas como reguladores positivos quando promovem a formação óssea (BMP 2,6, 7 e 9) ou como reguladores negativos quando têm o efeito inverso (BMP 1 e 3) (Ryoo, Lee & Kim, 2006).

A sinalização pelas proteínas BMP ocorre via dependente de Smads ou por via independente de Smad, como o JNK (Soltanoff et al., 2012). As Smad são modeladores transcripcionais que participam na transdução de sinal e podem ser classificadas em três categorias, as reguladas por recetores como as BMP ou pelo TGF-B, co-Smad com co-parceiros mediadores como o TGF-B e BMP, e inibitórias.

A ligação de BMP a recetores tipo II induz a fosforilação de R-Smad que, posteriormente, forma um complexo com a respetiva co-Smad. Este complexo é translocado para o núcleo onde regula a transcrição dos genes alvo pela sua conexão a corepressores e co-activadores transcripcionais (Soltanoff et al., 2012).

A via de sinalização TGF-B pode ocorrer de forma independente de Smad. As BMP podem activar a ERK, JNK e a proteína p38 das células osteoblásticas, demonstrando os vários papéis faz MAPK na regulação da fosfatase alcalina e da osteocalcina (Arvidson et al., 2011). Por conseguinte, tanto as vias Smad como MAPK regulam o gene Runx2 que, por si só, desempenha um papel essencial na indução da BMP2, direccionando a diferenciação para a blastogénese em vez da miogénese (Soltanoff et al., 2012).

2.2. Vias de sinalização dos osteoclastos

Os osteoclastos, tal como todas as outras células, podem ser regulados durante o seu processo de diferenciação e proliferação. Durante este processo as células produzem citocinas importantes na regulação de todo o processo, como o RANKL, OPG e M-CSF, sendo que os dois primeiros são fatores-chave na regulação da produção dos osteoclastos (Kular et al., 2012; Soltanoff et al., 2012).

2.2.1 – Vav 3

O Vav 3 encontra-se sempre presente no mecanismo de activação osteoclástica e densidade óssea. Quando este factor não está presente ou apresenta uma sinalização deficiente do M-CSF e de integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, a actina do citoesqueleto e a sua polarização é desordenada, assim como a atividade de reabsorção (Soltanoff et al., 2012).

2.2.2 – M-CSF

O M-CSF é uma citocina secretada por células estromais da medula e osteoblastos de forma a potenciar a sobrevivência osteoclástica. Este é fundamental para iniciar a diferenciação dos pré-osteoclastos, tornando-se essencial no processo de proliferação e diferenciação celular. Mais ainda, esta citocina, simultaneamente, activa a formação do citoesqueleto e a reabsorção óssea (Palmqvist et al., 2002).

De acordo com Palmqvist et al. (2002) o M-CSF garante a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas monocíticas. Por conseguinte, na sua ausência verifica-se uma deficiência de macrófagos e um fenótipo osteopetrótico provocado pela ausência de osteoclastos.

O M-CSF activa e induz várias proteínas, quinases, citocinas, interleucinas e interferões. Como a sua ligação ao recetor (c-Fms) é induzida, a expressão genética é que promove a resposta direta ao RANKL e às interleucinas. Já a sua acção sinérgica encontra-se associado ao facto desta citocina estimular diretamente o RANKL e outros componentes da via de sinalização RANKL/NF- κ B (Soltanoff et al., 2012).

2.2.3 – ITAM

O ITAM associado ao RANKL estimula a via de sinalização Ca^{2+} /NFAT que controla a oscilação dos níveis de Ca^{2+} . Este fenómeno ocorre pela estimulação do RANKL da ligação do ITAM ao *FC recetor common γ subunit* (FcR γ), pela ligação do recetor associado aos osteoclastos (OSCAR) com o recetor *triggering* das células mieloides (TREM-2) (Kular et al., 2012).

A manutenção da homeostase óssea é conseguida depois da sinalização desencadear o processo de activação da fosfolipase $C\gamma$ (PLC γ), possibilitando a libertação de Ca^{2+} intracelular mediado pela calmodulina. Assim, o NFATc1 é auto-amplificado e ocorre a transcrição dos genes envolvidos no processo de diferenciação dos osteoclastos (Kular et al., 2012; Soltanoff et al., 2012).

Na presença de deleções nestes fatores a diferenciação osteoclástica é deficiente, pelo que poderá surgir uma condição de osteopetrose. O comprometimento da fosforilação da tirosina quinase esplénica (Syk) ocorre pela ausência de DAP12 e de FcR γ , pelo que não há nem diferenciação osteoclástica nem reabsorção óssea. Mais ainda, na ausência da Syk o ITAM não sofre fosforilação e não há progressão desta via. Já o aumento da Syk promove o aumento das respostas de RANKL e M-CSF, formando-se osteoclastos hiperactivos, gerando um processo inflamatório e erosão óssea cortical (Soltanoff et al., 2012).

2.2.4 – NF-kB

Por um processo de fosforilação da sua proteína inibitória (IKK) o NF-kB é translocado para o núcleo. Este fator é importante na via de sinalização do RANK pela regulação da função e desenvolvimento dos osteoclastos (Carey et al., 2015).

A activação do NF-kB promove a activação de muitas proteínas quinases MAP, como a JNK/c-Jun, ERK1/2 e quinases p38. As MAP e os seu inibidores diminuem a sobrevivência osteoclástica e inibem a formação de osteoclastos, por outro lado a p38 pode fosforilar o transdutor de sinal e o activador de transcrição 1 (STAT1) e controlar a expressão de alguns genes alvo (Soltanoff et al., 2012).

Além da regulação acima descrita, o NF-kB regula a IL1, responsável pela reabsorção óssea e formação de osteoclastos por precursores que expressam c-Fos em excesso (Soltanoff et al., 2012).

2.2.5 – Src

A Src é um dos nove *nonrecetor tyrosine kinases* (NRTKs) localizados na membrana celular (Soltanoff et al., 2012). Esta participa nas vias de sinalização pelo RANL e M-CSF e relaciona-se com a conexão e integridade dos podossomas que pertencem aos osteoclastos. Pela acção da Src os podossomas, estruturas altamente especializadas e com muita actina, ligam-se a outras células, e quando não estão presentes causam osteopetrose por má absorção óssea, efetuada exclusivamente pelos osteoclastos maduras, sendo que para a restauração destas estruturas é necessário SH2 e SH3, isto é, é necessário restabelecer domínios de ligação que possibilitem o retorno da organização dos mesmos e da sua dinâmica, mudando desta forma a capacidade de sobrevivência e diferenciação dos osteoclastos (Soltanoff et al., 2012).

De acordo com Horne et al. (2005) o Src fosforila o *Casitas B-lineage lymphoma* (CB1) pela sua ligação inicial à tirosina quinase 2 (Pyk2). Desta forma, o CB1 ajuda a endocitose e activação de outros mediadores como a dyamina e PIP3K, relevantes no desenvolvimento da polaridade celular e na interligação celular.

O papel da Src encontra-se relacionado somente com a reabsorção óssea osteoclástica (Horne et al., 2005). A reabsorção é activa através da presença de integrinas que permitem a ligação do Src à Pyk2, possibilitando a polarização celular e consequente adesão celular gerando, assim a adesão entre as células e a matriz óssea (Soltanoff et al., 2012).

2.2.6 – RGS10 e RGS12

O RGS10 integra a família de 21 proteínas G de sinalização relevantes para o processo das vias de sinalização dos osteoclastos. Esta encontra-se relacionada com o processo de oscilação do Ca^{2+} (Soltanoff et al., 2012).

Em situações de silenciamento da expressão do ARN do RGS10 assiste-se a um bloqueio as oscilações de Ca^{2+} , dado que esta proteína interage diretamente com o complexo calmodulina- Ca^{2+} -PIP₃, promovendo assim a activação do PLC γ e a oscilação do Ca^{2+} (Soltanoff et al., 2012).

O mecanismo de acção da RGS1 no processo de diferenciação dos osteoclastos é complexo. Inicialmente a RANKL medeia os adaptadores moleculares da membrana DAP12 e FcR γ , que possuem um motivo ITAM e activa o PLC γ . Este último hidrolisa o PIP₂, originando o PIP₃, e desencadeia a libertação do Ca^{2+} dos espaços de armazenamento intracelular. A libertação do Ca^{2+} possibilita o aumento intracelular deste para atingir um pico de concentração máximo, promovendo a formação do complexo calmodulina- Ca^{2+} . Este complexo compete com o local de ligação do PIP₃ na RGS10 e promove a sua libertação. Devido ao pico de concentração do Ca^{2+} este é recarregado o retículo endoplasmático na ausência da activação adicional de PLC γ e combinação entre a recarga de Ca^{2+} no retículo endoplasmático e a ligação da calmodulina que causa a diminuição da concentração de Ca^{2+} (Soltanoff et al., 2012).

Quando se verifica baixos níveis de concentração de Ca^{2+} o complexo calmodulina- Ca^{2+} dissocia-se da RGS10, pelo que o PIP₃ permanece livre e activa o PLC γ que se liga à RGS10, sem competir com o complexo calmodulina- Ca^{2+} . O PLC γ activo promove a libertação de Ca^{2+} dos depósitos intercelulares pela libertação de PIP₃, gerando um novo pico que promove a continuidade do processo através das oscilações de Ca^{2+} (Soltanoff et al., 2012).

Por conseguinte, as oscilações observadas nesta via de sinalização activam a expressão de calcineurina e de NFATc1 na fase final da diferenciação dos osteoclastos.

Por sua vez a RGS12 também desempenha um papel importante na fosforilação da PLC γ , sendo que a sua ausência causa uma fosforilação com defeito e bloqueia as oscilações de Ca^{2+} (Soltanoff et al., 2012).

2.2.7 – RANKL

A RANKL é uma proteína transmembranar que em conjunto com a OPG são fatores chave na formação de osteoclastos. A ausência da RANKL anula a diferenciação dos osteoclastos gerando um fenótipo de osteopetrose, com a diminuição de osteoclastos e deixa de haver reabsorção óssea eficaz e aumenta a massa óssea (Soltanoff et al., 2012).

A RANKL encontra-se envolvida no processo de calcificação ectrópica de outros tecidos gerada por infecções virais como o CVB3, por exemplo. A infecção viral gera o aumento da RANKL, bem como da OPG e outras citocinas. Esta proteína, através da acção de outros intermediários, promove o aumento do fosfato inorgânico, promovendo a calcificação do tecido cardíaco. Este fenómeno ocorre pelo facto do fosfato inorgânico se encontrar relacionado com a calcificação vascular (Lee et al., 2013).

Enquanto o aumento da RANKL, causado por uma infecção viral, aumenta a actividade dos osteoclastos, estimula a reabsorção óssea e promove a calcificação ectrópica, os elevados níveis de OPG bloqueiam apenas a produção e diferenciação dos osteoclastos (Lee et al., 2013).

A proteína recombinante RANK-Fc, descoberta recentemente, trata-se da proteína RANK agregada com a região Fc da imunoglobulina humana. Esta inibe a formação de osteoclastos dependente desta via de sinalização e previna a perda óssea, bem como a calcificação induzida por infecção viral (Lee et al., 2013).

Para Lee et al. (2013) a neutralização da RANKL pela RANK-Fc, Denosumab e OPG, justifica a aplicação destes agentes terapêuticos a prevenção e diminuição da calcificação óssea.

2.2.8 – Catepsina K

As catepsinas são proteases lisossomais também designadas de proteases de cisteína e podem ser classificadas de acordo com a sua acção nos osteoclastos (Everts et al., 2006): exocíticos (catepsinas K e L), endocíticos (catepsina D) e de ligação membranar (catepsina E). Das catepsinas descritas a catepsina K tem um importante papel na reabsorção óssea dos osteoclastos a baixo pH (Everts et al., 2006).

A catepsina apresenta actividade proteolítica contra proteínas matriciais óssea, sendo que é regulada por MMPs. A remoção do colagénio ósseo é essencial para a interligação de reabsorção e formação óssea, sendo que as MMPs também são importantes neste processo (Goto, Yamaza & Tanaka, 2003).

Chen et al. (2007) verificaram que os osteoclastos não sofrem apoptose nem senescência na ausência de catepsina K, apresentando-se em maior número pela diminuição dos níveis de p19, p21 e p53. Por outro lado, quando há uma deficiência na catepsina K os ossos são afetados de diferente forma, os ossos longos compensam a ausência de catepsina K através das MMPs, enquanto os ossos craneanos utilizam outras enzimas da família da catepsina K, como a catepsina G que medeia a reabsorção pelas MMPs.

3. FATORES DE CRESCIMENTO E PLAQUETAS

Os fatores de crescimento são essencialmente aplicados na regeneração dos tecidos através de processos biomiméticos aos ocorridos durante o desenvolvimento embrionário e no período pós-natal (Kaigler, Cirelli & Giannobile, 2008). Pela complexidade deste processo surge a necessidade de combinar diferentes fatores de crescimento de forma a criar um ambiente favorável à regeneração, assim como ocorre nos processos de reparação (Kaigler, Cirelli & Giannobile, 2008). Kaigler, Cirelli e Giannobile (2008) afirmam que a aplicação de apenas um fator de crescimento recombinante induz diversas cascatas moleculares, bioquímicas e morfológicas, que levam à regeneração dos tecidos.

Os fatores de crescimento podem ser definidos como mediadores biológicos naturais que regulam eventos celulares importantes envolvidos na reparação e/ou regeneração dos tecidos através da ligação aos recetores celulares específicos de superfície (Kaigler, Cirelli & Giannobile, 2008). Nas células alvo os fatores de crescimento induzem as vias de sinalização intracelulares, gerando a ativação de genes que alteram a atividade celular e o fenótipo. Importa compreender que o efeito de cada fator de crescimento é regulado por um complexo sistema de *feedback* que engloba outros fatores de crescimento, enzimas e proteínas vinculativas (Kaigler, Cirelli & Giannobile, 2008).

Na regeneração periodontal e óssea são utilizados diferentes materiais biomiméticos como membranas bio-reabsorvíveis e não-reabsorvíveis, matrizes e enxertos, gerando um micro-ambiente propício para a repovoação celular da solução de continuidade óssea e da superfície dentária, contudo não aceleram os processos necessários que são precisos no processo de regeneração (Matos, 2008).

Os fatores de crescimento iniciam o processo de reparação tecidual de forma local, funcionando como sinais de alerta para a atividade celular promotora da regeneração. A estimulação que estes exercem nas células alvo ocorre por ligações de elevada afinidade com os recetores das membranas plasmáticas, causando mensagens secundárias no interior das células. São estas mensagens que promovem a cascata de eventos celulares que constituem elementos essenciais para o processo de reparação e/ou regeneração (Graves, Kang & Kose, 1994).

Na aplicação clínica dos fatores de crescimento os sistemas de transporte são fundamentais para o sucesso do processo (Raja, Byakod & Pudukalkatti, 2009). Assim,

a área de superfície, ou seja, as propriedades da superfície de interação entre a célula e o substrato são importantes para estudo, uma vez que a cinética de liberação deve ser adequada para o processo de regeneração, tal como a biocompatibilidade e a degradação (Matos, 2008). Os sistemas de transporte de fatores de crescimento mais comumente utilizados são de cerâmica à base de fosfato de cálcio, enxertos ósseos e polímeros, por exemplo (Wikeshjö et al., 2003).

A temática da cinética de degradação dos fatores de crescimento ainda é um tema algo controverso, permanecendo a dúvida quanto ao tipo de coordenação entre a cinética de liberação e a resposta de cicatrização (Matos, 2008). Por conseguinte, ainda não se conhece se ocorre uma liberação rápida ou mais longa e homogênea, ou ainda uma liberação pulsátil ou sequencial e, assim, mais benéfica (Matos, 2008).

Apesar da vasta quantidade de fatores de crescimento existentes, cientificamente apenas se verifica a aplicabilidade clínica de alguns, sendo desenvolvidos diversos estudos com vista a determinar os fins terapêuticos destes e as suas funções ao longo do processo de cicatrização (Kaigler, Cirelli & Giannobile, 2008).

Por conseguinte os fatores de crescimento são mediadores biológicos peptídeos naturais importantes na regulação de vários eventos celulares como a síntese de ADN, quimiotaxia, diferenciação celular e síntese de matriz óssea (Anitua, 1999). Tal como anteriormente referido existem diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), de transformação β (TGF- β), de fibroblasto a e b (aFGF e bFGF), semelhantes à insulina I e II (IGF-I e II) e proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) (Marx, 1999).

O plasma rico em plaquetas (PRP) trata-se de um hemocomponente rico em fatores de crescimento colhidos dos grânulos- α das plaquetas, como o PDGF. Terapeuticamente estes são usados na aceleração dos efeitos dos fatores de crescimento contidos nas plaquetas, tratando-se dos principais iniciadores do processo de regeneração dos tecidos (Marx et al., 1998).

Anitua (1999) desenvolveu um trabalho para avaliação da capacidade regenerativa do gel plaquetário obtido do PRP utilizado na cirurgia reconstrutiva oral, maxilofacial e implantodontia comparando-o com enxertos ósseos. O gel plaquetário é uma mistura de plasma rico em proteínas com trombina e cloreto de cálcio (Tischler, 2002).

O PDGF é um componente obtido do soro humano e purificado de plaquetas humanas. Apesar dos grânulos- α plaquetários tenham implicados como o local principal

de armazenamento de PDGF alguns autores verificaram que outros tipos celulares também sintetizam este fator de crescimento (Anitua, 1999; Marx et al., 1998).

4. TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO ÓSSEA

O conceito de regeneração é referente à reprodução ou reconstituição dos tecidos danificados ou perdidos, enquanto a reparação consiste na cicatrização dos tecidos sem que ocorra uma verdadeira restauração da arquitetura e função dos tecidos (Esposito et al., 2004).

Importa compreender as diferenças entre os termos regeneração e reparação. Enquanto a regeneração é um processo biológico que permite restabelecer a arquitetura e função dos tecidos, a reparação é o processo biológico que restaura a continuidade dos tecidos danificados através de outros tecidos que não mimetizam a estrutura e função dos anteriores (Esposito et al., 2004).

A regeneração periodontal refere-se ao processo de cicatrização após um tratamento periodontal, processo pelo qual se obtém tecidos de suporte perdidos, bem como um novo cemento acelular unido à superfície dentária subjacente, um novo ligamento periodontal com fibras de colagénio funcionalmente orientadas e inseridas no cemento e um novo osso alveolar unido ao ligamento periodontal (Hirooka, 1998). Por conseguinte, este processo gera uma nova inserção que se pode tratar de uma adesão epitelial e/ou adaptação ou inserção conjuntiva, podendo incluir um novo cemento (Esposito et al., 2004).

Os estudos de regeneração dos tecidos de inserção periodontal iniciaram-se na década de 80, sendo que desde então têm sido utilizadas diferentes abordagens na tentativa de obter um novo cemento com fibras de colagénio integradas, um novo ligamento periodontal e um novo osso alveolar (Sculean et al., 2006).

A regeneração óssea permite a recuperação do volume de perda óssea com base nos princípios da osteogénese, osteoindução e osteocondução. Na osteogénese verifica-se a formação de tecido ósseo novo, ocorrendo quando os osteoblastos e as células precursoras de osteoblastos viáveis são transplantadas no enxerto. As células precursoras de osteoblastos são as principais responsáveis pela formação óssea nos defeitos. Por sua vez, a osteoindução verifica-se quando a formação óssea é induzida pela ação de células osteogénicas ou fatores de crescimento a partir do material de enxerto. Os materiais que apresentam capacidade osteoindutora recrutam células precursoras de osteoblastos para o interior do material induzindo a proliferação e diferenciação das células com capacidade de regeneração. Por fim, o processo de osteocondução representa a capacidade física do material de enxerto funcionar como guia na neurovascularização e

crescimento de células precursoras osteoblásticas para o interior do defeito ósseo (Goldberg & Akhavan, 2005).

Os três mecanismos de formação óssea por norma ocorrem em conjunto. Lang, Araújo e Karring (2005) demonstram que muito dificilmente ocorre osteogénese sem osteoindução e osteocondução uma vez que poucas células sobrevivem depois de colocação do enxerto no leito recetor. Por conseguinte, o material enxertado é invadido por células do hospedeiro que se diferenciam em osteoblastos e todo o processo de regeneração óssea pressupõe que existe uma fonte de células formadoras de osso ou células precursoras, um estímulo osteoindutor que promove a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos e forma o osso, e um meio osteocondutor que permite a proliferação de células transplantadas e a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos.

No processo de regeneração existem diversos fatores que influenciam a eficácia de todo o processo, tais como os fatores do hospedeiro, dentários, do defeito, fatores locais e cirúrgicos.

Alguns dos fatores do hospedeiro são os fatores psicológicos, comportamentais e genéticos, sendo que um dos fatores mais importantes pela sua influencia negativa é o tabagismo (pela alteração na função fibroblástica), diminuição da micro circulação periodontal e dos níveis de IgG e aumento dos agentes patogénicos (Tonetti, Pini-Prato & Cortellini, 1995).

Por sua vez, os fatores dentários podem comprometer o tratamento regenerativo como a mobilidade dentária horizontal basal que influencia negativamente o processo (Kornman & Robertson, 2000). Assim como os defeitos são importante no processo regenerativo da RTG, sendo o potencial regenerativo semelhante em defeitos com diferentes profundidades mas varia consoante a largura do defeito.

O local do defeito é importante na previsibilidade da RTG, como é o caso de locais onde se encontram pérolas e projeções de esmalte cervical, que devem ser removidos antes de iniciar o tratamento (Tonetti, Pini-Prato & Cortellini, 1995).

Durante o procedimento cirúrgico devem ser tomadas algumas medidas de prevenção de forma a evitar reacções adversas, essencialmente com a aplicação de membranas não reabsorvíveis, sendo o principal problema a exposição da membrana e verifica-se uma redução de problemas com a preservação dos tecidos interdentários (Tonetti, Pini-Prato & Cortellini, 1995).

4.1 – Regeneração óssea guiada

A regeneração óssea guiada (ROG) tem como principal objetivo a utilização de um material temporário com um ambiente adequado, permitindo que o próprio organismo cicatrize e regenere os tecidos em falta. Este processo é uma regeneração óssea que resulta das ligações planejadas e corretamente efetuadas (Buser et al., 1996).

Hammerle e Jung (2003) afirma que a principal característica da ROG é a utilização de membranas para proteger a área de falha do osso, assim como enxertos em bloco e/ou em partículas, ajudando assim a formação de osso novo.

Para obter os resultados pretendidos com a ROG Buser et al. (1996) consideram ser necessário:

- O tecido mole deve ter sofrido uma cicatrização primária através de uma técnica de incisão lateral para evitar a exposição da membrana;
- Evitar que a membrana colapse formando um espaço de suporte com a utilização de enxertos ósseos e/ou material osteocondutores;
- Obter estabilidade e firmeza pela utilização de pinos na adaptação da membrana ao osso de suporte, pelo que as células não-osteogênicas não proliferam para a área a regenerar;
- Deve esperar seis meses até se verificar a completa regeneração e maturação óssea.

O osso cortical deve ser perfurado até a medula na zona do defeito, estas micro perfurações corticais são essenciais para que haja sucesso, de forma a melhorar o suprimento sanguíneo. Devem ser tomadas precauções redobradas com a higiene oral para controlar a placa bacteriana.

Segundo Lindhe, Karring e Araújo (2008) o resultado final da ROG é fortemente influenciado pela morfologia dos tecidos moles nos locais onde se pretende formar novo osso, pelo que a estética em zonas anteriores é muito importante. Por outro lado a quantidade de tecido mole também interfere na formação óssea e em casos onde o espaço a regenerar é mais extenso do que a cobertura possível de tecidos moles deve-se, primeiro, regenerar os tecidos moles e, depois, efetuar a ROG.

A ROG pode apresentar alguns problemas como defeitos dos tecidos moles, o nível da gengiva dos dentes circundantes, o genótipo gengival, e os traumas e patologias dos tecidos que revestem o defeito (Lindhe, Karring & Araújo, 2008).

Uma das desvantagens da ROG é a necessidade de haver uma cobertura adequada de tecido mole, dado que em casos de necrose dos tecidos de cobertura verifica-se a perda do enxerto na maioria dos casos (Nemcovsky & Serfaty, 1996).

Pela avaliação histológica de biópsias Smukler, Landi & Setayesh (1999) verificaram a existência de mais quantidade de osso vital formado nas áreas com ROG quando comparado com áreas onde ocorreu uma cicatrização espontânea.

Na ROG podem ser utilizadas diferentes membranas. O principal papel das membranas é impedir a invaginação do tecido conjuntivo na zona a regenerar, enquanto o perióstio se mantém na superfície externa da membrana. Mais tarde, para que apenas as células do osso em volta interajam é necessário colocar um retalho mucoperiosteal (Buser et al., 1996).

As membranas utilizadas na ROG podem ser produzidas a partir de diversos materiais como lâminas de titânio, fásia congelada a seco, enxertos de dura-máter congelada a seco, politetrafluoretileno, politetrafluoretileno expandido, colagénio, poligalactina e malha fina de titânio, por exemplo. Para que estes materiais sejam viáveis para a produção de membranas devem apresentar integridade tecidual e oclusividade celular, ser estáveis relativamente à sua biocompatibilidade, ter a capacidade de manter o espaço e ser de fácil manuseamento (Hardwick et al., 1994). Por sua vez, quando as membranas são biodegradáveis e absorvíveis os materiais não devem reagir, ou reagir o mínimo possível, com os tecidos adjacentes no momento da sua reabsorção.

As membranas são essencialmente utilizadas na ROG com colocação de implantes em casos de defeitos nos alvéolos pós-extracionais, fenestrações ósseas e deiscências, em casos onde é necessário o aumento ósseo vertical e horizontal bem como a elevação do seio maxilar (Buser et al., 1996).

Um dos principais problemas associados à utilização de membranas é o seu colapso e o risco de infecção local de exposição, bem como o incompleto preenchimento ósseo (Hammerle & Jung, 2003).

Em comparação as membranas reabsorvíveis podem ser mais vantajosas do que as não reabsorvíveis pois eliminam o risco da exposição da membrana não reabsorvível e a necessidade de uma segunda intervenção para a remover. Simion et al. (1996) verificaram que as membranas não reabsorvíveis, especificamente a PTFE-e, apresentam uma melhor regeneração óssea pois criam melhores espaços e conseguem mantê-los melhor, visto que proporciona mais dificuldade na adesão celular e a periferia

da membrana promove a adesão celular, excluindo assim de forma seletiva a migração das células epiteliais e gengivais e favorecendo a integração do tecido conjuntivo periférico e do osso alveolar (Villar & Cochran, 2010). Villar e Cochran (2010) descreveram alguns problemas associados à utilização de membranas não reabsorvíveis de PTFE-e como a exposição espontânea da membrana, consistência firme e memória elástica que diminuem a sua capacidade de se adaptar ao defeito mas que possibilitam o seu desempenho biológico.

Dado que as membranas descritas necessitam de um segundo procedimento cirurgico para a sua remoção, foram desenvolvidas as membranas reabsorvíveis na perspectiva de eliminar esta segunda intervenção. Atualmente são utilizados diferentes materiais, todos eles biocompatíveis e com capacidade de exclusão celular, bem como com a capacidade de formar espaços que permitem o crescimento e aderência periodontal.

O principal material utilizado na produção de membranas reabsorvíveis é o colagénio pela sua presença fisiológica nos tecidos periodontais, assim as membranas funcionam de forma semelhante a uma estrutura que mimetiza os tecidos de regeneração. Por outro lado, esta substância aumenta a proliferação de fibroblastos que forma uma barreira para as células epiteliais e promovem a homeostase, promovendo a angiogénese e o crescimento dos tecidos no defeito. Já a sua reabsorção é efetuada através de enzimas e de macrófagos e neutrófilos (Lindhe, Karring & Araújo, 2008).

Villar e Cochran (2010) referem algumas das desvantagens da utilização de membranas reabsorvíveis como a falta de visibilidade quando molhadas, nos defeitos intraósseos frequentemente colapsam e podem causar reacções alérgicas locais.

Por todos os factos expostos é possível aferir que ainda não existe uma membrana óptima para regeneração periodontal, isto é, as membranas de PTFE-e podem sofrer uma exposição espontânea na cavidade oral comprometendo a regeneração e necessitam de uma segunda intervenção para a sua remoção, enquanto as membranas reabsorvíveis apresentam propriedades limitadas e a sua degradação favorece o processo de inflamação e prejudica a regeneração.

De acordo com Caffesse et al. (1997) no pós-operatório a inflamação dos tecidos moles pode recobrir a membrana e é um fenómeno mais frequente nas membranas não reabsorvíveis. O processo inflamatório pode acumular agentes patogénicos que causam uma neoformação dos tecidos que prejudica o processo de regeneração.

4.2 – Proteínas derivadas da matriz de esmalte

As proteínas derivadas da matriz do esmalte (PDME) tratam-se de uma matriz de esmalte composta por várias proteínas como a amelogenina, amelina, enamulina, uma proteína sulfatada e a tuflelina (Hammarstrom, 1997).

A maioria da matéria orgânica da matriz do esmalte, aproximadamente 90%, é constituída pelas proteínas hidrofóbicas amelogeninas. Estas estão organizadas em agregados macromoleculares e formam uma matriz insolúvel, extracelular, que age como o controlo da organização da estrutura dos cristais de hidroxiapatite que se estão a desenvolver (Lyngstadaas et al., 2009).

Histologicamente verifica-se que a amelogenina é depositada na superfície radicular antes da formação do cimento, sendo que anteriormente esta era considerada uma proteína específica do esmalte, e que seria responsável pela diferenciação dos tecidos periodontais.

Quando a PDME é aplicada na superfície de uma raiz exposta as suas proteínas agrupam-se formando uma matriz tridimensional que cria um ambiente propício para a migração e fixação seletiva das células periodontais, permitindo desta forma o restabelecimento dos tecidos de suporte dentário perdidos. Assim, o osso alveolar pode ser regenerado com a formação de novas ligações pela capacidade osteogénica do ligamento periodontal (Bosshardt et al., 2005).

As PDME surgiram no mercado em 1997 para o tratamento periodontal regenerativo, pela sua capacidade regenerativa comprovada em diversos estudos que demonstraram histologicamente melhorias significativas, após a sua utilização (Bosshardt et al., 2005).

Sculean et al. (2008) demonstraram que a utilização de Emdogain® (composto comercial de PDME) em cirurgia periodontal regenerativa melhora a formação de uma nova inserção, verificando-se a presença de cimento celular e/ou acelular com fibras de colagénio inseridas e osso alveolar recém-formado. O processo de regeneração com este composto é iniciado com a sua reabsorção no processo de cicatrização, permanecendo somente uma camada natural, insolúvel, na superficial radicular que estimula as células produtoras de cimento como interface dente-tecidos adjacentes, prevenindo desta forma o crescimento epitelial exagerado (Bosshardt et al., 2005).

Numa fase inicial atribuíam-se como função à matriz de esmalte regular a iniciação, propagação, terminação e maturação dos cristais de hidroxiapatite do esmalte. Mais

tarde constatou-se que esta matriz também apresenta uma função extrínseca ao desenvolvimento do esmalte, isto é, a PDME interfere na formação de cemento acelular e na inserção do ligamento periodontal durante o desenvolvimento radicular.

Sculean et al. (2001) demonstraram o potencial biológico das PDME e propõem a tese de que estas promovem a regeneração periodontal por uma grande diversidade de efeitos como:

- Supressão da proliferação de células epiteliais;
- Libertação de fatores de crescimento pelos fibroblastos do ligamento periodontal;
- Efeito antimicrobiano.

As PDME influenciam significativamente o comportamento de diversos tipos celulares através da mediação da adesão celular, ativação, proliferação e sobrevivência, tal como a expressão de fatores de crescimento, citocinas, constituintes da matriz extracelular e outros componentes moleculares que interferem com a regulação da remodelação óssea (Bosshardt et al., 2005).

Para uma boa cicatrização/regeneração do tecido periodontal é necessário a inibição da migração de células epiteliais para a superfície radicular, uma vez que a sua presença impede o normal restabelecimento da arquitetura periodontal. Nesta área as PDME atuam na proliferação, adesão, biossíntese e formação de nódulos de mineralização e de fibroblastos do ligamento periodontal que inibe o processo migratório (Hammarstrom, 1997).

Por outro lado o Emdogain® apresenta propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogênicas, assim como diminui a expressão de mediadores inflamatórios e linfócitos B (Petinaki et al., 1998).

As PDME, *in vitro*, podem modular o comportamento de diversas células, como anteriormente referido. Esta influência pode ocorrer pela regulação dos níveis de cAMP, induzindo a síntese e secreção de fatores de crescimento como TGF β e IL6, fibroblastos do ligamento periodontal e, conseqüentemente, estimula a proliferação de pré-osteoblastos e a diferenciação de osteoblastos imaturos (Lyngstadaas et al., 2008). Nos osteoblastos a indução de osso múltipla acompanhado a mineralização, refletido no metabolismo ósseo, como a sialoproteína óssea, osteocalcina e fosfatase alcalina. Não obstante ainda não se conhece o mecanismo específico da atuação das PDME sobre as células.

4.3 – Plasma rico em plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) surgiu na década de 90 em gel de plaquetas. Este tem como principal função a regeneração óssea (Dusse et al., 2008). As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados cuja principal função é a formação de coágulos e a libertação de fatores de crescimento, pelo que é imprescindível no processo de coagulação sanguínea. Já o PRP é uma concentração de plaquetas num pequeno volume de plasma, muito utilizado na odontologia para acelerar a regeneração óssea, auxiliando na reconstrução de rebordos alveolares e reconstrução de defeitos ósseos (Nagata et al., 2010).

O PRP é uma alteração da chamada cola de fibrina obtida pela centrifugação do sangue do próprio paciente (Desarda et al., 2013) que contém fatores de crescimento que interferem com a cicatrização, pelo que é importante no mecanismo de reparação dos tecidos (Albanese et al., 2013). Este é aplicado na forma de gel, obtido pela mistura de PRP (obtido a partir do paciente através da centrifugação de sangue), trombina e cloreto de cálcio (Albanese et al., 2013).

Apesar dos bons resultados biológicos apresentados pelo PRP existem algumas limitações associadas à sua aplicação (Desarda et al., 2013). A trombina, por norma tem origem bovina, e pode desencadear uma resposta imunitária, com produção de anticorpos, quer anti trombina como anti fatores V e XII, com o risco de alterações no processo de coagulação. Por outro lado, existe ainda a possibilidade de desencadear uma reação imunitária de corpo estranho pela presença de fator V na trombina utilizada (Desarda et al., 2013).

De forma a contornar as restrições legais associadas ao manuseamento de sangue e para diminuir as limitações do PRP foram desenvolvidos uma nova família de concentrados plaquetários. Estes englobam a preparação de um material que não é cola nem fibrina, nem um concentrado plaquetário tradicional, eliminando os riscos associados ao uso de trombina bovina (Sunitha & Munirathnam, 2008). Neste novo protocolo o sangue colhido não adicionado a anticoagulantes é imediatamente centrifugado, permitindo a recolha do coágulo de fibrina rica em plaquetas e leucócitos (Ehrenfest, Rasmusson & Albrektsson, 2008).

4.4 – Enxertos ósseos

Um enxerto ósseo é um transplante de osso vivo ou não vivo de uma área dadora para uma área recetora. Existem diferentes tipos de enxertos, autógenos quando o material é transplantado de um local para outro no mesmo indivíduo, aloenxerto quando o osso é obtido de um indivíduo geneticamente diferente mas da mesma espécie e xenoenxerto quando o material é transplantado entre espécies diferentes de um indivíduo para outro (Hammerle & Karring, 1998).

Os enxertos autógenos são os mais aplicados pelas suas propriedades osteogénicas, osteocondutoras e osteoindutoras, tal como pela sua biocompatibilidade, não transmissão de doenças e retenção de osteoblastos. Contudo, estes apresentam morbilidade relacionada com o local dador, disponibilidade imediata, maior tempo de cirurgia e mais perda sanguínea durante o procedimento cirúrgico (Sutherland & Bostrom, 2005). Estes enxertos podem ser colhidos em locais dadores intra ou extra-orais, sendo que por norma são coletados na sínfise mandibular. A vantagem primordial dos enxertos intra-orais é a proximidade com o local recetor e a morbilidade diminuída relativamente aos extra-orais, porém a quantidade de osso disponível é limitado e em alguns casos a área dadora pode interferir com o plano cirúrgico pela proximidade (Louis, 2011). Assim, quando é necessário uma grande área de enxerto este deve ser coletado da crista ilíaca, calvária ou tibia (Louis, 2011).

Estes enxertos podem ser efetuados em bloco ou de forma particulada, sendo que estes últimos apresentam melhor revascularização mas é necessário aplicar uma membrana que suporte o enxerto, sem que esta seja comprimida em demasia para minorar o risco de reabsorção. Por sua vez, os enxertos em bloco devem apresentar porosidades elevadas que permitam melhorar a revascularização. Assim, os enxertos em blocos apresentam mais vantagens do que os enxertos particulados pois modelam-se melhor à área que se pretende regenerar e possibilitam um melhor suporte para um implante, tal como uma melhor osteointegração.

Para evitar as complicações associadas aos enxertos autógenos, os aloenxertos podem ser uma alternativa. As principais vantagens são a facilidade de manuseamento, grande quantidade de material disponível, baixo custo e morbilidade diminuída, evitando a cirurgia em local dador de osso. A principal desvantagem destes enxertos é a transmissão de doenças infecciosas e o processo de incorporação é mais lento do que o osso autógeno devido à reação imunológica do paciente (Gomes et al., 2008). Os

enxertos alógenos podem ser obtidos a partir de cadáveres humanos, como em bancos de ossos, e podem ser enxertos frescos-congelados, secos-congelados, frescos-congelados desmineralizados e criopreservados, com processamentos e armazenamentos distintos (Barone et al., 2009).

O enxerto de osso fresco congelado não é utilizado frequentemente por apresentar mais risco de rejeição e de transmissão de doenças (Lyford et al., 2003). Os enxertos secos-congelados e frescos-congelados desmineralizados são mais utilizados pelo seu potencial osteoindutivo, mas estes perdem estabilidade mecânica e precisam de material de suporte quando o defeito ósseo não é bem delimitado.

Os xenoenxertos incluem minerais ósseos de animais ou derivados de corais e algas na forma de carbonato de cálcio, sendo que o osso bovino desproteínizado é o material de eleição (Long et al., 2012).

Os substitutos ósseos aloplásticos são biomateriais sintéticos derivados do cálcio que incluem fosfato de cálcio, sulfato de cálcio, vidro bioativo e polímeros. Este varia na sua estrutura química e física e podem ser reabsorvíveis ou não reabsorvíveis. Os materiais mais utilizados são a hidroxiapatite, o fosfato tricálcio e o fosfato de cálcio bifásico, sendo este uma mistura entre os dois primeiros. Os dois primeiros estão menos indicados para tratar a zona estética uma vez que são de rápida reabsorção e substituição por novo osso (Hallman & Thor, 2008). Tanto a hidroxiapatite como o fosfato de cálcio bifásico e o carbonato de cálcio têm uma boa biocompatibilidade, osteocondução, deposição óssea direta na superfície do material e não apresentam reações adversas.

5. FATORES DE CRESCIMENTO NA PERIODONTOLOGIA

Os fatores de crescimento são libertados pelas plaquetas, e outras células, para promover a proliferação e migração celular, formando novos vasos sanguíneos e granulação de tecidos fundamentais para a reparação de lesões (Suzuki, Morimoto & Ikada, 2013).

Quando estão em fase de remodelação ou reparação os fatores de crescimento estão presentes em muitos tecidos, com um papel fundamental nos processos de proliferação celular, diferenciação, quimiotaxia e formação da matriz (Howell & Fiorellini, 1997). Depois da ativação plaquetária os fatores de crescimento são libertados e têm a capacidade de formar tecido pela iniciação e modulação da ferida, quer em tecidos duros como em tecidos moles.

Nos grânulos α das plaquetas podem-se identificar os seguintes fatores de crescimento (Bennett & Schultz, 1993):

- Fator de crescimento derivado das plaquetas;
- Fator de crescimento transformado- β ;
- Fator de crescimento endotelial vascular;
- Fator de crescimento tipo insulínico;
- Fator crescimento fibroblastos;
- Fator de crescimento epidérmico.

Todos os fatores descritos actuam localmente e a estimulação celular é feita por um sistema autócrino, isto é, as células produzem e respondem a mediadores biológicos ou através de um sistema parácrino pelo qual a célula produtora do fator encontra-se na proximidade das células que afeta (Everts et al., 2006).

O mecanismo de ação inicia-se com a sua união a recetores específicos da membrana. Para cada classe de fatores de crescimento há um recetor ou conjunto de recetores específicos e as células respondem a um fator de crescimento somente quando têm à sua disposição a proteína recetora adequada. Estes fatores constituem o estímulo necessário para iniciar a cascata de eventos celulares que resulta em diferentes funções. Todo o processo é mediado por um sistema de segundos mensageiros onde também intervem a proteína tirosina. Por tudo isto a ação dos fatores de crescimento na zona da lesão prolonga-se mesmo quando já não estão presentes no meio (Everts et al., 2006). Suzuki et al. (2013) denotaram o interesse da adição exógena de fatores de crescimento para acelerar o processo normal de cicatrização.

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) exerce efeito nas células levado pela ativação dos recetores α e β que se relacionam estruturalmente com a proteína tirosina quinase e expressam sinais mitogénicos potentes (Lynch et al., 1991). As atividades específicas deste fator são a mitogénese, angiogénese e ativação de macrófagos, com o desbridamento da área da ferida e, depois, a fonte de fatores de crescimento para a reparação contínua e regeneração óssea.

O PDGF promove a neoformação tecidular pela sua ligação a recetores específicos β que se encontram em células do ligamento periodontal e células ósseas, estimulando a replicação do ADN e a quimiotaxia destas células (Mumford, Carnes & Oates, 2001).

Num modelo experimental de RTG modulada por PDGF desenvolvido por Cho, Lin e Gencoe (1995) os autores consideraram que inicialmente é fundamental verificar de onde provêm os fibroblastos utilizados na reparação periodontal, qual a sua proliferação e migração no processo inicial de cicatrização dos defeitos. Posteriormente, os fatores de crescimento foram selecionados de acordo com a sua efetividade de regeneração periodontal, avaliando os seus efeitos quimiotéticos, síntese de colagénio, proliferativos e de diferenciação *in vitro*. Por fim, os autores consideram que é vantajoso proceder à desmineralização da superfície radicular antes de adicionar o fator de crescimento. Este procedimento demonstrou que o tecido conjuntivo é inserido precocemente mesmo sem existir uma barreira mecânica, pelo que a intervenção cirúrgica é reduzida e a quimiotaxia e a proliferação de fibroblastos é beneficiada.

O fator de crescimento transformado (TGF) surgiu na década de 80 pelo isolamento de polipeptídeos de células transformadas quer por vírus como quimicamente (Roberts et al., 1992). Roberts et al. (1992) verificaram que o TGF- β induz a angiogénese e fibrose, bem como estimula a síntese de colagénio, pelo que interfere no processo de regeneração tecidular. Mais ainda, este fator de crescimento interfere com a produção de matriz celular óssea e interfere com a natureza da matriz, sendo que as células osteoblásticas perdem na presença deste fator de crescimento propriedades morfológicas e diminuem a atividade da fosfatase alcalina.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é conhecido por se tratar de um importante mitogénico específico das células endoteliais vasculares, funcionando como indutor da angiogénese e regulador da neovascularização na presença de alterações fisiológicas. Nas alterações periodontais este fator é importante na presença

de inflamação, uma vez que interfere com a expansão vascular e com a progressão da inflamação (Suthin et al., 2003).

O fator de crescimento insulínico (IGF) estimula a síntese de ADN e proteínas colagénicas e não colagénicas ósseas (Canalis, 1980), interferindo na capacidade de regulação da formação óssea. Graves, Kang e Kose (1994) verificaram que o IGF-1 influencia a atividade do ligamento periodontal e o metabolismo ósseo pela quimiotaxia para os fibroblastos do ligamento e outras células progenitoras, é um mitogénico sobre os osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal e estimula a síntese da matriz extracelular. Não obstante, de forma isolada este fator não influencia o processo de cicatrização, pelo que a sua aplicação deve ser associada a outros fatores de crescimento, como o PDGF (Graves, Kang & Kose, 1994).

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) estimulam células como os fibroblastos, condroblastos e osteoblastos, entre outras, estimulando a atividade quimiotática e mitogénica das células do ligamento periodontal (Graves, Kang & Kose, 1994). Este fator de crescimento demonstra importantes propriedades angiogénicas tornando-se importante na mediação da formação de tecido de granulação.

Por fim, o fator de crescimento epidérmico (FGE) tem como principal função a regulação e estimulação da proliferação e diferenciação dos epitélios, essencialmente.

A utilização de fatores de crescimento apresenta alguns problemas associados ao seu curto tempo de semi-vida que provoca a sua degradação rápida (Ivanovski, 2009). No combate deste problema a terapia genética revela-se vantajosa, pois pela transferência de genes disponibiliza locais de fatores de crescimento. Não obstante, ainda não existem muitos estudos acerca da viabilidade da terapia genética, sendo necessário produzir mais provas da sua eficácia e segurança (Ivanovski, 2009).

Por outro lado, as técnicas cirúrgicas dos defeitos periodontais são imprevisíveis e a engenharia de tecidos apresenta-se como uma solução viável através da produção de tecidos periodontais em condições controladas (Ivanovski, 2009).

5.1 – Novas abordagens terapêuticas

As terapias de regeneração óssea tradicionais em periodontologia têm apresentado algumas limitações devido à severidade da doença e de fatores locais e sistêmicos, por exemplo. Numa tentativa de ultrapassar estes defeitos têm sido desenvolvidas novas técnicas de engenharia dos tecidos com base em células estaminais.

As células estaminais são células indiferenciadas com capacidade de autorenovação e diferenciação, *in vivo* e *in vitro*, originando múltiplas linhas celulares. Estas células podem diferenciar-se em qualquer célula especializada desde que sujeita aos estímulos certos (Kim et al., 2009).

De acordo com Kawaguchi et al. (2004) as células mesenquimatosas da medula óssea (MSCs) podem acelerar o processo de regeneração do tecido periodontal. Estes autores autotransplantaram MSCs em defeitos experimentais e concluíram que os defeitos do grupo de teste foram regenerados por cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. Considera-se que as MSCs da medula óssea transplantadas diferenciam-se nos fenótipos das células danificadas sob a influência de fatores relacionados com o hospedeiro. Os resultados a longo prazo da regeneração de tecidos funcionais dependem das interações entre as MSCs e o microambiente, sendo que o microambiente das MSCs engloba muitas citocinas, fatores de crescimento dissolúveis e matriz extracelular e são estes que conduzem à diferenciação das células transplantadas em células funcionais específicas.

Kramer et al. (2004) encontraram um aumento significativo na expressão de osteocalcina e osteopontina pelas células estaminais, bem como uma diminuição significativa da expressão de sialoproteína óssea, elementos característicos do ligamento periodontal. No seu estudo, os autores concluíram que as células estaminais mesenquimatosas com o contato com fatores do ligamento periodontal obtêm características semelhantes (Kramer et al., 2004).

Mais recentemente Zhao et al. (2008) demonstraram que vários fatores de crescimento foram essenciais para o desenvolvimento, maturação, manutenção e restauração dos tecidos periodontais, pois criam um microambiente periodontal favorável ao crescimento de células e tecidos.

Ainda não é conhecido o mecanismo exato pelo qual as MSCs se diferenciam em cementoblastos, osteoclastos e fibroblastos do ligamento periodontal. Sabe-se que os fatores relacionados com o hospedeiro influenciam as MSCs transplantadas a

diferenciarem-se em diversas células de tecidos conjuntivos. Mais ainda, sabe-se que o microambiente e o tecido circundante fornecem não só os nutrientes como os fatores de crescimento e matrizes extracelulares e promovem a diferenciação das MSCs (Hasegawa et al., 2006).

Kawaguchi et al. (2004) afirmam que a medula óssea pode representar uma alternativa de MSC na doença periodontal, pois as células estaminais do estroma medular (BMSC) demonstram ser capazes de reproduzir os tecidos periodontais e consertar os defeitos e, *in vivo*, formam não só cimento como osso alveolar e ligamento periodontal. Por conseguinte, as BMSC podem-se diferenciar em diversas linhagens celulares, conseguindo produzir quantidades significativas de osso novo e de ligamento periodontal com a largura adequada. Hasegawa et al. (2006) verificaram que um novo cimento e ligamento periodontal preencheram uma superfície radicular praticamente sem nada, mas não conseguiram obter a completa reconstrução do osso alveolar.

Alguns autores consideram que as BMSC não são adequadas para utilização na engenharia de tecidos pelo facto do seu número reduzir com o avanço da idade do indivíduo e que as células estaminais do tecido adiposo podem também induzir a produção de linhagens odontogénicas (Liu et al., 2007).

CONCLUSÃO

As técnicas de regeneração dos tecidos periodontais são reguladas não só em termos celulares como a nível molecular. As terapias até agora desenvolvidas e aplicadas na prática clínica não são lineares, isto é, é impossível prever de forma absoluta a maneira como a regeneração óssea irá ocorrer pois estas não atuam a nível molecular, por exemplo.

As principais limitações encontradas nas terapias em prática foram a incapacidade de controlar a formação de epitélio juncional longo e de isolar o local a tratar do meio oral prevenindo contaminações, a restrição de regeneração aos tecidos ósseos sem atender ao cimento e fibras, a incapacidade de definir especificamente os fatores de crescimento e diferenciação necessários, e haver infecção da membrana, enxerto ou do material regenerativo utilizado.

A regeneração dos componentes duros e moles deve ser coordenada e integrada pois o tecido conjuntivo insere-se no cimento e no osso. Assim, as novas abordagens direcionam-se para a biologia celular e molecular, mas ainda não se compreende totalmente a integração dos componentes necessários para que a forma, integridade e função dos tecidos seja alcançada.

Os enxertos ósseos e a regeneração óssea guiada são das técnicas mais aplicadas em lesões periodontais, sendo que pela sua efetividade, simplicidade e baixo custo é muitas vezes utilizado o plasma rico em plaquetas e as proteínas derivadas de esmalte. Todas as técnicas descritas apresentam vantagens e limitações e cabe ao médico dentista avaliar a lesão e decidir qual a melhor técnica a aplicar.

Nos últimos anos têm surgido diversos estudos que procuram avaliar a aplicação de células estaminais nas mais variadas áreas. As células estaminais derivadas da medula óssea reproduzem a regeneração periodontal pretendida, formam um novo cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Não obstante, a dor da colheita de medula, morbidade e reduzido número de células levou à procura de alternativas, surgindo as células estaminais de origem intra-oral.

Atualmente não se conhece os mecanismos de atuação para a diferenciação das células estaminais em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal. Por conseguinte, apesar de promissoras devem ser desenvolvidos mais

estudos para compreender o papel específicos das células estaminais no processo de regeneração.

BIBLIOGRAFIA

Albanese, A., Licata, M., Polizzi, B. & Campisi, G. (2013). Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immunity & Ageing*, 10, 23.

American Academy of Periodontology (AAP). (2005). Academy Report. Periodontal Regeneration (Position Paper). *J Periodontol*, 76, 1601 – 1622.~

Anitua, E. (1999). Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14, 529-535.

Arvidson, K., Abdallah, B., Applegate, L., Baldini, N., Cenni, E., Gomez-Barrena, E., et al. (2011). Bone regeneration and stem cells. *J Cel and Molecul Med*, 15(4), 718–746.

Barone, A. et al. (2009). Deep-Frozen Allogeneic Onlay Bone Grafts for Reconstruction of Atrophic Maxillary Alveolar Ridges: A Preliminary Study. *J Oral Maxillofac Surg*, 67(6), 1300-6

Bashutski, J. & Wang, H. (2009). Periodontal and Endodontic Regeneration. *J Endod*, 35, 321 – 328.

Bennett, N. & Schultz, G. (1993). Growth Factors and wound healing. *The American Journal of Surgery*, 165(6),728-737.

Bosshardt, D. et al. (2005). Effects of enamel matrix proteins on tissue formation along the roots of human teeth. *J Periodontal Res*, 40, pp.158-167.

Buser, D. et al. (1996). Long-term Stability of Osseointegrated Implants in Bone Regenerated with the Membrane Technique: 5-year Results of a Prospective Study with 12 Implants. *Clinic Oral Implants Res*, 7(2), 175-83.

Caffesse, R., Mota, L., Quinones, C. & Morrison, E. (1997). Clinical comparison of resorbable and non-resorbable barriers for guided periodontal tissue regeneration. *J Clin Periodontol*, 24 (10), 747-52.

Canalis, E. (1980). Effect of insulin like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest*, 66 (4), 709-19.

Carey, H., Bronisz, A., Cabrera, J., Hildreth, B., Cuitiño, M., Fu, Q., et al. (2015). Failure to Target RANKL Signaling Through p38-MAPK Results in Defective

Osteoclastogenesis in the Microphthalmia Cloudy-eyed Mutant. *Journal of Cellular Physiology*, 1-25.

Chen, W., Yang, S., Abe, Y., Li, M., Wang, Y., Shao, J., et al. (2007). Novel pycnodysostosis mouse model uncovers cathepsin K function as a potential regulator of osteoclast apoptosis and senescence. *Human Molec Gen*, 16(4), 410–423.

Cho, M., Lin, W. & Genco, R. (1995). Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodont*, 66 (6), 522-30.

Das, S., Samant, R. & Shevde, L. (2012). Review Article The Hedgehog Pathway Conditions the Bone Microenvironment for Osteolytic Metastasis of Breast Cancer. *Int J Breast Cancer*, 298623.

Desarda, H., Gurav, A., Gaikwad, S. & Inamdar, S. (2013). Platelet rich fibrin: A new hope for regeneration in aggressive periodontitis patients: Report of two cases. *Indian Journal of Dental Research*, 24 (5), 627-630.

Dusse, L., Macedo, A., Batschauer, A. & Carvalho, M. (2008). Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e sua aplicacao em Oodontologia. *RBAC*, 40 (3), 193-7.

Ehrenfest, D., Rasmusson, L. & Albrektsson, T. (2008). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, 27 (3), 158-167.

Esposito, M., Coulthard, P., Thomsen, P. & Worthington, H. (2004). Enamel matrix derivative for periodontal tissue regeneration in treatment of intrabony defects: a cochrane systematic review. *J Dent Educ*, 68 (8), 834-844

Everts, V., Korper, W., Hoeben, K., Jansen, I., Bromme, D., Cleutjens, K., et al. (2006). Osteoclastic Bone Degradation and the Role of Different Cysteine Proteinases and Matrix Metalloproteinases: Differences Between Calvaria and Long Bone. *J Bone and Mineral Res*, 21(9), 1399–1408.

Goldberg, V. & Akhavan, S. (2005). *Bone Graft Healing*. In: Lieberman, J.R. Friedlaender, G.E. (Ed). *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Totowa, NJ, Humana Press, p. 57-66.

Gomes, K., et al. (2008). Use of Allogeneic Bone Graft in Maxillary Reconstruction for Installation of Dental Implants. *J Oral Maxillofac Surg*, 66 (11), 2335-8.

Goto, T., Yamaza, T. & Tanaka, T. (2003). Cathepsins in the osteoclast. *J Electron Microsc*, 52(6), 551–558.

Graves, D., Kang, Y. & Kose, K. (1994). Growth Factors in Periodontal Regeneration. *Compend Contin Educ Dent*, 18, 672 – 677.

Hallman, M. & Thor, A. (2008). Bone Substitutes and Growth Factors as an Alternative/Complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *J Clin Periodontology*, 47, 172-192.

Hammerle, C. & Jung, R. (2003). Bone augmentation by Means of Barrier Membranes. *Periodontology 2000*, 33(1), 36-53

Hammarstrom, L. (1997). Enamel matrix, cementum development and regeneration, *J Clin Periodontol*, 24, pp. 658-668.

Hardwick, R. et al. (1994). *Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge*. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editors. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence: 101-136.

Hasegawa, N., Kawaguchi, H., Hirachi, A., Takeda, K., Mizuno, N., Nishimura, M., et al. (2006). Behaviour of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol*, 77, 1003-1007.

Hirooka, H. (1998). The biologic concept for the use of enamel matrix protein: True periodontal regeneration. *Quintessence Int*, 29, 621-630

Horne, W., Sanjay, A., Bruzzaniti, A. & Baron, R. (2005). The role(s) of Src kinase and Cbl proteins in the regulation of osteoclast differentiation and function. *Immunol Rev*, 208(1), 106–125.

Howell, H. & Fiorellini, J. (1997). A Phase I/II Clinical Trial to Evaluate a Combination of Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB and Recombinant Human Insulin -Like Growth Factor-I in Patients with Periodontal Disease. *J Periodontol*, 68, 1186-1193.

Ivanovski, S. (2009). Periodontal regeneration. *Aust Dent J*, 54, S118–28.

Johnson, L. (2000). *Fundamentos de fisiologia médica*. 2ª Ed., Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 502-511.

Judas, F., Palma, P., Falacho, R. & Figueiredo, H. (2012). Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Retrieved 21 de Agosto de 2017, from <http://hdl.handle.net/10400.4/1346>.

Kaigler, D., Cirelli, J. & Giannobile, W. (2008). Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering. *Expert Opin Drug Deliv*, 3 (5), 647 – 662.

Kawaguchi, H., Hirachi, A., Hasegawa, N., Iwata, T., Hamaguchi, H., Shiba, H., et al. (2004). Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol*, 75 (9), 1281-1287.

Kim, S., Kim, K., Seo, B., Koo, K., Kim, T., Seol, Y., et al. (2009). Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *J Periodontol*, 80, 1815-1823.

Kornman, K. & Robertson, P. (2000). Fundamental principles affecting the outcomes of therapy for osseous lesions. *Periodontol*, 22, 22-43.

Kramer, P., Nares, S., Kramer, S., Grogan, D. & Kaiser, M. (2004). Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res*, 83 (1), 27-34.

Kular, J., Tickner, J., Chim, S. & Xu, J. (2012). An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinic Biochemistry*, 45(12), 863–873.

Lang, N., Araújo, M. & Karring, T. (2005). *Formação do Osso Alveolar*. In: Lindhe, J. (Ed). *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 4ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 843-73

Lee, K., Kim, H., Park, H. S., Kim, K., Song, H., Shin, H., & Kim, H. (2013). Targeting of the Osteoclastogenic RANKL – RANK Axis Prevents Osteoporotic Bone Loss and Soft Tissue Calcification in C oxsackievirus B3 – Infected Mice. *J Immunol*. 190, 1623-1630.

Lindhe, J., Karring T. & Araújo M. (2008). *The Anatomy Periodontal Tissues*. In: Lindhe, J., Lange, N. e Karring, T. *Clinical periodontology and implant dentistry*. (5ª edição).USA, Blackwell Munksgard, p. 3-43.

Liu, T., Martina, M., Hutmacher, D., Hui, J., Lee, E. & Lim, B. (2007). Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*, 25 (3), 750-760

Long, B. et al. (2012). Evaluation of a Novel Reconstituted Bone Xenograft Using Processed Bovine Cancellous Bone in Combination with Purified Bovine Bone Morphogenetic Protein. *Xenotransplantation*, 19 (2), 122-32.

Louis, P. (2011). Bone Grafting the Mandible. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am*, 23 (2), 209-27.

Lyford, R. et al. (2003). Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: A case series. *International Journal of Periodontology and Restorative Dentistry*, 23, 417-425.

Lynch, S., et al. (1991). The Effects of Short-Term Application of a Combination of Platelet-Derived and Insulin-Like Growth Factors on Periodontal Wound Healing. *J Periodontol*, 62, 458-467.

Lyngstadaas, S. et al. (2009). Enamel matrix proteins; old molecules for new applications. *Orthod Craniofac Res*, 12, 243–253.

Maeda, K., Takahashi, N. & Kobayashi, Y. (2013). Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Molecul Med*, 91(1), 15–23.

Marie, P. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 98–105.

Marx, R. (1999). *Platelet-rich plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. Tissue Engennerin: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. 1ª ed., Illinois, Quintessence Books, p. 71-82.

Marx, E., Carlson, E., Eichstaedt, R., Schimmele, S., Strauss, J. & Georgeff, K. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85, 638-646.

Matos, S. (2008). *Aplicação de matrizes enriquecidas com moduladores biológicos na regeneração de tecidos periodontais e tecidos ósseos*. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Mumford, H., Carnes, L. & Oates, W. (2001). The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Periodontal Cells in an In Vitro Wound Model. *J Periodontol*, 72, 331-340.

Nagata, M., Messoria, M., Furlaneto, F., Fucini, S., Bosco, A., Garcia, V., et al. (2010). Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. *Eur J Dent*, 4 (4), 395-402.

Nemcovsky, E. & Serfaty, V. (1996). Alveolar Ridge Preservation Following Extraction of Maxillary Anterior Teeth. Report on 23 Consecutive. *J Periodont*, 67 (4), 390-395.

Petinaki, E., Nikolopoulos, S., Castanas, E. (1998). Low stimulation of peripheral lymphocytes following in vitro application of Emdogain. *J Clin Periodontol*, 25, 715-720.

Phipps, W., Sands, J. & Marek, J. (2003). *Enfermagem Médico-Cirúrgica, Conceitos e Prática clínica*. 6ª Edição, Camarate, Lusociência.

Raja, S., Byakod, G. & Pudakalkatti, P. (2009). Growth factors in periodontal regeneration. *Int J Dent Hygiene*, 7, 82–89.

Roberts, A. et al. (1992). Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 3494-8.

Rucci, N. (2008). Molecular biology of bone remodelling, Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis. *Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 5(49–56).

Ryoo, H., Lee, M. & Kim, Y. (2006). Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, 366 (1), 51–57.

Sculean, A., Schwarz, F., Miliauskaite, A., Kiss, A., Arweiler, N., Becker, J., et al. (2006). Treatment of intrabony defects with an enamel matrix protein derivative or bioabsorbable membrane: an 8-year follow-up split-mouth study. *J Periodontol*, 77 (11), 1879-1886

Sculean, A. et al. (2001). Effect of an enamel matrix protein derivative (EmdogainA) on ex vivo dental plaque vitality. *J Clin Periodontol*, 28, 1074–1078.

Sculean, A. et al. (2008). Ten-year results following treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*, 35(9), 817-24.

Seeley, R., Stephens, T. & Tate, P. (2000). *Sistema esquelético: ossos e tecido ósseo*. Anatomia & Fisiologia, Lusociência.

Simion, M. et al. (1996). GBR with an e-PTFE Membrane associated with DFDBA: Histologic and Histochemical Analysis in Human Implant retrieved after 4 Years of Loading. *International Journal of Periodontology and Restorative Dentistry*, 16, 339-347;

Simsek, S., Keles, G., Baris, S. & Cetinkaya, B. (2012). Comparison of mesenchymal stem cells and autogenous cortical bone graft in the treatment of class II furcation defects in dogs. *Clin Oral Invest*, 16(1), 251-8.

Smukler, H., Landi, L. & Setayesh, R. (1999). Histomorphometric evaluation of extraction sockets and deficient alveolar ridges treated with allograft and barrier membrane: a pilot study. *The Internat J Oral & Maxillofacial Implants*, 14 (3), 407-16.

Soltanoff, C., Chen, W., Yang, S. & Li, Y. (2012). Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Changes*, 29(6), 997–1003.

Sunitha, R. & Munirathnam, N. (2008). Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian Journal of Dental Research*, 19 (1), 42-46.

Suthin, K., Matsushita, K., Machigashira, M., Tatsuyama, S., Imamura, T., Torii, M. & Izumi, Y. (2003). Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, 38 (1), 90-96.

Suzuki, S., Morimoto, N. & Ikada, Y. (2013). Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *J Biomater Applications*, 28, 15-18.

Sutherland, D. & Bostrom, M. (2005). *Grafts and Bone Graft Substitutes*. In: Lieberman, J.R. Friedlaender, G.E. (Ed). *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Totowa, NJ, Humana Press, p. 133-56

Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., et al. (2009). TGF- β 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature Medicine*, 15(7), 757–765.

Thesleff, I. & Tummers, M. (2003). Stem Cells and Tissue Engineering: Prospects for Regenerating Tissues in Dental Practice. *Medical Principles and Practice*, 12 (suppl1), 43 – 50.

Thompson, W., Rubin, C. & Rubin, J. (2012). Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene*, 503(2), 179–193.

Tischler, M. (2002). Platelet rich plasma. The use autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *NY State Dent J*, 68, 22-24.

Tonetti, M., Pini-Prato, G. & Cortellini, P. (1995). Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. A preliminary retrospective study. *J Clin Periodontol*, 22(3), 229-34.

Palmqvist, P., Persson, E., Conaway, H. & Lerner, U. (2002). IL-6, Leukemia Inhibitory Factor, and Oncostatin M Stimulate Bone Resorption and Regulate the Expression of Receptor Activator of NF- κ B Ligand, Osteoprotegerin, and Receptor Activator of NF- κ B in Mouse Calvariae. *J Immunol*, 1, 6(23).

Peters, E., Boudin, E. & Van Hul, W. (2008). Wnt signaling: a win for bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 112–6.

Villar, C. & Cochran, D. (2010). Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am*, 54 (1), 73-92.

Upadhyay, J., Farr, O. & Mantzoros, C. (2015). The role of leptin in regulating bone metabolism. *Metabolism*, 64(1), 105–113.

Wikesjö, U. et al. (2003). Periodontal repair in dogs: evaluation of a bioresorbable spaceproviding macro-porous membrane with recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Periodontal*, 74, 635 – 647.

Zhao, Q., Gong, P., Tan, Z. & Yang, X. (2008). Differentiation control of transplanted mesenchymal stem cells (MSCs): A new possible strategy to promote periodontal regeneration. *Med Hypotheses*, 70, 944-947.