



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

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**FACTORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO METABOLISMO
ÓSSEO**

Trabalho submetido por
Ana Teresa Pinheiro Figueiredo Magalhães
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Novembro de2015



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

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**FACTORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO METABOLISMO
ÓSSEO**

Trabalho submetido por
Ana Teresa Pinheiro Figueiredo Magalhães
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Alexandra Maia e Silva

Novembro de 2015

I. Dedicatória

Dedico esta tese à minha Mãe, Eduarda, pela grande mulher que é, pelos valores que me inculuiu ao longo da minha vida e deste trajecto e pelo seu amor incondicional. Adicionalmente, dedico-a à minha irmã, Rita, que se manteve sempre ao meu lado quando me sentia desanimada e sem esperança.

Adicionalmente, dedico esta tese ao meu querido futuro marido, Fábio, o meu companheiro, pelo seu amor incondicional, pela sua paciência, pelo seu apoio e pelo encorajamento durante este desafio.

Dedico esta tese a todos os meus familiares, destacando o apoio fundamental dos meus avós, que se destacaram na minha vida de uma maneira positiva e contribuíram de alguma forma para este sucesso!

Não me querendo esquecer de ninguém, dedico esta tese, também a uma pessoa muito especial, a minha “mana” Mary.

II. Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos à Prof. Alexandra Maia e Silva, pelo seu profissionalismo, pela sua liderança e orientação, pela sua paciência e por se revelar uma óptima orientadora durante este período de pesquisa científica.

Quero manifestar aqui, um agradecimento especial aos meus amigos, colegas e bibliotecários, que me facilitaram e ajudaram na orientação da minha pesquisa bibliográfica.

Obrigada a todos os professores que me acompanharam neste percurso académico e que me ajudaram a alcançar este objectivo, particularmente às professoras Ana Clara Ribeiro, Alexandra Figueiredo e Cristina Toscano.

Finalmente, gostaria de agradecer ao excelente Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, que sendo a minha segunda casa, me proporcionou o conhecimento que me permitiu elaborar esta tese e iniciar a minha atividade profissional; e que me deu diversas histórias e recordações que jamais esquecerei.

III. Resumo

O tecido ósseo é constituído por diferentes tipos celulares, dos quais se destacam os osteoblastos e os osteoclastos, os principais tipos celulares envolvidas na formação e remodelação óssea. Os osteoblastos derivados de células estaminais mesenquimais, são células responsáveis pela formação óssea, com capacidade de se diferenciarem, por último, em osteócitos. Os osteoclastos, originados a partir de precursores da linhagem dos monócitos/macrófagos, são células multi-nucleadas com a responsabilidade de reabsorção óssea. A transição destas células a partir dos seus progenitores é crucial para que ocorra a osteogénese e a remodelação óssea. Ao longo deste processo, estas células são reguladas por vários factores genéticos. O compromisso das linhagens celulares e a sua diferenciação é controlado por uma série actividades que envolvem a regulação da transdução e da transcrição genética, através de diversas vias de sinalização.

Uma má regulação da diferenciação celular e uma perda de função, por parte destes dois tipos celulares, pode conduzir a uma panóplia de doenças do forro ósseo, como a doença de Paget, a osteoporose, a osteopetrose, a artrite reumatoide, o aparecimento de metástases ósseas derivadas, por exemplo, do cancro da próstata. Destacando a osteoporose, uma doença multifactorial, que pode ser dividida em dois tipos: o tipo primário e o tipo secundário. Existem diversas hipóteses genéticas sobre esta patologia por explorar, talvez por consequência da falta de esclarecimentos da genética sobre as células ósseas envolvidas neste processo. Novas descobertas sobre terapêuticas já existentes, parecem ter tido algum significado clínico, como a terapêutica hormonal de substituição, em que era feita por praticamente todas mulheres pós-menopáusicas e que agora caiu um pouco em desuso.

Nesta tese estão evidenciadas novas descobertas relacionadas com os factores genéticos envolvidos no crescimento e desenvolvimento ósseo, permitindo, assim, uma melhor compreensão sobre estes processos ao nível do metabolismo ósseo.

Palavras-chave: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, factores genéticos, vias de sinalização, osteoporose.

IV. Abstract

Bone tissue is made up of different cell types, among which are osteoblasts and osteoclasts, the two major cells involved in bone formation and bone remodeling. Osteoblasts derived from mesenchymal stem cells are cells responsible formation, with the ability to differentiate themselves into osteocytes. Osteoclasts, originated from precursors of the monocytes/macrophages line are multi-nucleated cells, which are responsible for bone reabsorption. The transition of these cells from their progenitors is crucial to the occurrence of the osteogenesis and bone remodeling. Throughout this process, these cells are regulated by multiple genetic factors.

The commitment of the cell lines and their differentiation is controlled by a series of activities that involve the transduction and regulation of gene transcription through various signaling pathways.

A poor regulation of the cellular differentiation and a loss of the function of these two cell types can result in a variety of bone diseases such as: Paget's disease, osteoporosis, rheumatoid arthritis and the onset of bone metastasis derived for example from prostate cancer.

Highlight on osteoporosis, which is a multifactorial disease that can be divided into two types: primary or secondary. There are several genetic hypotheses about this disease yet to be explored, perhaps due to the lack of enlightenment about the genetics of the bone cells involved in this process. New insights into existing therapies seem to have had some clinical significance, such as hormone replacement therapy, that was used almost by all post-menopausal women and now has fallen somewhat out of use.

In this thesis is highlighted new findings related to genetic factors involved in bone growth and development, thus allowing a better understanding of this processes at the level of the bone metabolism

Keywords: osteoblasts, osteoclasts, osteocytes, genetic factors, signalling pathways, osteoporosis.

V. Índice

I. Dedicatória	3
II. Agradecimentos	5
III. Resumo	7
IV. Abstract	9
V. Índice	11
VI. Índice de Figuras	13
VII. Índice de Tabelas	14
VIII. Abreviaturas	15
1. Introdução	17
2. Células ósseas e a sua diferenciação	23
2.1. Osteoblastos	23
2.2. Osteoclastos	27
2.3. Osteócitos	31
3. Controlo molecular da osteogénese	39
3.1. Vias de sinalização da diferenciação dos osteoblastos	39
3.1.1. Via de sinalização Wnt	39
3.1.2. Via de sinalização Hedgehog.....	45
3.1.3. Via de sinalização pela super-família TGF- β	47
3.1.4. Via de sinalização FGF.....	52
3.1.5. Via de sinalização IGF.....	54
3.1.6. Via de sinalização PDGF.....	54
3.1.7. Via de sinalização da Eferina (Eph)	55
3.1.8. Via de sinalização PTH	56
3.1.9. Via de sinalização simpática.....	56
3.2. Vias de sinalização da diferenciação dos osteoclastos	57
3.2.1. RANKL.....	57
3.2.2. M-CSF	59
3.2.3. NF- κ B	59
3.2.4. ITAM	60

3.2.5. RGS10 e RGS12	61
3.2.6. Src	62
3.2.7. Catepsina k.....	63
3.2.8. Vav3.....	64
4. Factores de transcrição reguladores da diferenciação osteoblástica	65
4.1. Runx2.....	65
4.2. Osterix	69
4.3. ATF4.....	69
5. Factores de transcrição reguladores da diferenciação osteoclástica.....	71
5.1. PU.1.....	71
5.2. AP-1	72
5.3. NF-κB	72
5.4. NFATc1	73
5.5. Mitf	74
5.6. Myc	74
6. Patologias associadas ao metabolismo ósseo	75
6.1. Osteoporose	75
7. Considerações finais	79
8. Bibliografia.....	81

VI. Índice de Figuras

FIGURA 1: ESTRUTURA DO OSSO	19
FIGURA 2: MARCADORES BIOLÓGICOS NA DIFERENCIAÇÃO DE CONDRÓCITOS E OSTEOBLASTOS.	23
FIGURA 3: VIAS DE SINALIZAÇÃO DURANTE A DIFERENCIAÇÃO DOS OSTEOBLASTOS.	24
FIGURA 4: DIFERENCIAÇÃO DOS OSTEOBLASTOS, ADAPTADA DE KULAR ET AL., (2012)	25
FIGURA 5: EXPRESSÃO GENÉTICA NA DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOCLASTOS.....	28
FIGURA 6: VIA DE SINALIZAÇÃO DO RANKL NA DIFERENCIAÇÃO DOS OSTEOCLASTOS	30
FIGURA 7: DIFERENCIAÇÃO DOS OSTEOBLASTOS EM OSTEOCITOS	31
FIGURA 8: DIFERENÇAS NOS OSTEOCITOS, DEPENDENTES DA IDADE E DA DEFICIÊNCIA EM <i>PERLECAN</i>	36
FIGURA 9: VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT- VIA CANÓNICA (A+B) E VIA NÃO CANÓNICA (C).	40
FIGURA 10: SINALIZAÇÃO WNT EM DIVERSOS TIPOS CELULARES.....	41
FIGURA 11: VIA DE SINALIZAÇÃO DA Wnt, DESTACANDO A VIA DE SINALIZAÇÃO NÃO CANÓNICA.....	44
FIGURA 12: DESCRIÇÃO DO MODO DE ACTUAÇÃO DE FACTORES TRANSCRIPCIONAIS NA VIA DE SINALIZAÇÃO POR TNF-B	50
FIGURA 13: VIAS DE SINALIZAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOCLASTOS	60

VII. Índice de Tabelas

TABELA 1: FASES DE REMODELAÇÃO ÓSSEA	20
TABELA 2: FACTORES CO-ACTIVADORES E CO-REPRESSORES DO RUNX2,	68
TABELA 3: GENES ASSOCIADOS À BMD/OSTEOPOROSE, DETECTADOS EM ALGUNS ESTUDOS E CORRELACIONADOS COM A DENSIDADE DA MASSA ÓSSEA E O FENÓTIPO RELACIONADO COM A OSTEOPOROSE	76

VIII. Abreviaturas

ActR-IA- receptor de activina IA	GSK3 β - quinase glicogénio sintetase 3 β
APC- polipose adnomatosa coli (do inglês, <u>adenomatous polyposis coli</u>)	IGF- factor de crescimento insulínico (do inglês, <u>Insulin Growth Factor</u>)
ALP- fosfatase alcalina	IKK- inibidor da quinase κ B
AP-1-factor de transcrição de osteoclastos	IL-1- interleucina 1
Bcl-L(X)- isoforma da família BCL2-like 11, inibidor da apoptose dos osteoclastos	IHh- <i>Indian Hedgehog</i>
BMP/BMU- proteínas ósseas morfogénicas/unidades ósseas morfogénicas	ITAM- <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
BSP- sialoproteína óssea (do inglês, <u>bone sialoprotein</u>)	JNK- quinase c-Jun N-terminal
CB1- <i>Casitas B-lineage lymphoma</i>	LAP- proteína associada à latência
CBFa1-ativador transcripcional da diferenciação dos osteoblastos	LCS- sistema canaliculi-lacunar (do inglês, <u>Lacunar-Canaliculi System</u>)
COL-II-colagénio tipo2	LepRb- receptor de leptinas
COL1A1- colagénio tipo1 alfa1	LRP5- receptor lipoprotéico de baixa densidade (do inglês, <u>low-density lipoprotein receptor- related protein 5 and 6</u>)
CVB3- <i>Coxsackievirus</i>	MAPKs- selective mitogen activated protein kinases
C/EBP α - <i>enhancer-binding protein α</i>	MAP p38- p38 mitogen-activated protein
c-Fms- receptor de M-CSF	MCS- células estaminais mesenquimais (do inglês, <u>Mesenchymal stem cells</u>)
DAP12- <i>DNAX-activating protein 12</i>	M-CSF- factor estimulador de colónia de macrófagos (do ingles, <u>Macrophage -Colony Stimulator Factor</u>)
DHh- <i>Desert Hedgehog</i>	MITF- factor transcripcional associado a microfetalmia
DKK- dickkopf	
Dlx5/6- <i>Distal-less homeobox 5/6</i>	
DVL- proteínas <i>Disheveled</i>	
FcR γ - <i>FC receptor common γ subunit</i>	
FGF- factor de crescimento fibrobalsto	
Fra-1- factor de transcrição Fra-1	

MMPs- metaloproteases de matriz	RhoA- proteína G pequena
Msx2- <i>Homeo box homolog 2</i>	RANK- Receptor activador do factor nuclear κ B
NFAT- <i>calcium-nuclear factor of activated T-cells</i>	RANKL- Ligando do receptor activador do factor nuclear κ B
NFATc1- <i>nuclear factor-activated receptor calcineurin-dependent 1</i>	RNAi- RNA de interferência
NF- κ B - Factor nuclear KB	RhoA- família de genes homóloga ras
OSX- osterix	Rors- receptor tirosina quinase órfão
OPG- osteoprotegerina	Runx-2- factor de transcrição 2 relacionado com <i>runt</i>
OPN- osteopontina	sFRP- proteínas solúveis relacionadas com o <i>Frizzled</i>
OCN- osteocalcina	SHh- <i>Sonic Hedgehog</i>
Osf2- factor activador d	Smad- proteínas <i>mothers against decapentaplagic homolog</i>
OSCAR- receptor associado aos osteoclastos	SOST- gene que expressa esclerostina
PCP-polaridade celular planar	SOX- <i>sex determining region Y-box</i>
Pi- fosfato inorgânico	STAT1- transdutor de sinal e activador de transcrição 1
PIP ₃ - fosfatidinositol-3,4,5-trifosfato	TCF/LEF- factor de células T/ factor potenciador linfocítico
PLC γ - fosfolipase C γ	TNF β - factor de necrose tumoral β
PTCH1/2- receptor transmembranar <i>Patched 1</i> ou <i>Patched 2</i>	TRAF- factores associados ao receptor de factor de necrose tumoral citoplasmático
PGE2- prostaglandina 2	TREM-2- receptor <i>triggering</i> expresso nas células mieloides
PPAR γ - peroxisome proliferator activated receptor γ	1,25-Vit. D3- vitamina D3
PTH- hormona paratiróide	WNT- <i>Wingless-int</i>
PTHR1- receptor 1 relacionado com a hormona paratiróide	Wif-1- factor inibidor de Wnt
PU.1- factor estimulador de macrófagos	
Pyk2- tirosina quinase 2	
Rac- proteína G pequena	

1. Introdução

O esqueleto humano é um sistema complexo constituído por 206 ossos, cartilagem, nervos e tendões (Dos Santos, et al., 2009). Tem três competências fundamentais, uma estrutural, mecânica e outra metabólica, sendo esta última regulada por hormonas calciotrópicas (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006/2007; Rubin et al., 2006; Soltanoff, Chen, Yang, & Li, 2012). Tem como funções: dar suporte e estrutura ao corpo humano, permitindo o movimento; dar protecção aos órgãos vitais, por exemplo, protegendo o cérebro (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006), e a nível fisiológico, funcionar como um reservatório de cálcio e facilitar a hematopóiese (Boyce, Yao, & Zhang, 2007), uma vez que as células sanguíneas advêm da medula óssea e as células ósseas, por si só, ajudam na renovação de células estaminais hematopoiéticas (Boyce et al., 2007).

Estruturalmente, os ossos definem-se como ossos planos ou chatos, ossos curtos e ossos longos, classificados quanto ao seu comprimento, espessura e largura; constituídos por osso esponjoso e por osso compacto. Estes estão distribuídos ao longo do esqueleto humano em dois planos- plano axial e apendicular (Dos Santos, et al., 2009).

Os ossos longos, como o fémur, são divididos em três partes, o seu comprimento denominado por corpo ou diáfise, e as suas extremidades designadas por epífise e, ainda, entre essas duas extremidades e o corpo ósseo destaca-se uma zona onde ocorre o crescimento ósseo, a metáfise. Neste tipo de osso, o comprimento é a maior dimensão. Para além deste tipo ósseo, os ossos curtos têm todas as dimensões semelhantes, como por exemplo as vertebrae; e os ossos que apresentam uma menor espessura em relação às suas outras dimensões, são classificados em ossos planos ou chatos, por exemplo os ossos do crânio e da pelve (Dos Santos, et al., 2009).

Nos ossos existe uma substância mole no seu interior, a medula óssea. Esta pode ser classificada em dois tipos de medula óssea- medula óssea amarela e medula óssea vermelha. Esta última é o local onde começa a hematopóiese (Dos Santos, et al., 2009).

O tecido ósseo é classificado como osso cortical e o osso trabecular que representam 80% e 20% da massa óssea total, respectivamente (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006/2007), e estão mineralizados cerca de 80-90% e 15-25%, respectivamente, sofrendo diferentes processos de ossificação- ossificação intramembranosa e ossificação endocondral (Vidal, 2007).

O tecido ósseo cortical, localizado, em camadas concêntricas, na zona externa dos ossos longos e, em camadas finas, na zona externa dos ossos planos, permite dar rigidez (Vidal, 2007) ao osso e manter o seu metabolismo devido à sua constituição- osteões e sistema de Haversian (Vidal, 2007).

O osso trabecular, maioritariamente localizado nas vértebras e noutras zonas axiais, tem várias funções metabólicas, como a manutenção da homeostase mineral e ser um reservatório de células hematopoiéticas (Vidal, 2007).

O tecido ósseo é acompanhado por uma matriz extracelular constituída com cerca de 90% de colagénio tipo I (Arvidson et al., 2011), e calcificada com cristais de hidróxiapatite (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Arvidson, et al., 2011).

Resumidamente, existem 4 tipos de células principais ao longo da matriz óssea, as quais ajudam a manter a capacidade óssea activa, pois o osso exige um processo de renovação constante (Arvidson, et al., 2011; Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006/2007; Vidal, 2007):

- **Osteoprogenitores:** células estaminais mesenquimais (MSCs), células precursoras dos osteoblastos;
- **Osteoblastos:** derivados de MSCs, são células responsáveis pela síntese de colagénio e de proteínas, como a osteocalcina (OCN) e a osteopontina (OPN) e, também, pela formação de fosfatase alcalina (ALP), responsável pela formação de hidróxiapatite (Arvidson et al., 2011; K. Lee et al., 2015; Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Rucci, 2008; Vidal, 2007);
- **Osteócitos:** células maduras que ocupam o espaço anatómico do osso, cujo nome é lacuna. A estrutura assemelha-se a uma estrela/neurónio, em que as suas extensões permitem comunicações entre células (Schaffler, Cheung, Majeska, & Kennedy, 2015);
- **Osteoclastos:** células derivadas da fusão de progenitores mononucleares da família dos monócitos/macrófagos e são

responsáveis pela reabsorção óssea (Arvidson et al., 2011; K. Lee et al., 2015; Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Rucci, 2008; Vidal, 2007).

De entre as células referidas, é muito importante a coordenação entre a reabsorção óssea feita pelos osteoclastos e a deposição mineral feita pelos osteoblastos para uma renovação óssea eficiente (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Rucci, 2008; Tang et al., 2009).

Para compreender como funciona o metabolismo ósseo é fundamental perceber como é que o osso está organizado no seu interior, onde se localizam os diferentes tipos de células, entre outros factores. Assim, cortando o osso de forma transversal, como vemos na figura 1, para além de vermos a parte esponjosa do osso, ou seja o osso trabecular (que torna o osso mais leve), ao seu redor, observamos um tipo de osso compacto organizado em círculos, os osteões. O osteão, no seu interior, tem um canal, o canal de Haversian, que através do qual passam vasos sanguíneos, circundado por lamelas, que se apresentam na forma de anéis concêntricos. Entre estes últimos existem lacunas onde se encontram os osteócitos. Existe, também, um canal de Volkman que é perpendicular aos osteócitos, irrigado com sangue, permitindo a comunicação entre estes (Vidal, 2007).

Osso Compacto e Esponjoso

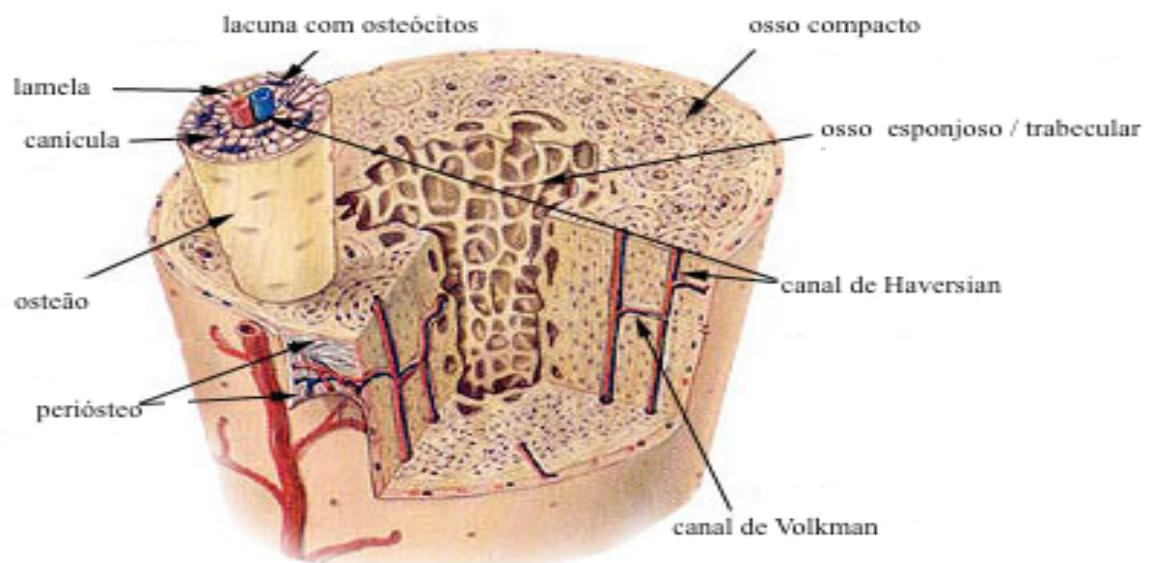


Figura 1: Estrutura do osso, adaptada de (Ferraro, 2012)

O *turnover* ósseo está organizado em duas fases: uma fase de modelação, onde ocorre o desenvolvimento ósseo, e uma fase de remodelação, onde ocorre a renovação óssea. Assim, é fundamental que o *turnover* ósseo seja correcto para manter a integridade do tecido, pois este está em constante processo de remodelação, o qual se traduz num equilíbrio entre reabsorção e deposição óssea (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Resumidamente, ao longo da remodelação óssea existem quatro fases: fase de activação, fase de reabsorção, fase de reversão e fase de formação, como está descrito na tabela 1 (Rucci, 2008; Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006).

Tabela 1: Fases de Remodelação Óssea

Fases	Acontecimento
1 ^a - fase de activação	Activação de vários factores na sequência de um estímulo. Diferenciação de osteoclastos, pelo aumento da expressão do receptor activador do factor nuclear κ B (RANK) (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Rucci, 2008).
2 ^a - fase de reabsorção	Reabsorção da matriz extracelular: acidificação da matriz óssea para a degradação da parte inorgânica matricial e libertação de enzimas lisossomais para a degradação da parte orgânica matricial (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Rucci, 2008).
3 ^a - fase de reversão	Percursos osteoblásticos preenchem a cavidade de reabsorção com uma matriz orgânica (fibras de colagénio posteriormente adicionadas de iões de bicarbonato e fosfato de cálcio) (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Rucci, 2008).
4 ^a - fase de formação	Libertação de vários factores de crescimento, responsáveis pela captação de osteoblastos responsáveis pela mineralização óssea, completando o processo (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Rucci, 2008).

Como foi referido, existem uma série factores sistémicos, libertados durante a reabsorção e a formação óssea (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006). Destacando que a remodelação óssea feita pelos osteoclastos é, também, sujeita a uma regulação

por parte de hormonas calciotrópicas, como a hormona paratiróide, a calcitonina e a 1,25-dihidroxitvina D3 (1,25-vit D3) (Li & Xiao, 2007; Schaffler et al., 2015; Soltanoff et al., 2012; Vidal, 2007).

Por fim, o desenvolvimento ósseo pode ser concretizado através de dois processos: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. No primeiro processo são formados os ossos planos, os ossos do crânio e as clavículas; no segundo processo são formados os ossos crânio-faciais, os ossos do esqueleto axial e apendicular. Em ambos inicialmente há uma condensação dos progenitores MSC nos sítios onde se formarão os ossos. Contudo, ossificação intramembranosa é baseada na deposição de colagénio tipo I, formado a partir dos osteoblastos, sobre uma camada fibrosa de tecido conectivo. Após isto, procede-se à mineralização óssea, onde ocorre a deposição de fosfato de cálcio na matriz e há formação osso esponjoso. A ossificação endocondral, por si só, envolve um processo de transformação do mesênquima numa espécie de cartilagem que se assemelha à forma do osso, sendo responsável pela formação da maioria dos elementos pertencentes ao sistema vertebral. Este último processo é altamente regulado por factores de crescimento, vias de sinalização e citoquinas, nomeadamente o factor Indian hedgehog (Ihh) (Jochmann, Bachvarova, & Vortkamp, 2014; Kular, Tickner, Chim, & Xu, 2012; Zhao et al., 2015).

2. Células ósseas e a sua diferenciação

2.1. Osteoblastos

Os osteoblastos são células cuboides, altamente especializadas (Schaffler et al., 2015), derivadas de *stem cells* mesenquimais, os osteoprogenitores (Arvidson et al., 2011; Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006; Rucci, 2008; Vidal, 2007), com a capacidade adicional de se diferenciarem, por último, em osteócitos (Kular et al., 2012). Este tipo de células, os osteoprogenitores, são pluripotentes e indiferenciadas, ou seja, têm a capacidade de se diferenciar noutros tipos de células (condrócitos, mioblastos, adipócitos) após um estímulo, através da expressão genética, como demonstrado na figura 2 (Soltanoff et al., 2012).

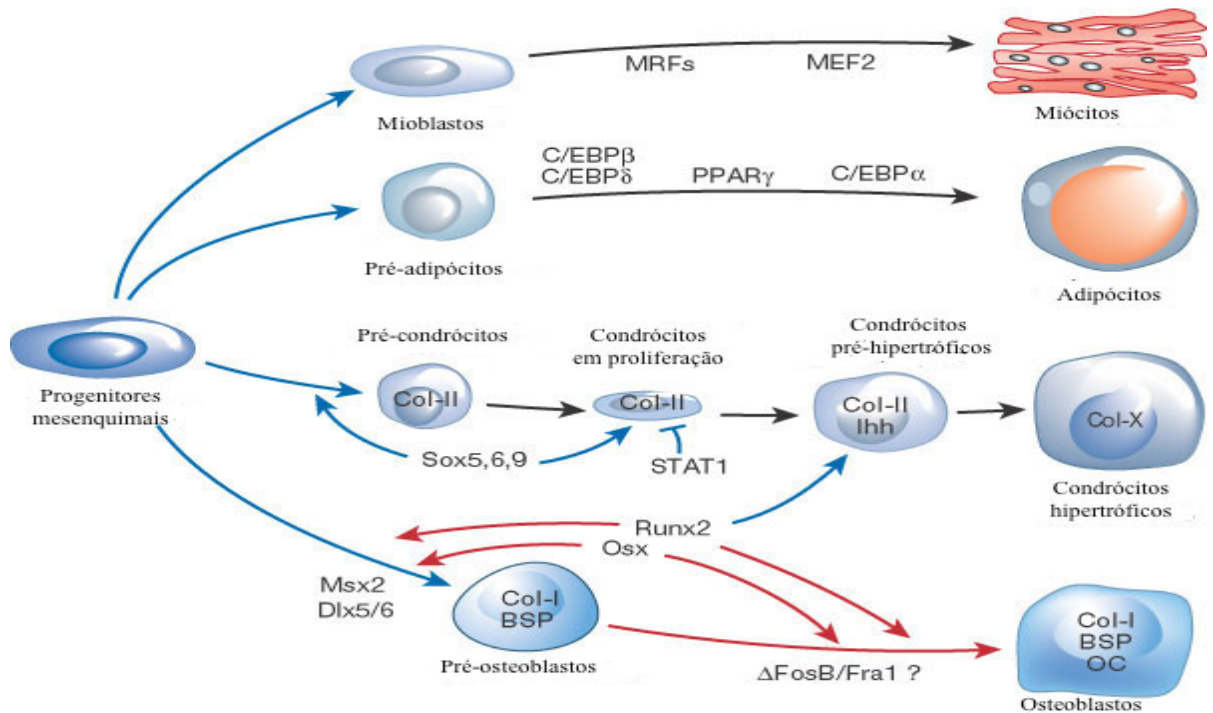


Figura 2: Marcadores biológicos na diferenciação de condrócitos e osteoblastos. Adaptada de (Harada&Rodan, 2003).

Estas células são cruciais no metabolismo ósseo, pois sem elas não haveria síntese de algumas proteínas importantes para a formação da matriz óssea e, assim, o

processo de calcificação ficaria incompleto (Arvidson et al., 2011), uma vez que estas células, também, participam na homeostasia do cálcio (Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006).

Existem 3 fases principais ao longo da génese dos osteoblastos: proliferação, maturação da matriz e mineralização (Soltanoff et al., 2012). Para que tal aconteça, ao longo do processo de diferenciação, é necessária a intervenção de diversos factores de crescimento, factores transcricionais, entre outras proteínas, que são activados após a formação de progenitores ósseos, proporcionando a diferenciação em osteoblastos (Vidal, 2007). Como por exemplo, o factor envolvido no desenvolvimento blastogénico (CBFa1/Osf2) (Kronenberg, 2004; Leite-Moreira & Santos-Araújo, 2006), o factor de transcrição 2 relacionado com *runt* (Runx2), o factor de transcrição Fra-1 (Fra-1) e osterix (Fig. 2) que serão descritos mais à frente (Arvidson et al., 2011; Hartmann, 2009; Rucci, 2008; Vidal, 2007).

Inicialmente, a diferenciação dá-se pela via de sinalização Wnt/ β -catenina (Kular et al., 2012) pela interação de Wingless-int (Wnt) com a via de sinalização das proteínas morfogénicas ósseas (BMP), e do Factor de Necrose Tumoral β (TNF- β) (Figura 3) (Arvidson et al., 2011; Rucci, 2008; H.-M. Ryoo, Lee, & Kim, 2006; Vidal, 2007).

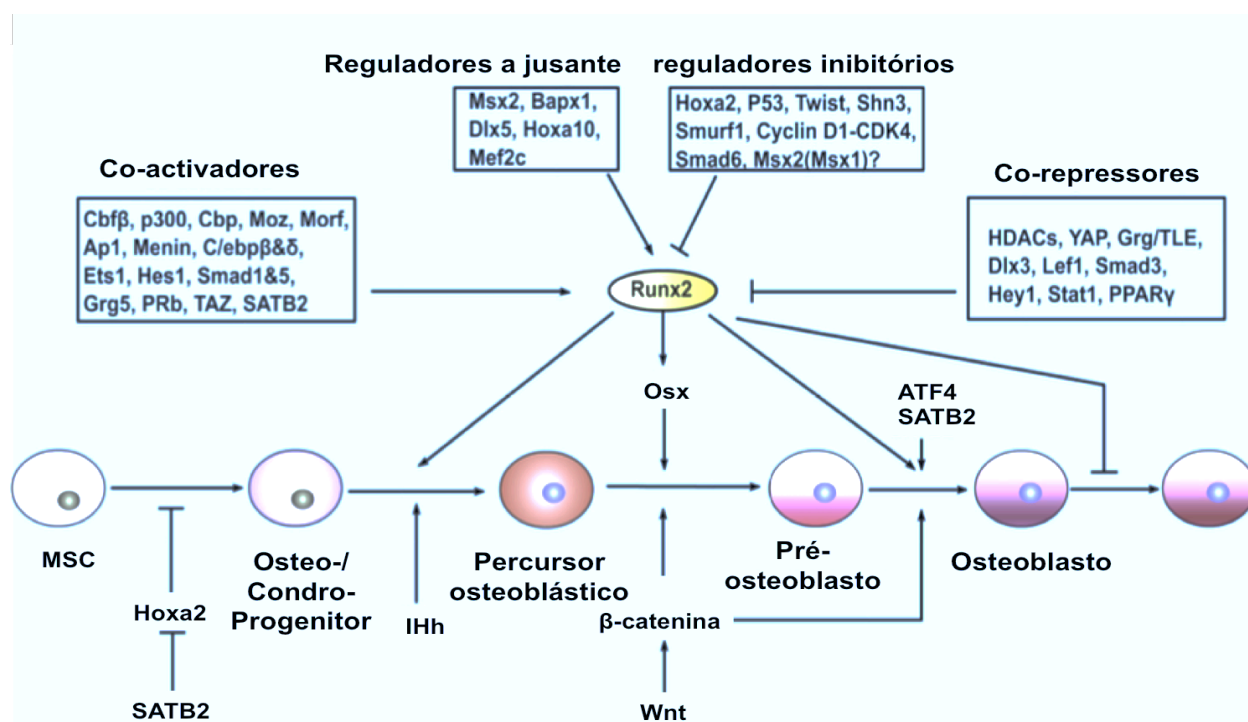


Figura 3: Vias de sinalização durante a diferenciação dos osteoblastos, adaptada de (Soltanoff et al. 2012).

Segundo Rucci, a proteína Wnt10b inibe a formação de pré-adipócitos, estimulando a formação de osteoprogenitores e condroprogenitores (Rucci, 2008).

Pela presença de Wnt, em concentrações desejadas, há bloqueio do *enhancer-binding protein* r (C/EBP α), o factor de transcrição adipogénico, e do PPAR γ . Através deste mecanismo, há um aumento de expressão de outros factores que vão auxiliar na diferenciação celular (Rucci, 2008).

Quando há a ligação do complexo Wnt com o complexo formado pelo receptor lipoproteico de baixa densidade 5 (LPR5), considerado por alguns autores um mecanoreceptor na regulação da massa óssea (Schaffler et al., 2015; Thompson, Rubin, & Rubin, 2012), com o receptor *frizzled*, a proteína β -catenina não é submetida a fosforilação, permanecendo activa, pois é desenvolvido um sinal que envolve algumas proteínas, como as proteínas Disheveled (Dvl), a axina (Axin) e o Frat-1 (Rucci, 2008), que, como mostra a figura 4, inibem a quinase glicogénio sintetase 3 β (GSK3 β). Consequentemente, a β -catenina é translocada para o núcleo e interage com alguns factores de transcrição, como o factor de células T/ factor potenciador linfocítico (TCF/LEF), regulando a expressão dos genes responsáveis por factores genéticos alvos de Wnt (Y.-L. Li & Xiao, 2007; Rucci, 2008).

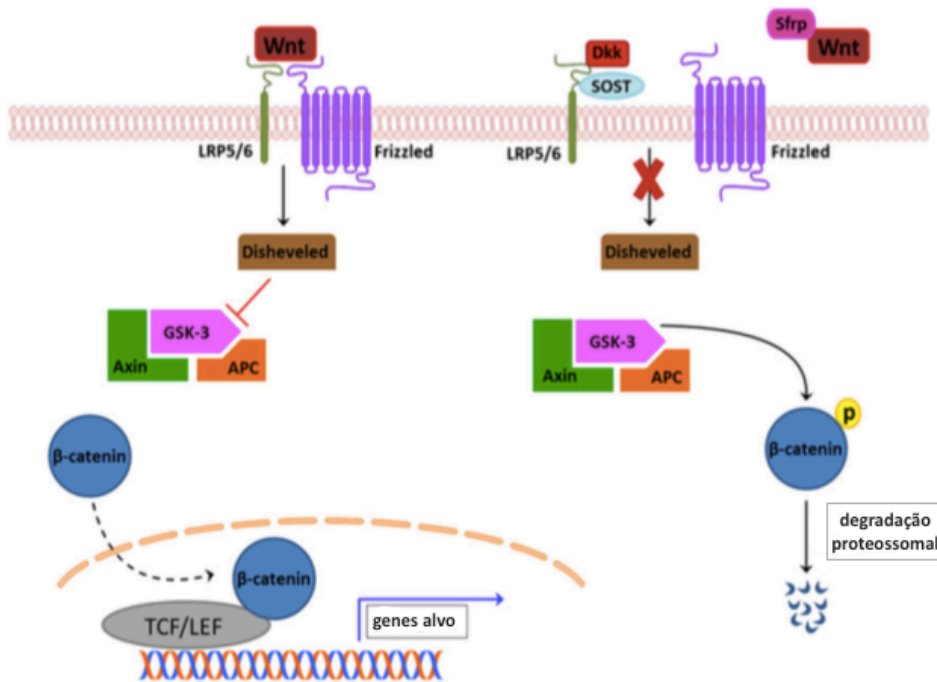


Figura 4: Diferenciação dos Osteoblastos, adaptada de (Kular et al., 2012)

Caso não haja bloqueio da quinase GSK3 β , a β -catenina será fosforilada, e, conseqüentemente, será promovida a sua degradação proteossomal (Kular et al., 2012; Thompson et al., 2012).

Este é um passo crucial para o desenvolvimento de osteoblastos, pois tanto a sinalização Wnt como a LRP5, também, são alvos de alguns factores que permitem controlar a sua actividade. A sinalização Wnt é controlada negativamente pelo factor inibidor do Wnt 1 (Wif-1) e por proteínas solúveis relacionadas com o receptor *Frizzled* (sFRP), pois estes dois factores, tanto o Wif-1 como o sFRP, interagem com o LRP5. Enquanto que as proteínas Dickkopf (DKK) e a esclerostina (regulada pelo produto do gene SOST) são inibitórias da LRP5/6, pois bloqueiam o seu receptor (Kular et al., 2012; Rucci, 2008).

Após formação de um progenitor osteogénico, o factor Runx2 permite a continuação da diferenciação osteoclástica, seguindo-se a activação de mais dois 2 factores - o Dlx5, o Osx (Arvidson et al., 2011; Kular et al., 2012; Rucci, 2008; Vidal, 2007).

O factor Runx2 é o responsável pela diferenciação de osteo/condroprogenitores em progenitores ósseos específicos. A partir daqui, a Osx vai permitir com que haja diferenciação de progenitores ósseos específicos e a formação de pré-osteoblastos, que podem ser detectados pela presença de alguns marcadores, como a ALP, marcada fracamente, a PTHR1 e Col1A1, como mostra a figura 2 (Hartmann, 2009; Rucci, 2008).

Os pré-osteoblastos ainda não são capazes de efectuar a mineralização óssea ao contrário dos osteoblastos que conseguem produzir tecido mineralizado (Kular et al., 2012).

Após a formação destes, a diferenciação segue naturalmente até ao término da sua proliferação, dando origem aos osteoblastos maduros, que expressam fortemente alguns marcadores, como a ALP. Também são detectados pela produção proteínas matriciais como Col 1A1 (ver fig.2), osteopontina (OPN), osteonectina, sialoproteína óssea (BSP) e, por último, pela expressão de osteocalcina (OCN). Esta última está aumentada no final da diferenciação de osteoblastos maduros, pois é associada à mineralização osteóide (Rucci, 2008; Ziros, Basdra, & Papavassiliou, 2008).

Como foi referido, para além da via de sinalização Wnt na diferenciação dos osteoblastos, também, as BMP, pertencentes à superfamília do TNF- β são essenciais para a diferenciação osteoblástica (Kular et al., 2012).

Resumidamente, o TNF- β é crucial para expandir os progenitores ósseos e promover a sua diferenciação, através da activação de MAPKs e pela sinalização de proteínas *Smad 2 e 3* (Kular et al., 2012).

Também, as BMP forçam a activação de *Smads* e a sua translocação para o núcleo, de modo a activarem a transcrição de genes osteogénicos. Todavia, tanto estas vias de sinalização como a da Wnt interagem umas com as outras e com outras vias como a da hormona paratiróide (PTH) e do *Notch* (Kular et al., 2012).

No entanto na via de sinalização por BMP, outros inibidores foram descritos, relacionados com a inibição da ligação destas ao seu receptor. Assim, temos o Noggin e a esclerostina. Esta última, também antagoniza o efeito provocado pelo Wnt (Kular et al., 2012; Rucci, 2008).

Para além dos efeitos referidos, pelas leptinas na regulação do metabolismo ósseo, há evidências, segundo alguns estudos, de uma relação entre o sistema imunitário e o metabolismo ósseo, pois as leptinas também estão descritas como tendo um papel relevante no equilíbrio da função imunitária. Por exemplo, em mulheres com um défice em leptinas e com privação de energia crónica, a reposição do nível de leptinas após oito semanas demonstrou um aumento dos níveis de receptores de TNF- α , justificando a correcção da função imunitária (Upadhyay, Farr, & Mantzoros, 2015).

Segundo alguns estudos recentes, foi evidenciada uma relação entre o aumento da produção de citocinas, responsáveis pela formação, diferenciação óssea e pelo metabolismo ósseo, e a infeção causada pelo vírus *Coxsackievirus* (CVB3). Esta última evidência da resposta do sistema imunitário mostra um aumento de células T que pode produzir RANKL. Para além dos níveis desta citocina estarem aumentados, também, os níveis de TNF- α e IL-1 β estão elevados após 1 a 2 semanas da infeção. Contudo o antagonista de RANKL (OPG) está, da mesma forma, aumentado, o que demonstra que não há interferência no rácio RANKL/OPG e que este aumento de ambos simultaneamente, pode ser originado pela resposta imunitária do organismo. (K. Lee et al., 2015).

2.2. Osteoclastos

Os osteoclastos são células derivadas de *stem cells* hematopoiéticas, pertencentes à linhagem dos monócitos/ macrófagos (Kular et al., 2012; Rucci, 2008;

Takayanagi, 2007), ou seja, como o que acontece nos osteoblastos, derivam de células pluripotentes capazes de se diferenciarem em qualquer tipo de células, dependendo do tipo de estímulo recebido por alguns factores genéticos, nomeadamente o factor estimulador de colónia de macrófagos (M-CSF) e o RANKL, como é possível observar na figura 5 (Kular et al., 2012; Palmqvist, Persson, Conaway, & Lerner, 2002; Rucci, 2008; Takayanagi, 2007).

Após a sua adesão à matriz, os osteoclastos, fundamentais para reabsorção óssea, ajudam na formação óssea e na regulação da massa óssea (Kular et al., 2012; Rucci, 2008).

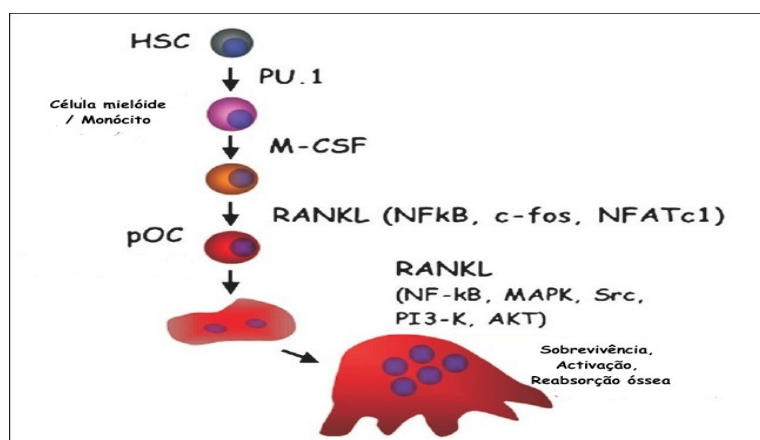


Figura 5: Expressão genética na diferenciação de osteoclastos, adaptada de (Lookfordiagnosis, 2014)

Como observamos na figura 5, o factor de transcrição PU.1 juntamente com o factor M-CSF estimulam a proliferação de precursores dos osteoclastos. Contudo M-CSF é um factor responsável pelo aumento da expressão de RANKL (Rucci, 2008).

A diferenciação e proliferação dos osteoclastos pode ser regulada por diversas vias. Para além de serem reguladas pelo factor RANKL, a sua diferenciação também é determinada pelos osteoblastos, pelo sistema imunitário e por algumas citocinas inflamatórias e outras unidades morfogénicas ósseas (BMU) (Kular et al., 2012; Rucci, 2008).

O RANKL é uma proteína de membrana (Rucci, 2008), pertencente à família do TNF- α , produzido por algumas células do estroma e pelos osteoblastos. Tem como seu receptor membranar o RANK, outra proteína de membrana que se localiza na superfície dos precursores dos osteoclastos. Este receptor membranar possui três

locais de ligação intramembranar, que são destinados a factores associados ao receptor de factor de necrose tumoral citoplasmático (TRAF) (Darnell, 2013; Rucci, 2008).

Este factor genético, referido acima, é regulado por vários factores como a PTH, a prostaglandina 2 (PGE2) e pela interleucina 1 (IL-1) (Kular et al., 2012; Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Quando há estimulação do RANKL, após a sua ligação ao receptor, as moléculas de TRFA6 ligadas ao receptor RANK ficam sujeitas a uma trimerização, activando, assim, a transcrição de factor nuclear κ B (NF- κ B) e de MAPKs (Rucci, 2008).

Quando não há nenhum estímulo externo, o NF- κ B permanece no citoplasma. Contudo entra no núcleo em resposta a alguns factores como o RANKL, regulando, assim, a transcrição de vários genes relacionados com a proliferação e diferenciação de osteoclastos (Palmqvist et al., 2002; Rucci, 2008)

NF-KB regula, também, a expressão de *calcium-nuclear factor-activated receptor calcineurin-dependent 1* (NFATc1), outro factor chave para a diferenciação na osteoclastogénese (fig.6) (Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

O recrutamento juntamente da proteína activadora 1 (AP-1) é crucial, pois este é formado por um complexo factorial composto pelo c-Fos, pelo c-jun e proteínas ATF; onde o c-Fos é induzido especialmente pelo RANK (Rucci, 2008). JNK, para além de fosforilar c-Jun, activa Ap-1, através do aumento da actividade transcripcional; consequentemente, ERK que activa o c-fos, estimulando o RANK. Assim, a activação de AP-1 juntamente com a indução da transcrição de NFATc1, permite a sua amplificação, fazendo com que a cooperação entre diversos factores, como AP-1, PU.1, NF- κ B, factor transcripcional associado a microfetalmia (MITF) e NFATc1, regulem a transcrição de vários genes envolvidos na diferenciação de osteoclastos, como descrito na figura 6 (Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Como foi mencionado, a osteoclastogénese pode, também ser influenciada pelos osteoblastos, visto que estas células têm a capacidade de influenciar a interação entre estes e os precursores osteoclásticos e, ainda, pela sua interação com o eixo RANKL-RANK (figura 6) (Kular et al., 2012; Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

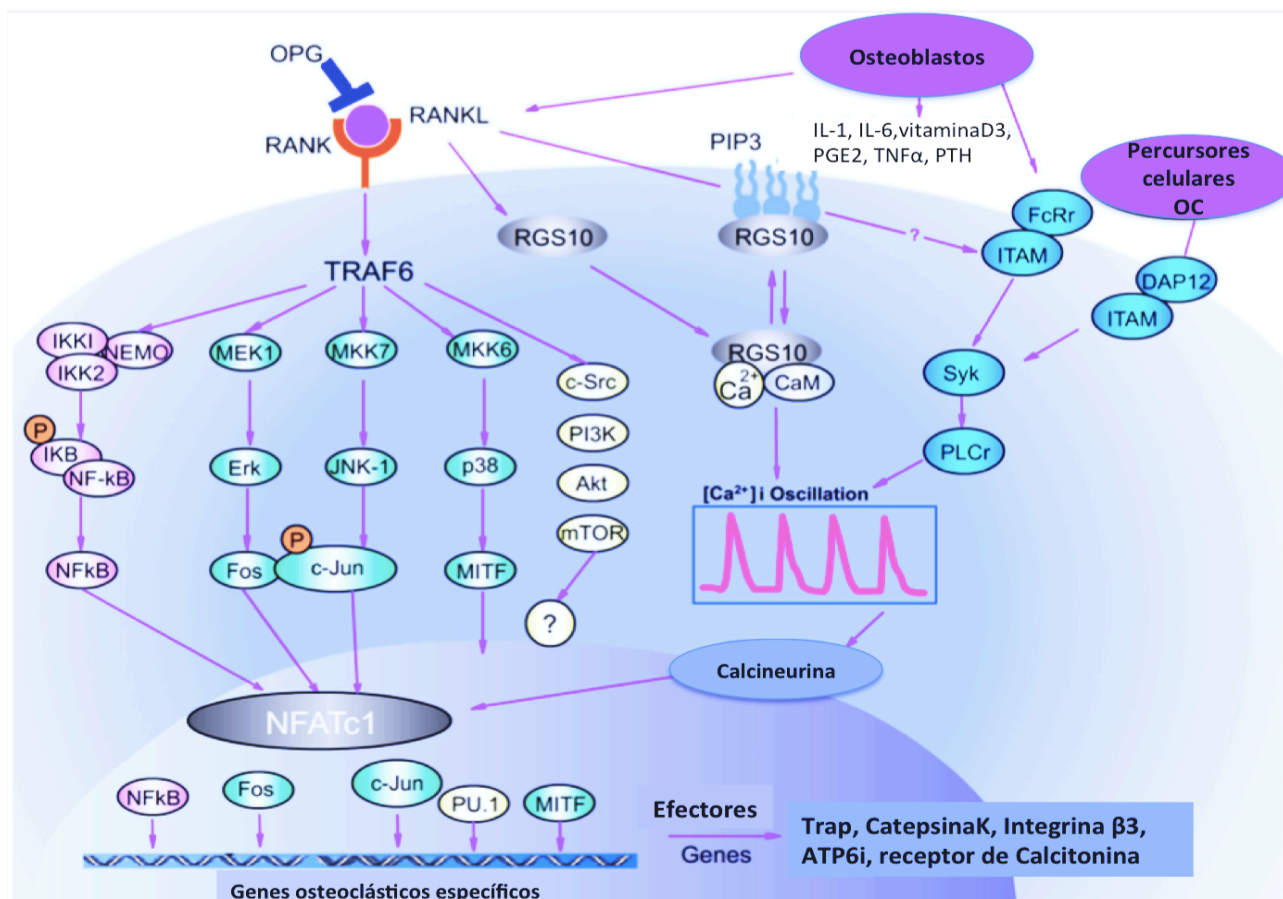


Figura 6: Via de sinalização do RANKL na diferenciação dos osteoclastos, adaptada de (Soltanoff et al. 2012).

Para além dos osteoblastos secretarem o factor RANKL, também secretam a osteoprotegerina (OPG), que é um factor que antagoniza o efeito do RANKL, impedindo a proliferação da osteoclastogénese. Este factor, a OPG, desempenha um papel de protecção óssea, sendo fundamental na regulação do metabolismo ósseo. OPG é uma proteína estruturalmente idêntica ao factor que antagoniza, com maior afinidade que o RANKL, interagindo com o seu receptor, o RANK, inibindo a sua ligação ao receptor específico e impedindo a progressão da osteoclastogénese (Rucci, 2008).

Por outro lado, os osteoblastos promovem a proliferação e diferenciação dos osteoclastos, pela regulação da expressão de M-CSF que interage com o receptor de M-CSF (c-Fms) presente nos precursores osteoclastos (Rucci, 2008).

Em consequência do estudo referido anteriormente sobre a infecção pelo vírus CVB3, por *K. Lee et al.* (2015), houve um aumento da população mieloide, após infecção, que pode sofrer diferenciação em direcção aos osteoclastos. Com base nos

resultados apresentados anteriormente, foi proposto que a estimulação da diferenciação dos osteoclastos e a eventual perda de massa óssea foram devidas ao aumento da produção de citocinas inflamatórias e de progenitores osteoclásticos (K. Lee et al., 2015).

2.3. Osteócitos

Este tipo celular representa a última etapa de diferenciação dos osteoblastos, como podemos observar na figura 7, que são incorporados na matriz óssea acabada de formar, antes de ser mineralizada. Representa a maioria das células constituintes do tecido ósseo adulto, representando cerca de 90%-95% das células no tecido ósseo adulto (Kerschnitzki et al., 2013; Lai et al., 2015; Schaffler et al., 2015). Muitas destas células mantêm-se num determinado local, a lacuna óssea, durante toda a vida do organismo, devido à sua mineralização, podendo, por fim, sofrer apoptose. Principalmente ao nível das suas extensões, os osteócitos são ricos em actina, a qual pertence ao citoesqueleto, permitindo, assim, a sua ligação às restantes células ósseas e demonstrando uma característica mecano-sensitiva (Kerschnitzki et al., 2013; Kular et al., 2012; Schaffler et al., 2015).

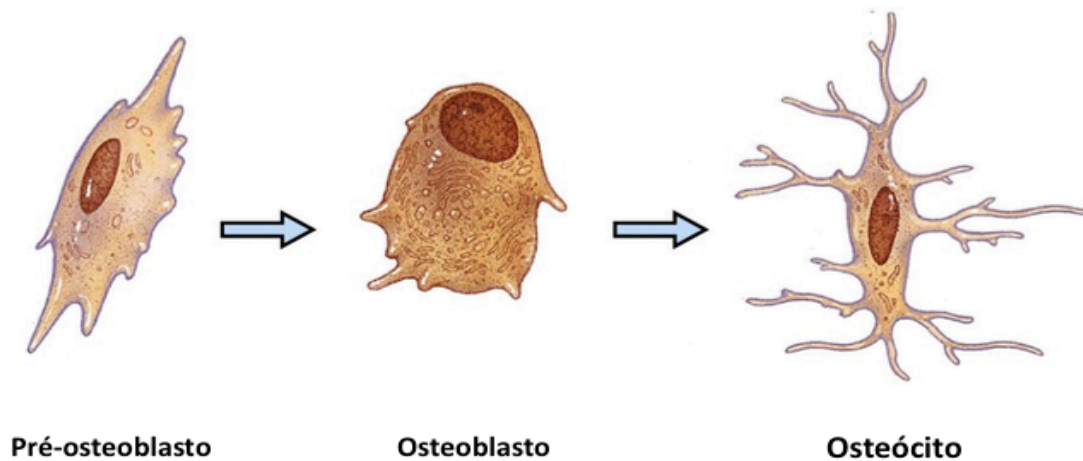


Figura 7: diferenciação dos osteoblastos em osteócitos, adaptado de (Nogueira, R., 2011)

Divergem dos osteoblastos pela sua forma e pelo menor número de funções, embora sejam muito importantes. Apresentam-se com uma forma semelhante à de um neurónio, com um corpo pequeno estrelado e com extensões que lhes permitem

comunicar entre várias células do interior ósseo à da superfície óssea (*tethering*) e entre células da sua vizinhança (fig.7) (Rubin et al., 2006; Schaffler et al., 2015; Thompson et al., 2012). Estas interações são observadas num espaço definido pelo sistema canaliculi-lacunar (LCS), que como referido é na lacuna, onde permanecem os seus pequenos corpos e na canaliculi, as suas extensões, rodeados por uma matriz desorganizada (Schaffler et al., 2015). Assim, este espaço fornece uma grande dimensão de superfície óssea exposta para possíveis comunicações através dos osteócitos, permite a obtenção de nutrientes por parte dos mesmos através da irrigação sanguínea e permite receber, interpretar e modificar rapidamente a sua actividade metabólica após estímulos mecânicos, revelando-os mecano-sensores (Lai et al., 2015; Rubin et al., 2006).

Para além destas características, necessitam de metaloproteinasas (MMP) para concluir a sua extensão através da matriz óssea, acabando por residirem apenas num mesmo local até sofrerem apoptose, após mineralização. Segundo Schaffler et al. (2015), estudos demonstraram a necessidade de MMP-2 na formação dos osteócitos e das suas junções através das extensões delgadas que apresentam (Schaffler et al., 2015).

O seu número de extensões é representativo do seu número de ligações. Podem ser afectados por vários factores, como o local onde permanecem e o espaço fluido que os separa da matriz óssea mineralizada, pelo seu tipo e nº limitado de extensões, pelo tipo de sinais recebidos que alcançam algumas distâncias até ao núcleo do osteócito, através das suas extensões, e pelo seu tipo de transmissão de sinal, que é semelhante ao dos neurónios (Schaffler et al., 2015; Thompson et al., 2012). As ligações das extensões dos osteócitos à parede do LCS denominam-se por *tethers* que estão na base da produção de algumas respostas ao movimento do líquido intersticial (Schaffler et al., 2015).

O espaço pericelular do LCS permite, para além da passagem de água, nutrientes e resíduos celulares, que os osteócitos recebam estímulos para os quais demonstrem sensibilidade para desenvolver uma resposta. Este espaço tem um fluido semelhante ao do espaço articular cartilágneo em termos de composição, contendo uma quantidade definida de macromoléculas, das quais algumas possam ser resíduos dos osteócitos e que pelas quais se possa manter a permeabilidade do espaço fluido do LCS. Este espaço submete os osteócitos a um conjunto de forças devidas ao movimento do fluido, resultando num impacto sobre a função dos osteócitos e sobre a

estimulação intracelular de vários factores como MAPK, β -catenin, GTPases que poderão alterar a expressão de genes alvo e, conseqüentemente, a adaptação celular (Schaffler et al., 2015; Thompson et al., 2012).

Durante a última década, houve o desenvolvimento de diversos estudos que tentaram desvendar a capacidade sensitiva do tecido ósseo, destacando este tipo celular ósseo como um sensor nas várias vias de sinalização em resposta a diferentes estímulos (Rubin et al., 2006; Schaffler et al., 2015; Thompson et al., 2012). Contudo vários mecanismos têm sido propostos para justificarem a capacidade sensitiva dos mesmos (Schaffler et al., 2015). Segundo Kular et al. (2012), estes funcionam como mecano-sensores, que quando estão localizados próximos do local lesado, a indução da apoptose é relacionada com o aumento da remodelação óssea, devido ao aumento da expressão do RANKL e da potenciação da osteoclastogenese. Contudo a presença de *stress* mecânico está relacionado com a diminuição da expressão do RANKL e com o aumento da expressão da proteína sintetase de óxido nítrico (sNO) (Kular et al., 2012; Rubin et al., 2006; Thompson et al., 2012).

Entretanto, segundo os resultados de alguns estudos feitos *in vitro* e *in vivo*, revelaram que a força induzida pela movimentação do fluido é a mais relevante que actua nos osteócitos, contudo a alteração da estrutura do LCS, também, pode induzir a alguns estímulos. Os osteócitos reconhecem os estímulos provocados e emitem uma resposta através da regulação da formação e remodelação óssea. Podem até emitir segundos mensageiros, como o óxido nítrico (NO), cálcio (Ca^{2+}), ATP e PEGs em resposta a alterações da estrutura do LCS e a outras forças (Kerschnitzki et al., 2013; Lai et al., 2015). Estes 2^{os} mensageiros estão implicados em vários mecanismos da regulação do desenvolvimento ósseo. Por exemplo, o óxido nítrico gerado pelos osteócitos, está implicado na diminuição do RANKL e de OPG. E, conseqüentemente, o baixo fluxo ao nível canalicular, reduz a produção de NO pelos osteócitos locais, induzindo a apoptose e atraindo os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea de células danificadas e mortas e da matriz óssea (Liedert, Kaspar, Blakytyn, Claes, & Ignatius, 2006). O Ca^{2+} está implicado na regulação feita pelo IP₃, ATP e NO; estimula a PKA, MAPK e c-Fos. Contudo, recentemente, foi demonstrado que a libertação de prostaglandina é dependente da entrada de Ca^{2+} através da libertação de ATP (Thompson et al., 2012).

Este tipo celular, para além de sintetizar algumas citoquinas importantes, OCN, OPN e DMP1 (Schaffler et al., 2015), é, também, responsável pela produção de

gentes inibidores que actuam sobre a formação óssea, como a esclerostina. Apesar da esclerostina ser um regulador negativo na formação óssea, não está implicada na reabsorção. Assim, esta é capaz de inibir o sinal produzido pelo complexo WNT/ β -catenina, que será abordado mais à frente, que está envolvido na inibição da proliferação celular, impedindo, também, a mineralização óssea e promovendo a apoptose (Kular et al., 2012).

Está evidenciado que os osteócitos e a sua rede de interligações detêm um papel importante na regulação do metabolismo fosfo-cálcio, pois para além de manterem a homeostase do cálcio, também estão envolvidas no controlo dos níveis de fosfato no organismo (Kerschnitzki et al., 2013). De entre as proteínas referidas, a OCN e DMP1 têm a capacidade de se ligarem ao cálcio, inibindo, assim, a mineralização e mantendo os canais do sistema LCS abertos. Também a proteína membranar *proteoglicana sultafó heparínico 2* (perlecan), tem a capacidade de manter os canais do LCS abertos e permitir a regulação do tamanho do espaço pericelular da canaliculi dos osteócitos, sendo observado que o espaço canalicular está reduzido em ratinhos deficientes em perlecan (Jochmann et al., 2014; Schaffler et al., 2015; Thompson et al., 2012).

Sem a mineralização dos osteócitos, o sistema LC fornece várias superfícies expostas para a ligação e permite o transporte de algumas moléculas como as citocinas, PTH, esclerostina, RANK por convecção. O movimento gerado por algumas forças mecânicas resultando do esforço muscular e da actividade física, por exemplo, vai permitir o transporte destas e de outras moléculas com massa não superior a 70 KDa. Assim, pode dizer-se que os osteócitos para desempenhar o seu papel ao nível da sinalização celular necessitam de diferentes factores de sinalização de diversos tamanhos que dependem do movimento do fluido no LCS e da organização da matriz pericelular (Schaffler et al., 2015).

Relativamente ao *perlecan*, está demonstrado um potencial papel deste no fenómeno *tethering*; havendo, também evidências de que os osteócitos contêm nas suas extensões uma proteína transmembranar CD44 com um domínio extracelular responsável pela ligação de ácido hialurónico e com um domínio intracelular que se liga à actina do citoesqueleto (Schaffler et al., 2015).

Para além da forma como os osteócitos demonstram a sua capacidade sensitiva, como referido inicialmente, existem estudos que demonstram novos meios de sinalização que estes utilizam, como a sugestão de um organito denominado cilia

primária. Este, porém, tem uma capacidade sensitiva e transdutora de sinais químicos e mecânicos emitidos pelo o movimento do fluido (Schaffler et al., 2015).

Kerschnitzki et al. (2013) desenvolveram uma nova tecnologia que permite ver e quantificar as ligações dos osteócitos no LCS, permitindo correlacionar a forma da rede osteócitos com as propriedades ósseas que descrevem a qualidade óssea, para perceber melhor como é que os osteócitos e a matriz óssea que o rodeia interagem. Esta técnica baseia-se na microscopia confocal em complementaridade com *small-angle x-ray scattering signal* (SAXS). Isto revelou para além da existência de uma grande quantidade de osteócitos interligados de uma forma robusta através dos canais canaliculares e que, apesar da quantidade de resíduos presentes na rede formada pelos osteócitos oscilar, provou que a maioria dos resíduos está localizada a um micrómetro de distância dos osteócitos. Para além disso, identificou que a qualidade material óssea depende, também, da organização da rede de ligações dos osteócitos, referindo uma organização bimodal, ou seja, onde havia uma rede mais densa de osteócitos, havia uma melhor homogeneidade mineral, enquanto que uma rede de osteócitos fraca, seria menos organizada e com uma qualidade mais fraca. Algumas modificações ou distúrbios desta organização podem ser relacionadas com a osteoporose, por exemplo (Kerschnitzki et al., 2013).

Com base na técnica utilizada anteriormente, Lai et al. (2015) descreveu o comportamento dos osteócitos e da sua rede de ligação no LCS com o avanço da idade, na presença de deficiência em *perlecan* e na presença de diabetes, como mostra a figura 8. Neste estudo a estabilidade da rede formada pelos osteócitos mantém-se ao nível dos números de ligações. A patologia da diabetes parece causar uma alteração do espaçamento lacunar, enquanto que na deficiência em *perlecan* traz uma profunda interferência no diâmetro do espaço fluido pericelular. O impacto a este nível, também foi detectado com o aumento da idade pela alteração da actividade osteolítica e anabólica dos mesmos. As características abordadas neste estudo alcançaram novas perspectivas ao nível da comunicação intercelular e da resposta a estímulos mecânicos na regulação anabólica potente para a renovação e adaptação óssea (Lai et al., 2015).

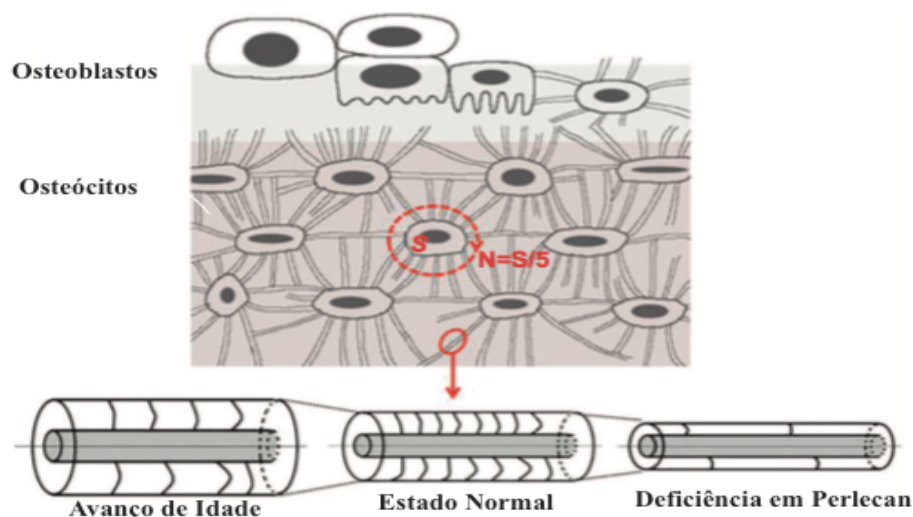


Figura 8: Diferenças nos osteócitos, dependentes da idade e da deficiência em *perlecan*, adaptado de (Lai et al., 2015)

É, também, importante salientar o tipo de ligação/comunicação existente entre os osteócitos e os restantes tipos celulares ósseos, tanto por uma via directa (através de junções Gap) como por uma via indirecta (através de sinalização parácrina-produção de RANKL, esclerostina, etc). Ao nível dos osteoblastos, os osteócitos interagem com estes através destas duas vias, produzindo vários tipos de moléculas, como referido, o IFG-1 (um regulador anabólico do crescimento ósseo), a esclerostina (inibe a via de sinalização Wnt), a PGE2 (a prostaglandina com um efeito anabólico mais elucidado, que aumenta a expressão de cicloxigenase 2 (COX2), permitindo a conversão de ácidos gordos em prostanóides), o NO (uma molécula anabólica induzida por um estímulo mecânico), entre outras; apresentando um papel regulador na actividade dos osteoblastos e determinante do tamanho e forma do osso. Deste modo, o aparecimento de um estímulo mecânico aumenta a produção de alguns factores anabólicos, enquanto que a sua ausência vai diminuir a produção dos mesmos, apesar de aumentar a produção de esclerostina e DKK-1 (Schaffler et al., 2015).

A presença de osteócitos que sofreram apoptose em zonas de reabsorção óssea provocada pelos osteoclastos, permitiu aceitar o facto de estes mediarem a reabsorção osteoclástica em zonas alvo. Contudo a sua morte celular, por si só, não conduz à produção de RANKL, mas sim, o seu contacto com osteócitos vizinhos saudáveis vai induzir a produção de citocinas inflamatórias. Esta comunicação entre a vizinhança

saudável permite, assim, ao recrutamento dos osteoclastos. Concluindo, assim, que a regulação da osteoclastogenese pelos osteócitos é feita maioritariamente pela via de sinalização parácrina (Schaffler et al., 2015).

Por último, e não menos importante, devemos destacar o papel deste tipo celular na homeostasia mineral, devido ao seu mecanismo rigoroso de regulação na alteração dos níveis de iões minerais entre a matriz e o fluido intersticial, ou seja, à mudança dos níveis minerais ao longo do LCS. Embora este conceito tenha caído em desuso com o aparecimento da relação entre os osteoclastos e a reabsorção óssea, actualmente, voltou a intensificar-se o conceito de que os osteócitos regulam o metabolismo mineral, como por exemplo na lactação onde há um necessidade excessiva de cálcio. Estas células produzem maioritariamente proteínas de matriz não colagénicas capazes de interagir com os iões minerais, modificando a formação de cristais minerais ósseos, por exemplo, a OPN, DMP-1 que demonstraram serem inibidoras da mineralização óssea (Schaffler et al., 2015).

3. Controlo molecular da osteogénese

3.1. Vias de sinalização da diferenciação dos osteoblastos

Como foi referido anteriormente, a formação e a diferenciação dos osteoblastos são reguladas por diversas vias de sinalização (Arvidson et al., 2011; Das, Samant, & Shevde, 2012; Kular et al., 2012; Maeda, Takahashi, & Kobayashi, 2013; Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

3.1.1. Via de sinalização Wnt

Na diferenciação dos osteoblastos, existem vários factores genéticos envolvidos. Um deles é a família *wingless-int* (Wnt), uma família de 19 proteínas, que é codificada por genes de polaridade de segmento, ou seja, genes que codificam para proteínas que afectam a orientação de características celulares (Darnell, 2013; Soltanoff, 2012). As proteínas *wingless* são proteínas morfogénicas presentes em várias espécies animais (Darnell, 2004; Soltanoff et al., 2012), tendo entre 350 e 400 resíduos de aminoácidos. Estas estão envolvidas na definição do esqueleto a nível embrionário, no desenvolvimento fetal e na remodelação óssea, na fase adulta do ser humano (Soltanoff et al., 2012).

A via de sinalização Wnt pode actuar através de duas vias, utilizando o mesmo receptor que está complexado/acoplado a outros ligandos diferentes: via de sinalização Wnt canónica, dependendo de β -catenina; e a via de sinalização Wnt não canónica, independente de β -catenina, como observado na figura 9 (Arvidson et al., 2011).

Na via canónica, a proteína Wnt liga-se a um receptor transmembranar *frizzled* (FZL), com sete hélices α na sua constituição, que está complexado com o LPR5/6. Por sua vez, na via não canónica, o receptor *frizzled* está complexado com um receptor de tirosina quinase órfão (Ror) (fig.9) (Arvidson et al., 2011; Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

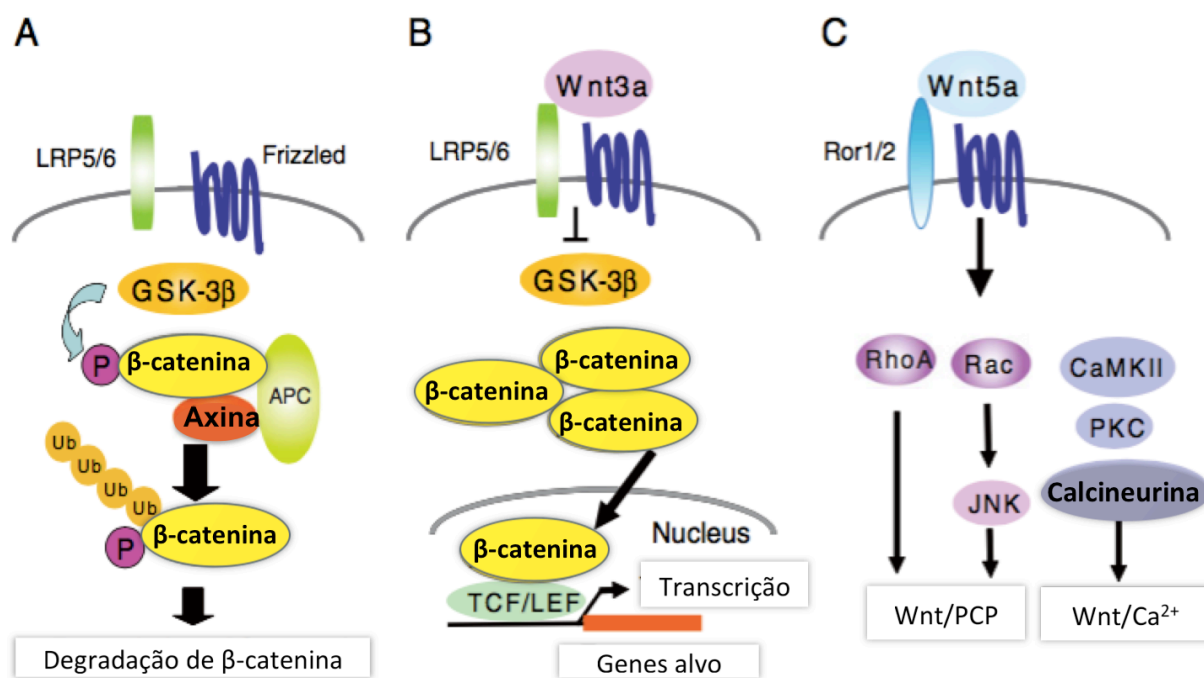


Figura 9: vias de sinalização Wnt- Via canónica (A+B) e Via não canónica (C), adaptada de (Maeda et al, 2013).

Devido ao facto de que a via de sinalização WNT/ β -catenina ser uma das principais vias que regula o desenvolvimento ósseo, esta foi e, ainda, é sujeita a vários estudos, tanto em modelos animais como em humanos. As primeiras evidências de que a proteína Wnt está envolvida em alterações de massa óssea humana foram detectadas em estudos humanos com mutações no seu co-receptor LRP5/6. Segundo Maeda, et al. (2013), evidenciaram-se oito mutações *missense* em pessoas com massa óssea elevada, enquanto que exemplos de *frameshift* e de mutações *nonsense* foram identificadas em pessoas que manifestavam osteoporose pseudoglioma, onde existe diminuição da densidade óssea e da massa óssea (Maeda et al., 2013; Soltanoff et al., 2012).

Um outro estudo recente referido por Maeda, et al. (2013), demonstrou que esta via de sinalização dependente de β -catenina possibilitava a activação de outros factores transcripcionais importantes para a continuidade da osteoblastogénese pela antagonização da $C/EBP\alpha$ e do $PPAR\gamma$, em que na sua ausência houve um desenvolvimento espontâneo de osteoblastos (Arvidson et al., 2011; Maeda et al., 2013; Soltanoff et al., 2012).

A capacidade de estimulação do desenvolvimento dos osteoblastos por esta via é um dos mecanismos de sinalização pelo que se dá o aumento da formação óssea.

Evidenciou-se, em estudos *in vitro* e *in vivo*, o papel da Wnt, justificando o conceito de sinalização canónica de Wnt/ β -catenina, que recentemente, revelou um novo papel na homeostase óssea pós-natal. Estes dados foram observados em estudos com osteoblastos maduros de ratinhos com a função de β -catenina anulada, usando *Col1a1* e linhas celulares Cre com OCN. Neste último estudo referido, os ratinhos deficientes em β -catenina desenvolveram osteopénia, enquanto que a sua activação resultava num fenótipo osteopetrótico; embora a actividade normal dos osteoblastos não fosse afectada. Esta alteração observada ao nível da reabsorção óssea foi provocada pela desregulação da OPG, um dos principais inibidores da diferenciação osteoclástica. Contudo, ficou demonstrado que a β -catenina regula, também, a formação de osteoclastos através do seu desempenho sobre os factores RANKL e OPG, que será descrito no capítulo dos osteoclastos (Maeda et al., 2013; Soltanoff et al., 2012).

Via de sinalização canónica Wnt dependente de β -catenina:

Esta via é particularmente importante na sinalização da formação de células ósseas, embora regule o crescimento, diferenciação, função e morte celular noutros tipos celulares, como no ouvido interno, representados na figura 6 (Darnell, 2004; Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

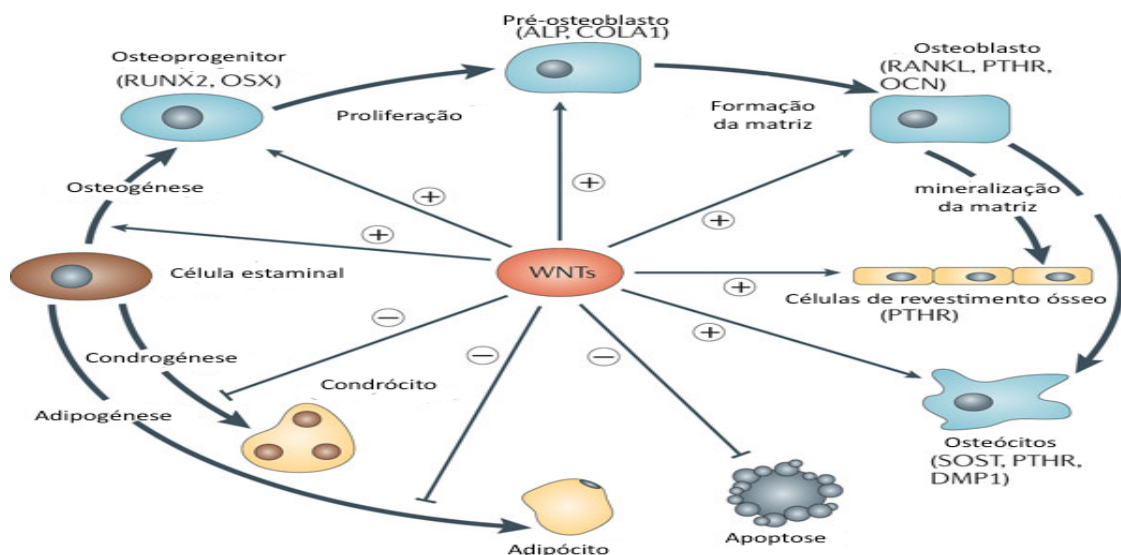


Figura 10: Sinalização Wnt em diversos tipos celulares, adaptada de (Kawai, Mödder, Khosla, & Rosen, 2011).

Para que a β -catenina não sofra ubiquitinação proteossomal e desempenhe o seu papel na regulação da osteoblastogénese, é fundamental a existência de Wnt, pois sem o Wnt, esta seria fosforilada pela quinase de glicogénio sintetase 3 β (GSK-3 β), impedindo a transdução de sinal (Arvidson et al., 2011; Darnell, 2004; Thompson et al., 2012).

Da família de proteínas Wnt, a Wnt3a e a Wnt1 destacam-se como pertencentes à via de sinalização canónica, activando esta via β -catenina dependente pela formação do complexo Wnt-FZL-LPR5/6. Quando ocorre esta ligação entre Wnt, presente na superfície celular da célula de sinalização, com os referidos receptores, na célula receptora do sinal, há activação deste complexo, seguido de uma transmissão de sinal através de proteínas Dvl, axina e Frat-1 que, por sua vez, perturbam a ligação do GSK-3 β , inibindo a sua actividade. Nesta etapa, há uma melhoria acentuada da estabilidade da transdução de sinal da β -catenina, através da inibição deste factor dependente de Wnt (Arvidson et al., 2011; Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Assim, a acumulação de β -catenina no citoplasma da célula-alvo dá origem à sua translocação para o núcleo onde irá interagir e formar heterodímeros com o complexo constituído pelo factor celular associado às células T e pelo factor potenciador linfocítico (TCF/ LEF) quando ligadas ao DNA, afastando os seus co-repressores e, conseqüentemente, iniciando a transcrição, aumentando a expressão e actividade do Runx2, um promotor osteogénico (Arvidson et al., 2011; Maeda et al., 2013; Marie, 2008; Rucci, 2008).

Caso haja uma ausência definida da expressão do Wnt, a degradação da β -catenina é mediada pela formação de um complexo constituído pelo GSK-3 β , pela axina e pelo factor denominado polipose adnomatosa coli (APC), sendo que estes dois últimos funcionam como proteínas *scaffolds*. E, assim os genes alvo desta via de sinalização permanecem reprimidos pela acção dos respectivos co-receptores (Soltanoff et al., 2012). As proteínas *scaffolds* têm três funções principais no que diz respeito à creditação do sucesso do tratamento dos defeitos ósseos, pois estas devem fornecer um espaço definido para a reparação do tecido, fornecer um suporte mecânico temporário dentro do defeito do tecido e devem aumentar a capacidade regenerativa, mantendo a capacidade regenerativa celular (Arvidson et al., 2011; Maeda et al., 2013).

Segundo *Soltanoff et al.*, os baixos níveis de β -catenina no citoplasma, embora esta esteja associada a caderinas, presentes na membrana, que as separa da

degradação, num estado reprimido, irão induzir a diferenciação em condrócitos e a uma diferenciação anormal dos osteoblastos. Assim, a β -catenina é referida por alguns autores como tendo um potencial duplo para a produção de condrócitos e de osteoblastos, pois a sua ausência permite que os osteo/condroprogenitores, as MSCs, se diferenciem no sentido da condrogénese, e que pelo contrário, na sua presença, estas MSCs sejam encaminhados no sentido da osteoblastogénese (Arvidson et al., 2011; Maeda et al., 2013; Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Como foi referido, esta via é regulada de forma delimitada por factores genéticos, tanto de uma forma positiva, facilitando a transdução de sinal; como de uma forma negativa, inibindo para além do receptor FLD e Wnt, também, o LRP5/6, por exemplo, levando à inibição da transdução de sinal (Rucci, 2008).

Existe, assim, um conjunto de factores antagonistas que podem interagir com os ligandos extracelulares da Wnt, como a família de proteínas relacionadas com o sFRP e o inibidor Wif-1. O sFRP interage por melhor afinidade com o receptor FZD, antagonizando a sua ligação com Wnt, que por sua vez, também, pode ser inibido pelo Wif-1 (Maeda et al., 2013; Rucci, 2008).

Segundo alguns estudos referidos, a interrupção desta via de sinalização pelo sFRP induz precocemente o Col1A1 e a activação do factor de transcrição Runx2, levando a uma diferenciação acentuada de condrócitos e a um aumento da massa óssea. Embora a sua ausência demonstre uma diminuição da apoptose osteoblástica, um aumento da diferenciação e proliferação dos osteoblastos e um aumento significativo da massa óssea trabecular (Maeda et al., 2013).

Numa segunda categoria de inibidores, podemos identificar inibidores do co-receptor do LRP5/6, as proteínas DKK e a esclerostina, pois a interacção, por exemplo, do DKK1 ou DKK2/LRP5 ou LRP6 com o *kremen*, uma proteína única transmembranar, vai internalizar o complexo de degradação, tornando a viabilidade dos receptores de Wnt diminuída (Kular et al., 2012; Maeda et al., 2013; Rucci, 2008).

Segundo Maeda et al. (2013) e dados referidos noutros estudos, a β -catenina é essencial para a diferenciação de osteoblastos maduros e para a formação óssea tanto endocondral como membranosa, por exemplo nos ossos longos dos membros e nos ossos do crânio, respectivamente (Maeda et al., 2013).

Via de sinalização Wnt não canónica, independente da β -catenina:

Na via de sinalização Wnt não canónica, há activação de vias independentes da existência de β -catenina, tais como a via Wnt/cálcio (Wnt/ Ca^{2+}) e a via Wnt/PCP. Estas vias são activas por diferentes proteínas Wnt. E, ainda assim, nestas estão implicadas proteínas *wingless* como a classe de ligandos Wnt5a (Wnt5a e Wnt11) (Maeda et al., 2013).

Enquanto que a via Wnt/ Ca^{2+} é mediada por enzimas como a proteína quinase II calmodulina dependente de cálcio (CAMKII) e a quinase C (PKC); a segunda via é mediada por proteínas G pequenas (RhoA e RAC) e pela quinase c-jun-N-terminal (JNK), como podemos observar na figura 11 (Maeda et al., 2013; Soltanoff et al., 2012).

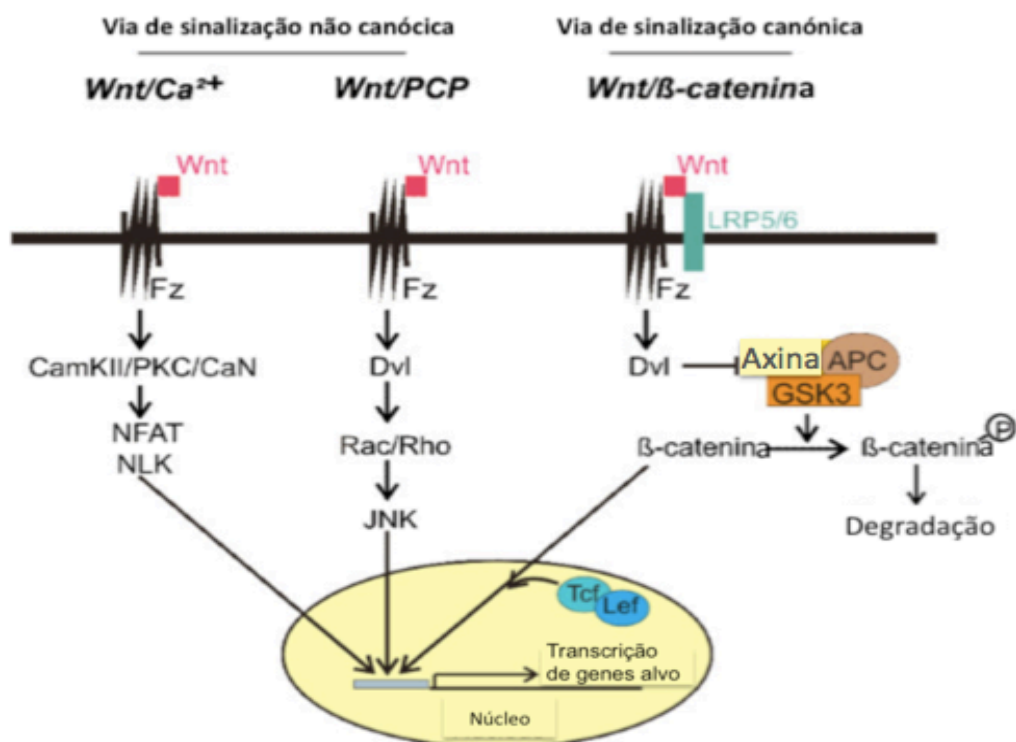


Figura 11: Via de sinalização da Wnt, destacando a via de sinalização não canónica, adaptada de (Piters, Boudin, & Van Hul, 2008).

Quando o ligando WNT5a se liga ao complexo FZL-Ror (Ror1 ou Ror2, os únicos existentes na espécie humana) pelo domínio rico em cisteína, há activação de via de sinalização WNT/PCP através da activação de RhoA- e RAC-, e, ainda, da sinalização dependente de JNK. Podendo também haver activação da via Wnt/ Ca^{2+}

através da sinalização por PKC, CAMKII e por sinais dependentes de calcineurina (Maeda et al., 2013; Soltanoff et al., 2012).

Estas vias foram identificadas como importantes no desenvolvimento osteoblastogénico pela repressão do factor PPR γ e pela indução de RUNX2 em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, inibindo a diferenciação adipogénica.

Para além da proteína Wnt5a, outras estão implicadas nesta via não canónica, como a Wnt4, Wnt16 e outras descritas baixo (Maeda et al., 2013).

Segundo Maeda et al. (2013), identificaram-se as WNT3a e WNT7b neste tipo de sinalização, onde eram intermediadas pela proteína quinase c δ (PKc δ), através da ligação a subunidades da proteína G, como por exemplo, a subunidade proteína G α q/11, que activa a PKc δ , ajudando na formação óssea. Caso isto não aconteça, os ratinhos com este tipo de deficiência exibem uma formação óssea deficiente e, aqueles que exibem uma deficiência em Wnt7B, demonstraram uma menor formação óssea a nível da embriogénese (Maeda et al., 2013).

Mais detalhadamente, na via dependente do cálcio, através do complexo *calcium-calmodulin-dependent protein kinase II-TGF- β activated kinase 1 (TAK1)-TAK1-binding protein 2-Nemo-like-kinase* (NLK), há repressão da transactivação do PPR γ e a indução do RUNX2 (Maeda et al., 2013).

Estudos genómicos permitiram identificar a associação entre as moléculas que participam na via de sinalização, como a esclerostina, β -catenina, o LPR5/4, o Wnt4 e a densidade mineral óssea; sendo descritas como reguladores potenciais da massa óssea as WNT5b, Wnt16, Sfrp4 e a DKK1 (Maeda et al., 2013).

3.1.2. Via de sinalização Hedgehog

A via de sinalização Hedgehog cumpre um papel fundamental no desenvolvimento embrionário, pois garante o posicionamento inicial da formação do esqueleto, e a manutenção dos progenitores celulares nos tecidos adultos, iniciando ou mantendo a diferenciação celular que regula a formação óssea e cartilagínea (Arvidson et al., 2011). A via de sinalização Hedgehog é constituída por um determinado número de proteínas pertencentes à mesma família que, como referido, controla a proliferação celular, a diferenciação e a morfologia em diversos tipos celulares. Tem como ligandos o *Desert Hedgehog* (Dhh), o *Indian Hedgehog* (Ihh) e

o *Sonic Hedgehog* (SHh), sendo o mais relevante na diferenciação osteoblástica, o IHH, o factor que apresenta uma papel fundamental na regulação temporal e espacial do desenvolvimento osteoblástico, apesar de continuar a desempenhar o seu papel contínuo a partir desta fase. Para além deste factor, é importante referir o factor SHh que também se destaca no desenvolvimento concentração-dependente do esqueleto humano, que começa ao nível da embriogénese (Das et al., 2012; Soltanoff et al., 2012).

O IHH é produzido por condrócitos hipertróficos, o que justifica que exista uma relação coincidente entre o aparecimento primário dos progenitores de osteoblastos no *periosteum* adjacente concomitantemente com o aparecimento dos condrócitos hipertróficos, aparentando actuar directamente sobre os progenitores osteoblásticos, localizados a nível pericondrial, e definir os precursores de osteoblastos (Arvidson et al., 2011; Soltanoff et al., 2012).

Existem três factores transcripcionais com dedos de zinco pertencentes à família *Krupple* que são intermediários nesta via de sinalização: o GLI1, que é um forte activador transcripcional; o GLI2 com duas funções antagónicas, funcionando como activador ou repressor dependendo do estímulo recebido; e, por último, o GLI3, com função repressora, predominantemente. Dentre estes factores, o GLI2, segundo alguns estudos, está envolvido activamente na diferenciação osteoblástica, favorecendo a expressão da BMP-2 neste tipo de células e potenciando sinergicamente o seu efeito; o que foi refutado por outros investigadores que referiam que esta via de sinalização diminuía a expressão do RUNX2, propondo um possível papel da via IHH noutras partes da formação óssea (Das et al., 2012).

Contudo foi definido que a via de sinalização Hedgehog regula a osteopontina (OPN), uma glicoproteína determinante na formação, migração e função osteoclástica (Das et al., 2012).

A ligação do ligando IHH ao seu receptor transmembranar *Patched 1* ou *Patched 2* (PTCH1/2) activa a proteína *Smoothed 7* (Smo7). A acivação da cascata de transdução de sinal por esta via permite a activação de GLI1(classificado por alguns autores como GLIA) que será translocado para o núcleo e irá regular a proliferação celular e activar os genes alvo da diferenciação osteoblástica (Arvidson et al., 2011). Quando há inibição da Smo, as células deixam de sofrer diferenciação, pois há inactivação da via de sinalização. Em estudos relacionados, determinou-se que quando isto acontece, a anulação da actividade da proteína Smo em precursores

osteoblásticos Osx positivos, ao nível embrionário, são gerados osteoblastos normais e o esqueleto endocondral, ao nível do nascimento é indistinguível de outros fenótipos selvagens; o que ainda está por esclarecer ao nível do estado adulto, em que ainda decorrem investigações (Arvidson et al., 2011; Das et al., 2012; Soltanoff et al., 2012).

Há uma evidência irrefutável da existência de uma interação complexa e uma cooperação entre as vias de sinalização Wnt e Ihh no controlo de vários aspectos no desenvolvimento ósseo (Kular et al., 2012), pois estudos demonstraram que a localização nuclear da β -catenina e a expressão dos genes da via Wnt estão reprimidas nos embriões que não apresentam expresso Ihh ao nível do seu pericondrio. Contudo, estas vias de sinalização como têm em comum alguns reguladores comuns, como o GSK-3 β e um outro supressor (SU(FU)), podem intercalar-se. Também foram demonstradas outras evidências entre estas duas vias de sinalização, por exemplo, em que tanto a Smo como o receptor FZL do Wnt têm uma sequência de aminoácidos muito semelhante.

Como referido anteriormente, outras proteínas podem regular a via Hh, como as BMP (Das et al., 2012).

Contudo, apesar das evidências de que a sinalização por Ihh funcionar a jusante da sinalização Wnt, e que a sua actividade parece estar relacionada com a fase inicial da osteoblastogénese, são necessários mais estudos para elucidar o mecanismo pelo qual esta via de sinalização opera e se tem a mesma função tanto na fase embrionária como na fase adulta (Das et al., 2012).

3.1.3. Via de sinalização pela super-família TGF- β

Esta super-família TGF- β é composta por um grande número de factores de crescimento e de diferenciação, como as proteínas BMPs e TGF- β , cuja transdução de sinal é feita por dois tipos de receptores quinásicos ricos em serina/tirosina: um primeiro tipo de receptores, os BMPR-IA ou ALK-3 ou ALK-6 e o receptor de activina IA (ActR-IA ou ALK-2); e um segundo tipo de receptores, os BMPR-II, ActR-IIA e ActR-IIB. Estes últimos, apesar da ausência dos receptores tipo I, ligam-se aos seus ligandos, mas necessitam destes para permitirem a sinalização da via, enquanto que os receptores tipo I precisam dos receptores tipo II respectivos para

estabelecerem a sua ligação com os respectivos ligandos. Os receptores específicos para as BMP são o BMPR-IA, BMPR-IB e o BMPR-II, enquanto que os outros podem funcionar como receptores de activinas (Arvidson et al., 2011; H.-M. Ryoo et al., 2006; Soltanoff et al., 2012).

O TGF- β é uma citocina expressa abundantemente na matriz óssea. É sintetizada como um precursor molecular constituído por duas partes que podem ser clivadas, uma das partes é o TGF- β activo e a outra é uma proteína associada à latência (LAP). Esta proteína mantém-se, normalmente, ligada de uma forma não covalente com a parte activa do TGF- β , ocultando os seus domínios de ligação ao seu receptor, sendo secretada e depositada na matriz óssea numa forma inactiva (Tang et al., 2009). Não obstante, quando é activada, ou seja, quando está ligado ao seu receptor, induz a sinalização na osteoblastogénese; regula a proliferação e diferenciação de osteoprogenitores; mas a sua função específica ainda é desconhecida (Soltanoff et al., 2012; Tang et al., 2009).

Tang et al. (2009) demonstraram que na população em estudo, com a doença Camurati-Engleman, foram identificadas mutações no gene TGF- β 1, revelando que a maioria das mutações se encontrara na região codificada de LAP, contudo não se identificaram mutações na parte activa do TGF- β 1 (Tang et al., 2009).

Também, as BMPs, conhecidas pelo seu grande impacto na diferenciação de progenitores ósseos, permitindo a sua diferenciação em osteoblastos ou em condrócitos, e pela sua capacidade de induzir a formação óssea endocondral, estão implicadas na especificação de uma linhagem celular, e, assim como, na modificação decorrente da determinação osteogénica, proporcionando o aumento da formação óssea que é característico da presença de algumas BMPs, como BMP2, BMP7 e BMP6; embora, segundo Arvidson et al. (2011), a osteogénese comece normalmente em ratinhos deficientes em BMPs (Soltanoff et al., 2012; Tang et al., 2009).

Estas BMPs podem ser classificadas quando à regulação que exercem na formação óssea, podendo, assim, dizer-se que algumas actuam como reguladores positivos, ou seja promovem a formação óssea, como é o caso das BMP2, BMP7, BMP6 e BMP9; e outras que actuam como reguladores negativos, promovendo o efeito contrário, como as BMP3 e BMP1 (H.-M. Ryoo et al., 2006). Estas proteínas podem emitir sinais através da via dependente de Smads, ou através de vias de sinalização independente de Smads, como o JNK, a proteína mitogénica p38 quinase activada (uma das isoformas da família de proteínas MAPK) (Soltanoff et al., 2012).

As Smads, uns modeladores transcripcionais, responsáveis pela transdução de sinal nesta via de sinalização, podem ser classificadas em 3 categorias distintas (Arvidson et al., 2011; H.-M. Ryoo et al., 2006; Soltanoff et al., 2012; Tang et al., 2009):

- Smad regulada por receptores (R-Smads), podendo ser activas pelas BMPs (BR-Smad 5, BR-Smad 1 e BR-Smad8) ou pelo TGF- β (TR-Smad 2 e TR-Smad 3)
- Co-Smads com co-parceiros mediadores como o TGF- β e as BMPs (Smad4)
- Smads Inibitórias (ISmad 6 e ISmad7) .

Segundo o autor, foram feitas descobertas em estudos anteriores, em que a ligação de BMPs a receptores tipo II vai induzir a fosforilação de R-Smad, que, de seguida, se complexa com a Co-Smad respectiva. Este complexo, depois de translocado para o núcleo, regula a transcrição dos genes alvo pela sua conexão a co-repressores e co-activadores transcripcionais (Soltanoff et al., 2012; Tang et al., 2009).

Há activação das BMPs sob a interação física entre o RUNX2 e as BR-Smads induzindo a diferenciação de osteoblastos a partir de hMSC, porque, apesar das BMPs não induzirem directamente o Runx2, estas estimulam um outro factor, o Dlx5, presente em osteoblastos, que por sua vez vai induzir a expressão de RUNX2 nos osteoprogenitores. Assim, alguns estudos demonstram que o DLX5 é um alvo da sinalização de BMP-2, como podemos ver na figura 12 (H.-M. Ryoo et al., 2006; Tang et al., 2009). Em células C2C12, células usadas frequentemente na pesquisa de genes alvo da sinalização por BMP, foram identificados outros factores transcripcionais Hey-1, TIF-2 (Tcf4) e ICSBP, pelo uso constante de receptores tipo I (Soltanoff et al., 2012; Tang et al., 2009).

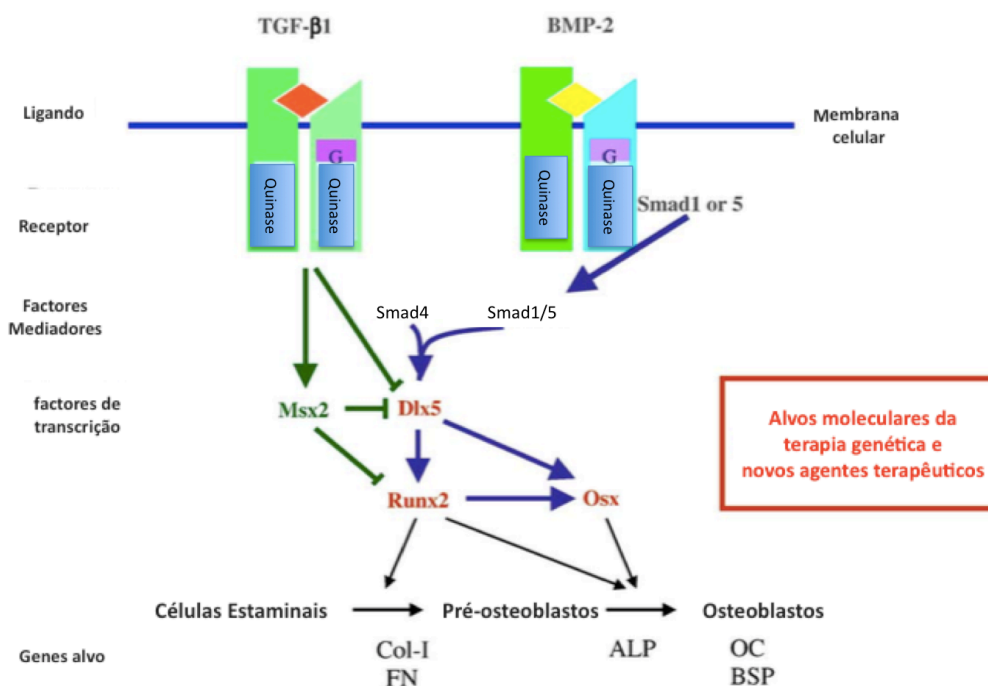


Figura 12: Descrição do modo de actuação de factores transcripcionais na via de sinalização por TNF- beta, adaptado de (Ryoo et al. 2006).

Na via de sinalização do TGF- β há uma evidência acentuada de que esta pode ser feita, também, de uma forma independente de Smads, como referido. Assim sendo, as BMP podem activar a ERK, JNK e a proteína p38 em células osteoblásticas, evidenciando diferentes papéis das MAPK na regulação da fosfatase alcalina e da osteocalcina (Arvidson et al., 2011). O que mostra que tanto as vias Smad e as vias MAPK confluem-se para a regulação do gene Runx2, pois este gene, por si só, desempenha uma função primordial na indução da BMP-2, desviando a diferenciação celular no sentido da blastogénese e não da miogénese, segundo estudos realizados com células C2C12 (Soltanoff et al., 2012).

Contudo, foram identificados vários papéis da BMP-2, entre os quais o papel desta na indução de osterix (Osx) pela via da p38 e não pela ERK, tanto em células osteoblásticas como em condrócitos (Soltanoff et al., 2012).

Em estudos recentes, a ubiquitinação também se revelou implicada na regulação de vias de sinalização como esta do TGF- β e das BMPs, pois houve referências de que a ausência de *Smad ubiquitin ligase* (Smurf-1), dá origem a uma acumulação da quinase MEK2 (MEKK2), resultando a uma activação de JNK, um

acontecimento suficiente para a sinalização BMP nos osteoblastos (Soltanoff et al., 2012).

Em estudos referentes a fracturas ósseas, foi demonstrado que a BMP é um factor importante na sinalização que gera a reparação de fracturas ósseas (Arvidson et al., 2011; Soltanoff et al., 2012).

Num outro estudo, já referido no início do texto sobre esta via de sinalização, em que o próprio dá ênfase ao papel do TGF- β 1 na indução da migração de MSCs ósseas (BMSCs) para zonas de reabsorção e formação óssea, ficou definido que TGF- β 1 activo é libertado pela matriz óssea em resposta à reabsorção óssea osteoclástica e, que de seguida, induz a migração de BMSCs osteogénicas humana com a finalidade de coordenar as taxas locais de reabsorção óssea com formação óssea. O mesmo acontece em ratinhos. Resultados indicaram que o TGF- β 1 libertado ao longo da reabsorção óssea induz a migração de BMSCs. A sua ausência demonstrou uma deleção dos pré-osteoblastos e de osso trabecular e a presença de osteoprogenitores no meio da medula óssea (Tang et al., 2009).

Foi feito o mesmo procedimento em humanos, mas em que as BMSCs foram detetadas pelo HLA-A, o antígeno leucocitário humano, e pelo Runx2 para controlar a migração e diferenciação osteoblástica. Analisando os resultados, há uma indicação clara de que o TGF- β 1 é essencial para a migração das BMSCs para a superfície óssea (Soltanoff et al., 2012; Tang et al., 2009).

Na sinalização mediada por Smads, que intercede a migração de BMSCs induzida pelo TGF- β 1, e a interrupção da sinalização do TGF- β 1 e do seu gradiente de concentração reduz o recrutamento das BMSCs para a superfície de remodelação óssea, evidenciando-se a Smad 3 como a principal responsável pela indução da migração das destas células mesenquimais pelo TGF- β 1 e que a sua função pode ser compensada pela Smad 2 (H.-M. Ryo et al., 2006).

Estabeleceu-se, ainda, que a fosforilação do receptor regulador de Smads, o R-smad, pelo TGF- β 1 é a via de sinalização primária do mesmo. Descobriram, também, que o inibidor específico quinásico do TGF- β 1 (TBRI) bloqueou a migração das células estaminais mesenquimais ósseas pela indução de *bone resorption-conditioned medium* (BRCM) numa concentração dependente e que a expressão mediada por um retrovírus da Smad 7 inibiu a migração de BMSCs, o que nos permite concluir que o TGF- β 1 actua através do seu inibidor TBRI que induz a migração celular das BMSCs, uma vez que a Smad 7 é conhecida pela sua ligação

específica ao TBRI e inibe a fosforilação de Smad 2 e 3 (Soltanoff et al., 2012; Tang et al., 2009).

3.1.4. Via de sinalização FGF

Durante a ossificação endocondral e intramembranosa há uma regulação muito importante por esta família polipeptídica de factores de crescimento fibroblásticos (FGFs), que se ligam e actuam através de sete isoformas dos quatro receptores tirosina quinase (FGFr) relacionados com o FGF (Arvidson et al., 2011). Alguns destes quatro receptores estão envolvidos em diferentes fases do ciclo de diferenciação celular, como por exemplo o FGFr1 que está relacionado com a sinalização durante a maturação dos osteoblastos, pois este pode actuar tanto a nível da estimulação da diferenciação celular nos osteoprogenitores como para impedir a maturação dos osteoblastos já diferenciados (Arvidson et al., 2011; Soltanoff et al., 2012).

Os FGFs são expressos em diferentes células ósseas, como é o caso do FGF2, FGF9 e FGF18, que apesar de se ligarem presumivelmente com o FGFR1, o FGF2 é expresso em células do perióstio e em osteoblastos, enquanto que o FGF9 e FGF18 são expressos no perióstio/pericondrío. Isto reflete que é provável que o FGF2 tenha uma actividade mais proeminente durante um estadio pós-natal, justificado pela diminuição da sua capacidade de mineralização tanto *in vitro* como *in vivo* enquanto que os outros dois FGFs referidos parecem ter um papel mais relevante na esqueletogénese embrionária (Arvidson et al., 2011), sendo provado por estudos em ratinhos que mostraram um atraso na ossificação no meio da gestação demonstrado pela falta dos FGFs 9 e 18 (Arvidson et al., 2011; Soltanoff et al., 2012).

Também os FGFRs são expressos em diferentes fases do metabolismo ósseo, nomeadamente na diferenciação óssea. Os FGFRs 1, 2 e 3 embora sejam expressos tanto durante como no fim da fase de desenvolvimento do esqueleto; os FGFr1 e 2 também são expressos numa matriz que dará origem ao tecido cartilaginoso. Em relação a estes dois últimos receptores referidos, está demonstrado que o FGFr1 é expresso em condrócitos hipertróficos e que o FGFr2 continua expresso em condrócitos que se encontram num estado de reserva e parece estar regulado a baixo dos níveis normais na proliferação dos condrócitos. Contudo, a expressão do FGFr2

está relacionada com o aumento da expressão de Runx2 e a diminuição de PPAR γ 2 (Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

O FGFr3 ligado ao FGF18 parece ter dois papéis em diferentes tipos celulares: na regulação do crescimento e da diferenciação de condrócitos em proliferação; embora na diferenciação osteoblástica regule a densidade óssea e a espessura cortical (Arvidson et al., 2011).

As mutações nos receptores dos FGFs, evidenciadas em estudos em que são estudadas a anulação da função ou ausência dos mesmos, levam à anulação precoce da estrutura óssea, resultando por exemplo em craniossinostoses e condro-displasias humanas, que muitas vezes advêm de mutações de ganho de função dos receptores 1 e 3 dos FGFs. Nestes estudos, aboliu-se o receptor 1, FGFr1 $^{-/-}$, em embriões de ratinhos que morriam precocemente após a gastrulação. Em alelos hipomórficos deste mesmo receptor ou a sua inactivação condicional evidenciou uma afecção do padrão digital dos membros ainda no estadio embrionário e da formação de alguns elementos do esqueleto. Considerando-se, assim, que o FGFr1 actua na estimulação da diferenciação em osteoprogenitores e que, também, tem função de suprimir a continuação da diferenciação e maturação de osteoblastos já diferenciados. Também, noutras investigações centradas no papel de outros receptores de FGFs, identificaram-se mutações nos FGFr2 e no Fgfr3, em que a sua ausência provocava a morte do ratinho num estado embrionário ou provocava osteopénia, respectivamente. Assim, sugeriu-se que o FGFr2 está associado ao crescimento ósseo e a uma função anabólica dos osteoblastos (Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Em outras investigações delineou-se o papel de alguns FGFs, nomeadamente o FGF2, FGF9 e o FGF18, que podem actuar sozinhos na regulação da actividade e fisiologia dos osteoblastos; evidenciou-se que FGF9 e o FGF18 estabelecem sinais durante o desenvolvimento embrionário e que o FGF2 será mais relevante durante o desenvolvimento pós-natal. Este, anteriormente descrito, apresentou a capacidade de fosforilar e activar o Runx2 por meio do intermediário MAPK, sugerindo uma importante função de regulação do Runx2 em termos da sua função e na formação óssea. No entanto, o FGF18 independentemente do FGFr3, mostrou controlar maioritariamente a osteogénese e/ ou a função osteoblástica. Alguns estudos demonstraram, também, que o FGFr18 actua como promotor na ligação de Runx2 com o TCF4/Lef1, aumentando a diferenciação osteoblástica (Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Houve um destacamento de que a *engnailed 1* (En1) estava implicada na regulação dos receptores de FGFs, baseando-se na sua capacidade de activar e regular efectores alternativos na sinalização de FGFs, como a ERK, MAPK ou o PKC. Em ratinhos com mutações em En1 apresentavam uma perda de *FGF Target gene Sprouty homolog 2* (Spry2) em osteoblastos ecto-periosteais e uma inactivação de ERK (Soltanoff et al., 2012).

3.1.5. Via de sinalização IGF

Nesta via de sinalização, estão implícitos dois factores de crescimento pertencentes à família do IGF, o IGF-I e IGF-II, expressos por osteoblastos e com atividades semelhantes na regulação dos osteoblastos, estimulando a sua função e promovendo a deposição de matriz óssea; cujos receptores são IGF1R e IGF2R. Para além destes, estão implicadas um conjunto de proteínas de alta afinidade de ligação, como as moléculas adaptadoras (proteínas do receptoras do substrato insulina 1 e 2-IRS1/2) (Arvidson et al., 2011).

Estes factores estão implicados na estimulação de formação de CollA1 e de outras proteínas não colagénicas.

Segundo o *Arvidson et al.* (2011), além do IGF-I ser mais potente que o IGF-II e não afectar directamente a diferenciação de hMSC em osteoblastos e o crescimento celular, este utiliza o P13K e o MAPK que induzem a activação de Akt e ERK1/2, respectivamente.

3.1.6. Via de sinalização PDGF

Este factor extracelular, importante no controlo funções de células ósseas, como na migração de osteoprogenitores, na proliferação e diferenciação celular e osteoclastogénese; possui três isoformas que se ligam a dois tipos de receptores, o receptor α e o receptor β (PDGR α e PDGR β), dimerizando-os, que por sua vez originam outros 3 receptores padronizados, $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ e $\alpha\beta$ (Arvidson et al., 2011).

Dentro das e isoformas activas de PDGF, a PGDF-BB inibe a diferenciação osteogénica acompanhada pela diminuição da ALP. Assim, havendo uma deleção do receptor β , vai haver uma resposta contrária à anterior, aumentando a diferenciação

osteogénica, aumentando o efeito da ALP e os níveis de RNAm, OC, BMP-2, Runx2 e Osx (Arvidson et al., 2011).

3.1.7. Via de sinalização da Eferina (Eph)

A família de receptores tirosina quinase e os seu ligandos de eferina (Eph) são importantes na regulação de interações celulares directas. Esta via de sinalização tem uma característica particular que se baseia no facto da sua sinalização ser bidirecional, ou seja, a célula que tem na sua superfície um receptor para a Eph ao ligar-se à célula que expressa o ligando eferina, vai permitir a transdução de sinal em ambas as células, tanto de uma forma directa como de uma forma reversa (Arvidson et al., 2011).

Estes ligandos Eph podem ser agrupados em duas classes diferentes: a classe A (A1 a A5) que se liga a receptores EphA1 a EphA10 que estão ancorados com uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e a classe B (B1-B5) que se liga a receptores tirosina quinase EphB (B1 a B6) (Arvidson et al., 2011; Soltanoff et al., 2012).

Esta via permite estabelecer a ligação entre os osteoblastos e os osteoclastos. Por sinalização reversa, há uma ligação demonstrada entre a eferina B2 dos osteoclastos com o receptor EphB4, que leva à inibição da diferenciação dos osteoclastos; que por outro lado vai induzir outros factores regulatórios nos osteoblastos, como por exemplo o Runx2, o Dlx5 e o Osx. Estes resultados referidos em estudos de mutações de perda ou ganho de função, permitiu a conclusão de que EphB4 está no topo da regulação durante a diferenciação osteoblástica (Soltanoff et al., 2012).

Durante a activação de osteoblastos, foi sugerida a possibilidade de ser necessário um factor da família genética homologa Ras (RhoA) na sinalização directa entre a eferina B2 e o EphB4 nos respectivos osteoblastos. O envolvimento deste factor nesta sinalização terá de ser confirmado em novos estudos, pois há resultados contraditórios em relação ao bloqueio/activação da eferina numa exposição activa a este receptor (Soltanoff et al., 2012).

3.1.8. Via de sinalização PTH

A hormona da paratiróide (PTH) é o único fármaco anabólico autorizado pela FDA no tratamento da osteoporose, tanto pelo seu efeito anabólico como catabólico dependendo da via de administração, que será abordada num próximo capítulo sobre as doenças associadas ao metabolismo ósseo (Soltanoff et al., 2012).

Esta hormona aumenta a proliferação celular, a qual tem sido alvo de vários estudos ao longo dos últimos anos, pois a sua associação com o ácido azelendrónico demonstrou uma redução significativa da proliferação óssea, sem qualquer efeito sobre o volume ósseo. Justificando, assim, novas investigações sobre a combinação destas duas moléculas (Soltanoff et al., 2012).

Algumas proteínas G quando ligadas ao receptor da PTH, formando o complexo PTH/PTHR-G activam o cAMP, induzindo a libertação das unidades catalíticas da enzima PKA. De seguida, esta fosforila algumas proteínas que causam alterações na estrutura e função do Runx2. Contudo, outras proteínas G α também interagem com a fosfolipase C para activar a PKC (Soltanoff et al., 2012).

Em estudos recentes foi determinada a interação entre a PTH e a via de sinalização WNT, através de Wnt4, por via não canónica. Nesta interação, a Wnt4 responde aos estímulos da PTH através de diferentes vias, mostrando a sua capacidade anabólica (Soltanoff et al., 2012).

Foi confirmada a importância da activação de fosfolipase C na diferenciação dos condrócitos e na atraso na proliferação celular pela sua inactivação devida a mutações no complexo formado PTH/PTHR (Soltanoff et al., 2012).

3.1.9. Via de sinalização simpática

Recentemente, tem-se abordado o Sistema Nervoso Simpático quanto ao seu papel no metabolismo ósseo. Os osteoblastos foram referidos com o potencial de expressar receptores para vários neuropéptidos, sobressaindo esta actividade simpática. Por exemplo, o bloqueio de receptores de glutamato, reduz o nível de actividade de ligação do DNA e a expressão de Runx2. Contudo, há estudos recentes que estabelecem um novo regulador da remodelação óssea, o ciclo circadiano (Soltanoff et al., 2012).

Segundo Soltanoff et al. (2012), inicialmente, “os receptores β 2-adrenérgicos activam o factor de transcrição CREB, uma proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP, que por sua vez estimula os genes “*clock*”, mediada pela função anti-proliferativa pela inibição da expressão da ciclina G1 e dos genes da proteína activadora 1 (AP1), o que favorece a proliferação dos osteoblastos” (Soltanoff et al., 2012).

O circulo circadiano está correlacionado com a regulação dos níveis de leptinas, no hipotálamo. Através do hipotálamo, as leptinas regulam o metabolismo periférico de alguns órgãos, para além do desenvolvimento, da reprodução e da redução do apetite. Quando ligadas ao seu receptor este dimeriza-se e desencadeia a activação de diversos factores, MAPKs, Akt, PIP₃, etc., que regulam diferentes aspectos relacionados com diferentes tipos celulares. Dentre todos os factores de sinalização, estas activam o NF κ B/IKK, como referido no capítulo anterior (Soltanoff et al., 2012; Upadhyay et al., 2015).

Para além destas vias de sinalização, os osteócitos também estão implicados na remodelação óssea, como referi anteriormente na secção 2.3. Destaco também o papel da sinalização elaborada pelo *Notch*, responsável pela decisão do predestinação celular. Inibe a maturação dos osteoblastos induzida pelas BMPs, pela inactivação da função do Runx2 (Cho et al., 2013; Kular et al., 2012).

3.2. Vias de sinalização da diferenciação dos osteoclastos

Qualquer tipo celular pode ser regulado ao longo da sua diferenciação e proliferação, o que não se torna excepção para os osteoclastos. Estes produzem algumas citocinas importantes na regulação do seu crescimento e diferenciação, como o RANKL e o M-CSF. Para além destas, existem outros factores como o não-receptor de tirosina quinase Src, o NF- κ B, o ITAM, entre outros. Destacando o RANKL e a OPG como factores chave na regulação da formação dos osteoclastos (Kular et al., 2012; Palmqvist et al., 2002; Rucci, 2008; Soltanoff et al., 2012).

3.2.1. RANKL

A proteína RANKL transmembranar é, juntamente com a OPG, um factor chave na formação de osteoclastos. É designada por diversas formas e é uma das mais importantes na regulação da diferenciação osteoclástica. Para além do que foi referido na secção 2.1, é de salientar que a ausência deste anula a diferenciação dos osteoclastos, resultando num fenótipo de osteopetrose. A activação do TRAF6 vai desencadear a expressão de vários factores de sinalização, que promovem a sua proliferação e diferenciação celular (Horne, Sanjay, Bruzzaniti, & Baron, 2005; Palmqvist et al., 2002; Soltanoff et al., 2012).

A falta deste factor ou mesmo de M-CSF conduz a um fenótipo osteopetrótico, a uma diminuição osteoclastos, não havendo reabsorção óssea eficaz e promovendo o aumento da massa óssea (Palmqvist et al., 2002; Soltanoff et al., 2012).

O RANKL está, também, envolvido na calcificação ectópica de outros tecidos, como o músculo cardíaco, o pâncreas e o fígado, causada pela infecção viral pelo CVB3, por exemplo. Este tipo de infecção conduz a um aumento dos níveis do RANKL, acompanhado pelos níveis de OPG e de outras citocinas. Foi demonstrado no estudo elaborado por *K. Lee et al.* (2015) que o RANKL por meio de outros intermediários, como as BMP2, Runx2, Fra-1 e NF- κ B, promove o aumento de fosfato inorgânico (Pi), promovendo a calcificação a nível cardíaco, visto que o Pi está intimamente relacionado com a calcificação vascular. Contudo, o Pi, por si só, pode aumentar a calcificação nos tecidos moles. O aumento de RANKL, devido à infecção, promove o aumento da actividade dos osteoclastos, estimula a reabsorção óssea e promove a calcificação ectópica. Os níveis altos de OPG bloqueiam unicamente a osteoclastogénese. Foi descoberta uma proteína recombinante RANK-Fc (RANK fundido com a região FC da IgG humana) que inibe a formação osteoclástica dependente desta via de sinalização e previne a perda óssea e a calcificação induzida por este tipo de infecção. Assim, Lee et al. (2015) sugeriu que a neutralização da acção do RANKL através de RANK-Fc, Denosumab e OPG, poderá justificar o uso destes agentes terapêuticos na prevenção e diminuição da calcificação óssea (K. Lee et al., 2015).

A sua estimulação é feita pela presença de hormonas calciotrópicas, como a vitamina D3 e PTH, e citocinas, como a IL-6 (Palmqvist et al., 2002).

3.2.2. M-CSF

A citocina M-CSF é secretada por células pertencentes ao estroma da medula e por osteoblastos que potenciam a sobrevivência osteoclástica. É essencial no início da diferenciação dos pré-osteoclastos, sendo, assim, necessária para a proliferação, diferenciação destas células, acompanhando a regulação do citoesqueleto e a reabsorção óssea. M-CSF assegura a sobrevivência de células hematopoiéticas monocíticas e a sua proliferação e diferenciação (Palmqvist et al., 2002). A sua ausência resulta na deficiência de macrófagos e num fenótipo osteopetrótico, pela ausência de osteoclastos. M-CSF activa e induz uma panóplia de proteínas, quinases (presentes no citoplasma), citocinas, interleucinas e interferões. Após a sua ligação ao receptor (c-Fms) induz uma expressão genética necessária para uma resposta directa ao RANKL e às interleucinas. A sua acção sinérgica é explicada através de estudos que demonstraram que esta citocina, a M-CSF, estimula directamente o RANKL e outros componentes da via de sinalização RANKL/NF- κ B. Por último, a M-CSF previne a apoptose dos osteoclastos através de uma isoforma do BCL2-like 11 (proteína facilitadora de apoptose), a *Bcl-X(L)-induced inhibition of caspase-9 activator* (Baranski et al., 2015; Horne et al., 2005; Schwartz et al., 2015; Soltanoff et al., 2012; Yue, Ben Messaoud, & López, 2015).

3.2.3. NF- κ B

Após a activação do factor NF- κ B, através de um processo de fosforilação da sua proteína inibitória (IKK), este é translocado para o núcleo. O NF- κ B é importante na via de sinalização do RANK, regulando a função e o desenvolvimento dos osteoclastos. Após a sua activação é seguida a activação de um grande número de proteínas quinásicas MAP, entre as quais JNK/c-Jun, ERK1/2 e quinases p38. Como consequência de várias quinases MAP e seus inibidores há uma diminuição da sobrevivência osteoclástica e a inibição da formação de osteoclastos. Segundo (Carey et al., 2015; Soltanoff et al., 2012), p38 depois da expressão do RANK pode fosforilar o transdutor de sinal e o activador de transcrição 1 (STAT1) e, consequentemente, controlar a expressão de alguns genes alvo (Soltanoff et al., 2012).

Para além de regular estes factores, o NF- κ B regula a IL-1 que medeia a reabsorção óssea e a formação de osteoclastos através de percursos que

expressavam em excesso c-Fos. Foi revelado que, para a reabsorção óssea mediada pela IL-1, é necessário o NF- κ B p50 e p52 (Soltanoff et al., 2012).

3.2.4. ITAM

O RANKL juntamente com o ITAM promovem a estimulação da via de sinalização Ca^{2+} /NFAT para o controlo da oscilação dos níveis de Ca^{2+} . Como mostra a figura 13, isto acontece porque o RANKL estimula, através da ligação do receptor associado aos osteoclastos (OSCAR) com o receptor triggering expresso nas células mielóides (TREM-2), a ligação do ITAM ao *FC receptor common γ subunit* (FcR γ) que, por sua vez, está complexado com *DNAX-activating protein 12* (DAP12). Após o início desta sinalização, desencadeia-se um processo onde é activada a fosfolipase C γ (PLC γ) que, por sua vez, permite a libertação de Ca^{2+} intracelular mediada pela calmodulina. Este processo vai permitir a auto-amplificação do NFATc1, que como referido anteriormente, irá permitir a transcrição de genes necessários para a diferenciação de osteoclastos. Assim este processo, também, garante a manutenção da homeostase óssea (Kular et al., 2012; Soltanoff et al., 2012).

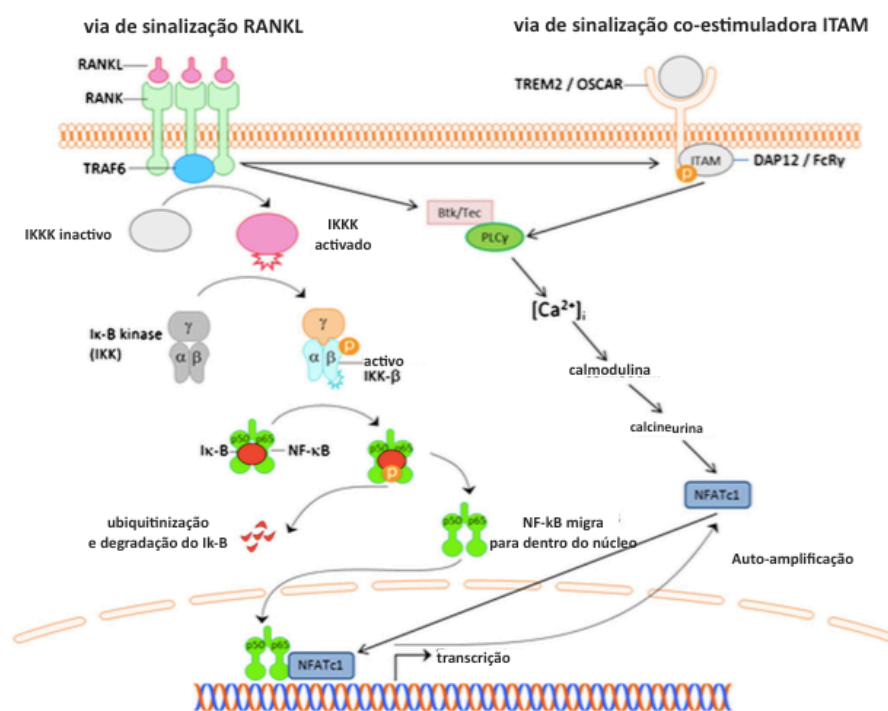


Figura 13: Vias de sinalização na diferenciação de osteoclastos, adaptado de Kular et al. (2012)

Se houver deleção destes factores, a diferenciação osteoclástica será deficiente e isto conduzirá, para além de outras maneiras já descritas, a uma condição de osteopetrose, embora ainda não sejam conhecidos os intermediários entre esta via co-estimuladora do ITAM e a RANKL. Segundo Soltanoff et al. (2012), o comprometimento da fosforilação da tirosina quinase esplénica (Syk) é devido à ausência de DAP12 e de FcR γ e conseqüentemente, não á diferenciação osteoclástica ou reabsorção óssea. Sem esta quinase, o ITAM não sofre fosforilação, não havendo progressão desta via co-estimuladora. O aumento de Syk provocado por uma mutação em sh3-domain binding protein 2 (Sh3bp2) leva a um aumento das respostas de RANKL e M-CSF, originando osteoclastos hiperactivos , traduzindo-se num processo de inflamação e erosão óssea cortical (Soltanoff et al., 2012).

3.2.5. RGS10 e RGS12

RGS10A é uma isoforma que pertence a uma família de 21 proteínas G de sinalização, importante no processo das vias de sinalização dos osteoclastos. Está implicada no processo de oscilação do Ca²⁺ que foi abordado acima. Quando há silenciamento do seu RNAi, ocorre um bloqueio nas oscilações de Ca²⁺, pois esta interage directamente com o complexo formado pela calmodulina e o Ca²⁺ e com o PIP₃, promovendo a activação de PLC γ e a oscilação do Ca²⁺. Foi observado que sua ausência leva a uma condição de osteopetrose (Soltanoff et al., 2012).

Soltanoff et al. (2012) propuseram um modelo sobre como funciona a RGS10 na diferenciação dos osteoclastos, nomeadamente na oscilação do Ca²⁺, com base nos seus resultados obtidos, que passo a citar: “RANKL medeia a DAP12 e FcR γ , adaptadores moleculares de membrana que contêm um motivo ITAM e que activam o PLC γ . PLC γ hidrolisa o PIP₂, que origina PIP₃, que, em seguida, desencadeia uma libertação inicial transitória de Ca²⁺ dos espaços de armazenamento intracelular. A libertação do Ca²⁺ intracelular permite um aumento do Ca²⁺ ao nível intracelular para atingir um pico de concentração máximo, levando à formação do complexo Ca²⁺/calmodulina. Este complexo formado compete com o sitio de ligação do PIP₃ na RGS10 e promove a libertação do PIP₃. Uma vez que a concentração do Ca²⁺ atinge o seu pico de formação, há um começo de recarga deste no reticulo endoplasmático (ER), na ausência da activação adicional de PLC γ , e a combinação entre a recarga de

Ca^{2+} no RE e a ligação da calmodulina provoca a diminuição da concentração de Ca^{2+} . O complexo formado entre a calmodulina e o Ca^{2+} dissocia-se de RGS10 quando está presente a uma baixa concentração de Ca^{2+} . E, assim, o PIP_3 permanece livre, activando o $\text{PLC}\gamma$, que em seguida se une à RGS10 (sem a competição do complexo Ca^{2+} /calmodulina). Por sua vez, $\text{PLC}\gamma$ activo desencadeia a libertação de Ca^{2+} dos depósitos intercelulares por meio da libertação de PIP_3 , originando um 2º pico, permitindo que o processo continue, causando oscilações de Ca^{2+} ” (Soltanoff et al., 2012). Concluindo, desta forma, que as oscilações provocadas por esta via de sinalização, activam a expressão de calcineurina e de NFATc1 na fase final da diferenciação osteoclástica.

Para além desta proteína, a RGS12, também, revelou um papel importante na fosforilação de $\text{PLC}\gamma$, pois a sua ausência provoca uma fosforilação deficiente e, conseqüentemente, um bloqueio das oscilações de Ca^{2+} .

3.2.6. Src

Segundo Soltanoff et al. (2012), a Src “pertence a uma família de nove *nonreceptor tyrosine kinases* (NRTKs) presentes na membrana celular” (Soltanoff et al., 2012). Esta participa nas vias de sinalização mediadas pelo RANL e pelo M-CSF e está relacionada com a conexão e a integridade dos podossomas que são constituintes dos osteoclastos e que os permitem conectar às outras células, visto serem estruturas especializadas e ricas em actina. A sua ausência provoca osteopetrose, devido à má reabsorção óssea feita, unicamente, pelos osteoclastos maduros; para a restauração dos podossomas é necessário SH2 e SH3 que são domínios de ligação que permitem o retorno da organização dos mesmos e a sua dinâmica, podendo alterar a capacidade de sobrevivência e diferenciação dos osteoclastos. Tanto Src como o factor CB1 são expressos nos osteoclastos (Horne et al., 2005; Soltanoff et al., 2012).

Src ao ligar-se ao *Casitas B-lineage lymphoma* (CB1), fosforila-o, através da sua ligação inicial à tirosina quinase 2 (Pyk2), vai permitir que o CB1, auxilie a endocitose e activação de mais mediadores, como a dyamina (uma GTPase que está na origem da formação de vesículas endocíticas), PIP_3K (permite a integridade do anel de actina e a ligação dos osteoclastos), entre outros, importantes no desenvolvimento de polaridade celular e na interligação celular. O seu papel está

relacionado apenas com a reabsorção óssea osteoclástica foi determinado em estudos feitos em ratinhos com ausência de Src (Horne et al., 2005).

As integrinas que permitem a ligação do Src à Pyk2 permitem a polarização da célula, imediatamente após a adesão celular, activando o processo de reabsorção; por último, estas gerem a adesão entre as células e a matriz óssea (Soltanoff et al., 2012).

3.2.7. Catepsina k

Descobertas já no século XIX, as catepsinas pertencem a uma família de 21 proteases lisossomais; são denominadas também como proteases de cisteína e podem ser divididas, ainda, a nível da sua acção nos osteoclastos, em três tipos- exocítico (catepsinas K, L), endocítico (catepsina D) e de ligação membranar (catepsina E) (Everts et al., 2006; Goto, Yamaza, & Tanaka, 2003).

Dentro das catepsinas é importante destacar o papel da catepsina K, que está envolvida na reabsorção óssea feita pelos osteoclastos feita a um pH baixo (Everts et al., 2006). Foi descoberta através de estudos que envolveram a mutação do seu gene em 1q21, que provocava uma doença autossómica recessiva, a picnodisostose (doença Toulouse-Lautrec). A sua ausência em estudos em ratinhos levou a osteopetrose resultante da reabsorção óssea debilitada (Everts et al., 2006; Goto et al., 2003; Soltanoff et al., 2012). Em diversos estudos realizados, esta catepsina exerce uma enorme actividade proteolítica contra as proteínas matriciais ósseas e é, também, regulada por MMPs. Goto et al. (2003) afirmou que a remoção de colagénio ósseo é fundamental para a interligação da reabsorção e a formação óssea, e que as MMPs também são importantes para esse desafio (Goto et al., 2003).

No entanto, novas descobertas apontam que os osteoclastos não sofrem apoptose e senescência na ausência de catepsina K e apresentam-se em elevado nº devido à diminuição dos níveis de p19, p53 e p21 (Chen et al., 2007).

Por último, em estudos relacionados com a deficiência de catepsina K em diferentes tipos de ossos, ossos longos e ossos do crânio, observou-se que, os osteoclastos sem catepsina K, nos ossos longos compensavam a sua ausência através das MMPs; nos ossos do crânio, substituem a sua ausência por outras enzimas da mesma família, destacando a catepsina G, que medeia a reabsorção feita pelas MMPs. Com base nestes dados originaram uma nova ideia de que existem

osteoclastos em diferentes zonas do esqueleto com actividade adaptada ao meio em questão (Everts et al., 2006).

3.2.8. Vav3

É importante salientar que este factor está implícito na activação osteoclástica e na densidade óssea, destacando que a sua ausência conduz a uma desorganização da actina no citoesqueleto, na polarização e a actividade de reabsorção, resultantes da sinalização deficiente do M-CSF e de integrinas $\alpha_v\beta_3$ (Soltanoff et al., 2012).

Outros estudos revelaram que a tirosina quinase Syk é um regulador importante do Vav3 nos osteoclastos (Faccio et al., 2005).

4. Factores de transcrição reguladores da diferenciação osteoblástica

Dos factores de transcrição que favorecem a osteoblastogénese, os principais são o Runx2, a osterix e o factor activador transcripcional 4 (ATF4). Contudo podemos salientar, também, o papel da família AP constituída por Jun, Fos e fra; e ainda, o papel das Smads, dos C/EBP, do factor lymphoid-enhancing e do Twist (Kanatani et al., 2006; Kobayashi et al., 2006; Kronenberg, 2004; Y. Li & Xiao, 2007; Makita et al., 2008; Marie, 2008; H. M. Ryoo, Lee, & Kim, 2006; Ziros et al., 2008)

4.1. Runx2

A família Runx é constituída pelo Runx 1, conhecido, também, por PEBP2, CBFA2 e AML1; pelo Runx2, que da mesma maneira, também, se domina por PEBP2aA, CBFA1 e AML3; e pelo Runx3, chamado, identicamente, por PEBP2aC, CBFA3 e AML3 (Makita et al., 2008). Apesar de compartilharem o mesmo motivo de reconhecimento de DNA, são codificados por genes diferentes (Soltanoff et al., 2012). O seu domínio de ligação ao DNA é semelhante ao da *Drosophila*, o domínio *runt*. O Gene Runx 2 humano tem cerca de 220Kb presente no cromossoma 6q21 (Soltanoff et al., 2012; Ziros et al., 2008). De todos os elementos da família Runx, o Runx2 é o principal factor transcripcional que coordena o destino da linhagem osteoblástica e controla a sua diferenciação (Marie, 2008).

Este liga-se ao DNA, que com a ajuda do CBF β aumenta a sua estabilidade e protege-o da degradação proteolítica por ubiquitinação (Soltanoff et al., 2012). A expressão de Runx2 promove a activação de dois genes *Col1a1* e osteocalcina e a sua respectiva produção (Makita et al., 2008; Soltanoff et al., 2012; Ziros et al., 2008).

Durante a embriogénese, o Runx2 começa a ser detectado por volta do nono dia, a sua expressão vai sendo mais visível ao longo do desenvolvimento esquelético, podendo induzir a expressão genética necessária para a determinação da linhagem celular e para a diferenciação de MSC (Ziros et al., 2008). é expresso nos testículos, no timo, nos condrócitos e nos osteócitos; não está presente no cérebro, coração,

fígado, intestino e pulmão (Makita et al., 2008; Soltanoff et al., 2012). Estudo feito por Ziros et al. (2008) revelou que o Runx2 evidencia-se aumentado, paralelamente, com o aumento do potencial de ligação ao DNA, devido a um baixo estímulo mecânico nas células osteoblásticas humanas em cultura, demonstrando que esta indução causada foi dirigida por meio da sinalização das MAPK (Ziros et al., 2008).

Este factor transcripcional está envolvido tanto na ossificação endocondral como na intramembranosa, visto estimular a via IHH (Hartmann, 2009; Kanatani et al., 2006).

A displasia cleidocraniana, uma doença autossómica, caracterizada por clavículas hipoplásticas, fontanelas abertas, anomalias esqueléticas, e atraso no desenvolvimento esquelético, é devida a uma haplodeficiência do Runx2, que por sua vez, leva a uma sinalização deficiente pelo TGF- β /BMP/ Smad, levando a uma perda total de formação óssea (Kronenberg, 2004; Y. Li & Xiao, 2007).

Segundo Soltanoff et al. (2012), a expressão ectópica de Runx2, que leva ao aumento da expressão de osteocalcina, ALP, MMP-13, sialoproteína óssea e Col1a1, provoca uma ossificação endocondral em algumas áreas do esqueleto que, por norma, não calcificam. A sua expressão excessiva impede a derivação dos osteócitos. Foi demonstrado que algumas mutações no Runx2 bloqueiam a ossificação endocondral e intramembranosa por completo (Soltanoff et al., 2012; Ziros et al., 2008).

É importante destacar que o Runx2 é controlado a montante por diversas proteínas, como: a proteína Msh homebox 2 (Msx2) e a NK3 Homebox 2 (Bapx1), a Dlx5, as proteínas Twist, o supressor de tumor p53, a proteína dedo de zinco schnurri-3 (Shn3), a ciclina D1 dependente de quinase 4 (Cdk4) e as Homebox A (Hoxa 10 e Hoxa2) (Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Resumidamente, Msx2, expressa durante o desenvolvimento ósseo pelos osteoclastos, se for inactivada provoca um atraso na ossificação, acompanhado pela diminuição da regulação da expressão do Runx2; inibe a adipogénese, favorecendo a diferenciação de MCS em osteoblastos. A Bapx1, outra proteína activadora da expressão do Runx2, está envolvida na formação do esqueleto axial. A Dlx5 tem a mesma função que as proteínas anteriores, no entanto o seu mecanismo baseia-se na formação de heterodímeros com a Msx2, activando a osteocalcina, a qual impede a sua repressão mediada por Msx2 (Soltanoff et al., 2012). Já as proteínas Twist (Twist1, primeiramente denominada por Twist, e Twist2, anteriormente chamada Dermo1) reprimem a actividade do factor Runx2, controlando de outra forma a

regulação óssea (Kumarasinghe, Sullivan, Kuliwaba, Fazzalari, & Atkins, 2015). Estas proteínas codificam factores de transcrição homólogos ao Twist da *Drosophila*. A ausência de Twist1 resulta em anomalias ao nível do crânio, não permitindo o fecho do tubo neural; enquanto que se se apresentar em heterozigotia, origina craniossinostoses, resultante da diferenciação prematura dos osteoblastos (Kronenberg, 2004; Soltanoff et al., 2012). É de referir que ratinhos que expressam Twist1^{+/-} exibem um aumento de apoptose e uma reduzida proliferação na estrutura mesênquimal. Está descrito um novo domínio que medeia a função destas proteínas, o *Twist box*; caso haja uma mutação no *Twist box* do Twist1, há um avanço mais rápido na formação óssea tanto em homozigotia como em heterozigotia (Kumarasinghe et al., 2015; Soltanoff et al., 2012; Zhao et al., 2015).

Para além desta última classe de proteínas referidas, também o p53, gene supressor de tumor, está implicado na regulação negativa da diferenciação dos osteoblastos, pois a ausência deste nos osteoprogenitores resulta no aumento da expressão de Runx2 e de Osterix, e pela elevada formação óssea e densidade óssea em ratinhos adultos deficientes em p53 (Soltanoff et al., 2012). Também devemos destacar o papel de Shn3, um adaptador proteico no sistema imunitário e um importante regulador da formação óssea adulta; em que a sua ausência conduz a uma espécie de osteopetrose, refletindo um aumento da massa óssea devido a uma maior actividade dos osteoclastos. Esta proteína degrada o Runx2 por meio de ubiquitinação através do recrutamento de uma ligase WWP1 ligase. Da mesma forma que a proteína anterior, a ciclina D1-Cdk4 promove a degradação do Runx2 (Soltanoff et al., 2012). Também, é de salientar que a proteína Hoxa10 ao induzir a BMP-2, activa o Runx2, a ALP, osteocalcina e a sialoproteína. Permite a diferenciação de MSC, dando início à osteogénese, regulando, directamente, o fenótipo osteoblástico (Soltanoff et al., 2012). Como as MSCs estão direccionadas para a expressão bidirecional, expressando Sox9 e Runx2, necessários para a condrogénese e osteogénese, respectivamente; a ausência de Hoxa2 mostrou-se positiva na regulação deste dois genes (Hartmann, 2009; Shekaran et al., 2015; Soltanoff et al., 2012). Por fim, podemos evidenciar os co-repressores e co-activadores do Runx2, como podemos ver na tabela 2.

Tabela 2: Factores co-activadores e co-repressores do Runx2, adaptado de (Soltanoff et al., 2012)

Co-activadores/ Co-repressores	Função	Observações
Cbfb	Co-activador	Fundamental para melhorar a ligação do Runx (Runx1, Runx2, Runx3) ao DNA; a sua ausência é letal, visto provocar um grande atraso na ossificação e provocar hemorragias graves (Runx3 e Runx1- indispensáveis para a hematopóiese). Apesar disto, o Runx2 actua na ausência deste co-activador (Kanatani et al., 2006; Soltanoff et al., 2012).
P300, CREB binding protein (CBP), MYST histone acetyltransferase monocytic leukemia3/4 (MOZ)/ (MORF)	Co-activador	Enquanto que os dois primeiros estimulam o Runx2 por via R-Smads, aumentando a transcrição de genes alvo dependente de Smads; os dois últimos actua no domínio de activação do Runx2 e activam o promotor da Osteocalcina, podendo ser relevante para a ossificação intramembranosa. As suas ausências podem originar defeitos cranio-faciais (Soltanoff et al., 2012).
Histonas Desacetilases	Co-repressor	Promovem a repressão transcripcional pela remoção de grupos acetil, alterando a cromatina estruturalmente, promovendo a sua condensação pela remoção de um domínio necessário ao recrutamento de proteínas co-activadoras. Dentro desta família, destaque o papel da inibição de HDAC3, que acelera a mineralização óssea e a expressão de osteocalcina, osteopontina e sialoproteína; e da HDAC4, que ao bloquear o domínio de ligação ao DNA pelo Runx2, inibe a sua actividade. Por outro lado a expressão excessiva de HDAC4 inibe a hipertrofia dos condrócitos; e o equilíbrio entre a sua expressão e a expressão de <i>transcription factor myocyte enhancer factor 2C</i> (Mef2c) beneficia a ossificação endocondral (Bradley, et al., 2015; Hartmann, 2009; Soltanoff et al., 2012).
Grg/TLE e YAP	Co-repressor	Inibem a activação do Runx2 dependente de OCN (Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).
Smurf	Co-repressor	Regulam a transcrição de genes através da degradação proteosomal. Diminuem os níveis de Runx2, atrasando o desenvolvimento/diferenciação dos osteoblastos (Soltanoff et al., 2012).

Contudo, existem ainda outras proteínas que interagem com o Runx2, da mesma maneira como foram descritos as anteriores.

4.2. Osterix

Apesar de ainda necessitar alguns estudos, pois ainda não foi bem elucidado o ponto de interação que esta tem sobre o Runx2, esta proteína é conhecida como um 2º regulador transcricional do Runx2, durante o final da formação óssea. É uma proteína, cujo domínio de ligação ao DNA é constituído por dedos de zinco tipo C2H2 (Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012). Esta actua a jusante do Runx2, permite a activação NFAT, que por sua vez desencadeia a activação da via Wnt, promovendo a formação óssea e a regulando a massa óssea (Celil & Campbell, 2005). Consequentemente, a expressão excessiva de NFAT1c estimula a activação de genes como COL1A1 dependente de Osx (Koga et al., 2005; Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Na sua ausência, foram detetadas deficiências na formação óssea e na diferenciação dos osteoblastos. Foi, também demonstrada a expressão de marcadores condrocíticos, como o Sox9, na sua ausência em precursores osteoblásticos, defendendo a bipotencialidade do Runx2 na diferenciação dos osteo/condroprogenitores (Koga et al., 2005; Soltanoff et al., 2012).

A Osx é também regulada negativamente por factores como o Shnurri-2 e p53, como acontece com o Runx2, diminuindo, assim, a osteoblastogénese e a formação óssea. Por outro lado, as MAPKs parecem estar envolvidas na mediação feita por BMP-2 e IGF-1 na expressão de Osx (Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

4.3. ATF4

A proteína ATF4 é um factor transcricional que conjuntamente com o complexo Runx2/Cbfa1 estimula/ regula a actividade da OCN. Juntamente com os anteriores é um factor muito importante na regulação dos osteoblastos, cuja actividade é regulada numa fase pós-transcricional (Hartmann, 2009). Pode ser sujeito a fosforilação por parte da *Ribosomal protein S6 kinase polipeptide 3* (Rsk2), necessária para desencadear a diferenciação terminal osteoblástica, e para a expressão de OCN. A sua deficiência provoca uma diminuição da formação óssea e a não fosforilação, devido a inativação de Rsk2 conduz a uma doença Coffin-Lowry, uma desordem genética ligada ao cromossoma X (Hanauer & Young, 2002). A sua fosforilação aumentada pela PKA pode levar também ao aumento da expressão de

RANKL (responsável pela diferenciação dos osteoclastos) (Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

Por último é importante referir que este factor interage com a proteína matricial nuclear *special AT-rich sequence binding protein2* (STAB2), que para além de reprimir a *Hoxa2*, aumenta a ligação de ATF4 aos elementos de reconhecimento do DNA, modificando a sua transactivação nos osteoblastos (Marie, 2008; Soltanoff et al., 2012).

5. Factores de transcrição reguladores da diferenciação osteoclástica

Durante o processo de formação e diferenciação óssea são necessários vários factores genéticos. Nas várias etapas de diferenciação, activação e sobrevivência osteoclástica são expressos vários factores genéticos específicos, dos quais se destacam o PU.1, AP-1, NF- κ B NFATc1, Mitf e Myc.

5.1. PU.1

O PU-1 é um factor de transcrição hematopoiético, envolvido na diferenciação da linhagem celular mielóide e linfocítica. Parece, também, adotar um papel essencial para iniciação do processo da osteoclastogénese, visto que os osteoclastos derivam de progenitores hematopoiéticos. Este papel foi provado com base em estudos desenvolvidos em ratinho com a ausência deste gene, provocando a sua morte fetal, devido à falta das linhagens referidas. Este factor promove, também, a derivação dos macrófagos a partir de células estaminais embrionárias (Courtial et al., 2013; Soltanoff et al., 2012).

O PU.1 Está em todas as fases da formação/diferenciação dos osteoclastos, onde o seu mRNA está elevado 3 vezes mais do que nas restantes células em que se pode encontrar. Tem a capacidade de induzir genes específicos dos osteoclastos, nomeadamente, o RANKL, através da sua interacção com o NFAT1c, um alvo transcricional deste factor e fundamental para a osteoclastogénese (Courtial et al., 2013; Soltanoff et al., 2012).

A ausência do factor PU.1 impede a activação do RANKL e conduz a um fenótipo osteopetrótico, bloqueando a diferenciação celular a partir de M-CSF (Soltanoff et al., 2012).

O Pu.1 tem, também, um outro alvo, o Tal2, um factor de transcrição do tipo hélix-loop-helix que actua no sistema hematopoiético. Este último está aumentado na osteoclastogénese, influenciando a expressão do gene TRACP que

actua na diferenciação osteoclástica. Assim, é nos permitido que Tal2 para além de actuar no sistema hematopoiético, também actua na diferenciação óssea (Courtial et al., 2013).

5.2. AP-1

O factor AP-1 constituído por dois tipo de proteínas, Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) e Jun (c-Jun, JunB, JunD), é importante na osteoclastogénese. É activo através da interação entre o RANKL e o *Toll-like receptors* (TLR), regulando os osteoblastos positivamente, através da sua complexação com os factores c-fos e Yet. (Soltanoff et al., 2012).

Para além deste ser benéfico a nível dos osteoblastos (Marie, 2008), este desempenha um papel muito importante ao nível da activação do RANKL nos osteoblastos, visto que a sinalização feita pelo RANKL promove a transcrição de genes alvo dependentes de Fos (Fra-1) e de NFATc1. Ainda, c-Jun ao complexar-se com o NFATc1 actua a jusante da activação da osteoclastogénese pelo RANKL. A ausência deste factor determina uma condição de osteopetrose (Soltanoff et al., 2012).

5.3. NF-κB

O factor NF-κB, envolvido na regulação da diferenciação e apoptose celular, é representante de cinco factores de transcrição: p50 (NF-κB1), p52 (Nf-κB2), p65 (RelA), c-Rel e RelB. Este conjunto de factores presentes no citoplasma, são translocados para o núcleo da célula onde vão controlar outros genes alvos envolvidos na diferenciação celular, nomeadamente IL-1, Il-6, TNF-α e GM-CSF, que após a activação da proteína de degradação Ikb, conduz à sua transcrição. Assim, podemos destacar, também, o facto deste factor ser importante na regulação da expressão de uma série de mediadores inflamatórios e de citocinas pro-inflamatórias (Jeong, Pise-Masison, Radonovich, Park, & Brady, 2005; Soltanoff et al., 2012).

O Nfact1 apresenta uma subunidade importante, a p65/RelA, que reprime a expressão de p53 através da activação de TAX. A Tax é responsável pela adaptação da transcrição de genes importantes, através da activação do NFATc1. É importante

destacar novas evidências sobre o facto de que a inibição do p53, feita pela Tax, requerer a fosforilação de Scr-536 e requer um domínio C-terminal (Jeong et al., 2005).

Segundo Soltanoff et al. (2012), ratos com deficiência em p50 e p52 em simultâneo apresenta osteopetrose, devido à deficiente diferenciação osteoclástica.

5.4. NFATc1

O factor de transcrição NFATc1 pertence a uma família composta por quatro factores de transcrição denominada NFATc, com elementos numerados de 1 a 4 (NFATc1 a NFATc4). Para além do sistema imunitário, este desempenha um papel muito importante na osteoclastogénese, visto auto-regular-se em resposta à BMP-2, na sinalização do Ca^{2+} . Quando há libertação do Ca^{2+} ao nível intracelular, à activação da calmodulina e consequentemente da calcineurina, permitindo a activação do NFATc1 que envolve a expressão de Smad e PI_3K . Alguns estudos reportaram que a sua inibição resulta no bloqueio da diferenciação dos osteoclastos, actuando a jusante do RANKL, garantindo a sua função na fase terminal da osteoclastogénese (Mandal et al., 2015).

Este factor presente no citoplasma, ao complexar-se com outras proteínas é transportado para o núcleo, onde, juntamente com estas, vais iniciar a transcrição de genes responsáveis pela osteoblastogénese (Mandal et al., 2015).

Para além da calcineurina, a expressão da fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), associada aos receptores da catepsina K e da calcitonina, induz a activação do NFATc1 e a diferenciação de osteoclastos (Mandal et al., 2015; Soltanoff et al., 2012).

Resumindo, este factor é regulado pela sinalização do conjunto de factores RANKL/TRAF6/ Fos. No final da diferenciação este é auxiliado pelas proteínas Fos e Jun, induzindo genes específicos da osteoclastogénese, como o gene de TRAP, do receptor da calcitonina, da catepsina K e da integrina $\alpha_v\beta_3$, sendo que esta última é responsável pela reabsorção óssea (Soltanoff et al., 2012).

5.5. Mitf

O Mitf está envolvido no desenvolvimento de diversas linhagens celulares e pertence a uma subfamília de factores transcripcionais que inclui Tfe3, Tfeb e Tfec (Bronisz et al., 2014). A fosforilação deste factor através de ERK e MAPK18, promove a formação de complexos estáveis com CBP/p300 e BGR1, aumentando a sua actividade transcripcional (Soltanoff et al., 2012).

Foi descoberto que FUS, um proteína multifuncional, é co-activadora deste factor na regulação de genes responsáveis pela formação de osteoclastos. A fosforilação de Mitf pela MAPK38 promove a interação com o FUS e BRG1, permitindo uma melhor compreensão das interações que o FUS sofre para poder activar a transcrição dos genes alvos do factor Mitf (Bronisz et al., 2014).

5.6. Myc

A família de genes de *myelocytomatosis oncogene* (Myc) é constituída pelos genes c-Myc, N-Myc, L-Myc e S-Myc. É responsável pela proliferação celular e quando estão desregulados motivam muitos dos tumores no ser humano. O c-Myc é necessário para a osteoclastogenese induzida pelo RANKL, estando comprovado pelo facto do c-Myc estar aumentado neste processo de diferenciação pelo RANKL. Ainda assim, o c-Myc é um alvo a jusante do RANKL, não estando presente em células diferenciadas. Por ultimo, foi detectado a regulação negativa por parte do c-Myc em relação ao factor TRAP (Soltanoff et al., 2012).

6. Patologias associadas ao metabolismo ósseo

Existem inúmeras patologias associadas ao metabolismo ósseo, desde a osteoporose, osteogénese imperfeita, osteoporose-pseudoglioma, até mesmo metastases ósseas associadas ao cancro da próstata e da mama. Dentre estas, dou especial atenção à osteoporose.

6.1. Osteoporose

A osteoporose é uma doença multi-factorial, que envolve a diminuição da densidade da massa óssea e alteração da qualidade da microestrutura óssea, provocando, conseqüentemente, a diminuição da resistência óssea e o aumento do risco de fracturas. Pode ser dividida em dois tipos: primária, se não houver patologias adjacentes que indiquem a sua ocorrência ou que resulte de factores como a deficiência de estrogénio, a aquisição de massa óssea insuficiente durante o crescimento, por exemplo; e secundária, quando a perda óssea é relacionada com uma doença primária ou relacionada com um distúrbio alimentar ou com a medicação que o doente faz. A diminuição da densidade da massa óssea é uma consequência do aumento da actividade osteoclástica, havendo uma maior reabsorção óssea e da diminuição da taxa de remodelação óssea (Mohammadi et al., 2014; Park et al., 2014; Ralston, 2010). Esta patologia progride lentamente e pode ter como consequências a perda de tecido ósseo, a diminuição da visão, a alteração do equilíbrio, dificuldades na locomoção e provocar algumas quedas (Park et al., 2014; Ralston, 2010)..

A osteoporose pode ser detectada tardiamente, pois é uma doença silenciosa e, por isso, ser considerada um dos maiores problemas de saúde segundo a OMS (Dionyssiou, 2015; Saúde, 2008). Dentro dos factores de risco potenciais para o desenvolvimento da doença surgem os factores hormonais, estilo de vida pouco saudáveis, doenças como a artrite reumatoide e o uso prolongado de corticosteróides. Assim para prevenir a osteoporose, podemos fazer uma alimentação saudável, praticar

exercício físico, evitar hábitos tabágicos e alcoólicos, adoptar uma postura correcta, realizar exames de densidade mineral óssea e evitar quedas (Saúde, 2008; Viveiro, n.d.).

Em estudos genéticos que envolviam com gémeos verdadeiros ou que envolviam pais e respectivos descendentes, há uma grande evidencia hereditária, para esta doença. Visto haver uma variância de cerca de 50% a 85% do pico da massa óssea geneticamente determinada (Kwon, 2009). Assim, para além dos factores não genéticos envolvidos nesta doença, há um grande desafio do estudo de factores genéticos implicados na osteoporose, os quais podem ter um pequeno papel, mas relevante, em relação à regulação da massa óssea e à formação de células ósseas (Dionyssiotis, 2015). Na tabela seguinte, estão descritos alguns factores genéticos, já abordados anteriormente, que desempenham um papel no aparecimento da osteoporose.

Tabela 3: Genes associados à BMD/Osteoporose, detectados em alguns estudos e correlacionados com a densidade da massa óssea e o fenótipo relacionado com a Osteoporose. Adaptado de Dionyssiotis (2015)

AR	AHSG	ApoE	BMP2	BGP	CASR
CLCN7	COL1A1	COL1A2	CT	CYR1B1	COMT
CYP1A1	CYP17	CTR	CYP19	CCR2	DBP
DRD4	ERbeta	ERalpha	FRA-1	GH1	GnRH
HLA-A	IL-6	LRP5	LRP4	LCT	IL-1RA
LEPR	IL-10	I-TRAF	IRAK1	IGF-1	IGF-II
Klotho	MMP-1	MGP	MTHFR	MMP-9	NPY
NCOA3	OSCAR	OPG	P57(KIP2)	PON1	PDE4
PPARG	PLDO1	PTHR1	PTH	PDE4D	QPCT
RIL	RUNX2	Sox4	SERT	SOST	TNFalpha
TNFR2	TCIRG1	TGFbeta	WRN		

Para além dos genes referidos na tabela destaco um outro gene, o VDR, o receptor de vitamina D, por exemplo, funciona como um factor transcripcional *trans-actin*, está envolvido na homeostase mineral óssea, associado significativamente com a densidade óssea mineral (DMO). A sua variação alélica contribui em cerca de 75% para o efeito genético nas alterações da DMO. Por sua vez, implicado na redução da

densidade óssea e no aumento das fracturas, o Col1A1 ou Col1A2 parece ser um candidato para o controlo genético da DMO, visto ser responsável pela formação e regulação da maior proteína matricial óssea. Um outro gene que destaco é o gene do receptor de estrogénio (ESR) que codifica o próprio receptor do estrogénio. Este receptor interage com o estrogénio e com outros factores transcripcionais, o AP-1, SP-1 e NF- κ B. Como é do conhecimento geral, o estrogénio sendo um regular endócrino bastante importante no crescimento e manutenção da estrutura óssea, quando está ausente ou diminuído no organismo, origina uma diminuição da DMO. Em estudos realizados, foi dado destaque ao facto do estrogénio ser osteo-protector na formação de osso trabecular (Dionyssiatis, 2015; Wu et al., 2013).

Após a identificação do tipo de osteoporose, primária ou secundária, e a determinação se a perda de massa óssea está ou não relacionada com alguma condição fisiológica do doente, admite-se o uso de terapêutica farmacológica. Caso seja determinada osteoporose secundária, a terapêutica farmacológica para melhorar a DMO deve ser contemplada se se justificar o risco elevado de fracturas adjacentes, sendo inicialmente direccionada ao tratamento de uma condição fisiológica primária que condiciona a DMO (Dionyssiatis, 2015; Furtado & Gaspar, 2010).

A terapêutica farmacológica engloba terapêutica que inibe a reabsorção óssea por parte dos osteoclastos como a calcitonina, a terapêutica hormonal de substituição (THS), os modeladores selectivos dos receptores de estrogénio (SERM's), os bifosfonatos, e o Denosumab; a terapêutica com agentes anabólicos, como a PTH, os fluoretos; e a terapêutica que se baseia em agentes de dupla-acção, como ranelato de estrôncio (Dionyssiatis, 2015).

Resumidamente, os agentes mais usados na terapêutica da osteoporose como patologia primária são os bifosfonatos (etidronato, clodronato, ácido alendronico, residronato, ibandronato e ácido zolendronico); a terapêutica hormonal de substituição, sendo o único fármaco anabólico aprovado pela FDA, a PTH; a calcitonina; e os SERM's (Furtado & Gaspar, 2010).

Contudo, o aumento da ingestão de alimentos ricos em cálcio e vitamina D, a toma de suplementos contendo estes nutrientes e o aumento do nível de actividade física complementam a terapêutica farmacológica.

7. Considerações finais

O tecido ósseo está em constante remodelação devido ao equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea feita pelos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. Uma má regulação da diferenciação das células ósseas, até mesmo dos osteócitos, para além das anteriormente referidas, pode desencadear diversas patologias.

Desde a formação óssea durante a embriogénese até ao equilíbrio das funções celulares ósseas, estão implicados vários factores transcricionais, proteínas de sinalização, proteínas co-reguladoras da transcrição que suportam a diferenciação, proliferação e maturação de células ósseas de diferentes linhagens celulares a partir de *stem cells*, podendo, no caso dos osteoblastos, originar osteócitos, por último no tecido conectivo mineralizado.

Na via de sinalização Wnt/ β -catenina podemos ter vários alvos atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos, visto ser uma via canónica alvo de várias interações moleculares com bastante potencialidade de actuação, como o gene LPR5/6 envolvido na osteoporose. Existem várias questões por desvendar em praticamente todas as sinalizações abordadas nesta tese. Nos últimos anos tem havido mais investigações que nos têm permitido conhecer mais e melhor o osso, o seu metabolismo e patologias associadas. Apesar disto, questões como o facto da Wnt possa ou não controlar directamente os osteoclastos, continuam por esclarecer. Outros factores envolvidos na diferenciação dos osteoblastos, como o Runx2, também, são controlados por diversos mecanismos. Novos mecanismos de regulação em diferentes etapas da diferenciação, proliferação e maturação dos osteoblastos têm sido mais aprofundados, como a Osx e o ATF.

Por curiosidade minha, (N. K. Lee et al., 2007), referiram que a osteocalcina aumentava a tolerância à glucose *in vivo* e estimula a ciclina D e a expressão de insulina em células β . Todavia, existem várias demonstrações de que o esqueleto pode funcionar como um glândula endócrina secretora de osteocalcina a partir dos osteoblastos como uma hormona (N. K. Lee et al., 2007).

Os osteoclastos são as principais células responsáveis pela reabsorção óssea, e a sua actividade tem um impacto enorme sobre o esqueleto, visto que a ausência de

alguns factores reguladores da sua diferenciação, podem provocar osteopetrose, como a deficiência em PU.1. vários estudos demonstraram que a diferenciação dos osteoclastos a partir do compromisso dos seus progenitores é bloqueada pela ruptura de alguns genes como o *Mitf*, *NF-κB*, *c-fos* e *NAFTc1*; e que estes e outros factores transcripcionais trabalhavam em equipa no controlo da diferenciação deste tipo celular.

Dentro de todos os factores transcripcionais, destaco, ainda, a sinalização feita pelo RANKL e pelo ITAM, durante o crescimento e diferenciação osteoclástica. Na sinalização pelo RANKL, que não poderia deixar de ser excepção, também continuam várias questões por desvendar, como por exemplo o valor das MAPKs e de outros genes activados pelo RANKL. Analogamente, ainda permanecem por desvendar algumas moléculas que ligam o RANKL e o ITAM.

Por último, na osteoporose, a doença que abordei nesta tese, existem diversas hipóteses genéticas por explorar, talvez por consequência da falta de esclarecimentos genéticos das células envolvidas. Novas descobertas sobre terapêuticas já existentes, parecem ter tido algum significado clínico, como a terapêutica hormonal de substituição, em que era feita por praticamente todas as mulheres pós-menopáusicas e que agora caiu um pouco em desuso.

Concluindo, o estudo molecular e genético de todas as vias de sinalização presentes nas células ósseas, nomeadamente os osteoblastos e os osteoclastos, poderão ser alvos surpreendentes na estratégia terapêutica de múltiplas doenças. Tanto nos osteoblastos como nos osteoclastos, necessitam de uma melhor compreensão, ao nível dos mecanismos de diferenciação a partir dos seus precursores, sendo, portanto, extremamente importante para o desenvolvimento de novas terapias/terapêuticas para doenças que ocorrem frequentemente na população mundial.

8. Bibliografia

• Arvidson, K., Abdallah, B. M., Applegate, L. a., Baldini, N., Cenni, E., Gomez-Barrena, E., Kassem, M., Konttinen, Y.T., Mustafa, K., Pioletti, D. P., Sillat, T., Finne-Wistrand, A. (2011). Bone regeneration and stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(4), 718–746.

• Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its Ligand: A New Paradigm for Regulation of Osteoclastogenesis and Bone Resorption. *MedGenMed* 2(2), 2000.

• Baranski, Z., Jong, Y. De, Ilkova, T., Peterse, E. F. P., Water, B. Van De, & Hogendoorn, P. C. W. (2015). Pharmacological inhibition of Bcl-xL sensitizes osteosarcoma to doxorubicin. *Oncotarget* 6(34).

• Boyce, B. F., Yao, Z., & Zhang, Q. (2007). New Roles for Osteoclasts in Bone. *Annals of the New York Academy of Sciences* 254, 245–254.

• Bradley, E. W., Carpio, L. R., van Wijnen, A. J., McGee-Lawrence, M. E., & Westendorf, J. J. (2015). Histone Deacetylases in Bone Development and Skeletal Disorders. *Physiological Reviews*, 95(4), 1359–1381.

• Bronisz, A., Carey, H. A., Godlewski, J., Sif, S., Ostrowski, M. C., & Sharma, S. M. (2014). The Multifunctional Protein Fused in Sarcoma (FUS) Is a Coactivator of Microphthalmia-associated Transcription Factor (MITF). *Journal of Biological Chemistry* , 289 (1), 326–334.

• Carey, H. A., Bronisz, A., Cabrera, J., Hildreth, B. E., Cuitiño, M., Fu, Q., Ahmad, A., Toribio, R. E., Ostrowski, M.C., Sharma, S. M. (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.

• Celil, A. B., & Campbell, P. G. (2005). BMP-2 and Insulin-like Growth Factor-I Mediate Osterix (Osx) Expression in Human Mesenchymal Stem Cells via the MAPK and Protein Kinase D Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* , 280 (36), 31353–31359.

• Chen, W., Yang, S., Abe, Y., Li, M., Wang, Y., Shao, J., ... Li, Y.-P. (2007). Novel pycnodysostosis mouse model uncovers cathepsin K function as a potential

regulator of osteoclast apoptosis and senescence. *Human Molecular Genetics*, 16(4), 410–423.

• Cho, S. W., Pirihi, F. Q., Koh, A. J., Michalski, M., Eber, M. R., Ritchie, K., ... Mccauley, L. K. (2013). The Soluble Interleukin-6 Receptor Is a Mediator of Hematopoietic and Skeletal Actions of Parathyroid, 288(10), 6814–6825.

• Courtial, N., Mücke, C., Herkt, S., Kolodziej, S., Hussong, H., & Lausen, J. (2013). The T-cell oncogene Tal2 Is a Target of PU.1 and upregulated during osteoclastogenesis. *PloS One*, 8(9), e76637.

• Darnell, H., Lodish, H., Berk, A., Krieger, M., Ploegh, H., Scott, M. P., Kaiser, C. A., Bretscher, A., Amon, A. (2013). *Molecular Cell Biology 7ª edição*. WHFreeman and Company.

• Dos Santos, J.M.; Cavacas, A.; Silva, A. J. S.; Zagalo, C.; Evangelista, J. G.; Oliveira, P.; Tavares, V. (2009), *Anatomia Geral 5ª edição*. Egas Moniz Publicações.

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

• Dionyssiotis, P. Y. (2015). Genetic Disorders Associated With Osteoporosis. In *Advances in Osteoporosis* (1st ed., Vol. 1, p. 174). InTech.

• Estrogen, L. (2015). Osteoprotegerin and its Ligand : A New Paradigm for Regulation of Osteoclastogenesis and Bone Resorption, 1–12.

• Everts, V., Korper, W., Hoeben, K. A., Jansen, I. D. C., Bromme, D., Cleutjens, K. B. J. M., ... Beertsen, W. (2006). Osteoclastic Bone Degradation and the Role of Different Cysteine Proteinases and Matrix Metalloproteinases: Differences Between Calvaria and Long Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(9), 1399–1408.

• Faccio, R., Teitelbaum, S. L., Fujikawa, K., Chappel, J., Zallone, A., Tybulewicz, V. L., ... Swat, W. (2005). Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat Med*, 11(3), 284–290.

• Ferraro, J. P. (2006) - Tecido ósseo (2015, 15 de Outubro), retirado de https://pt.wikipedia.org/wiki/Tecido_ósseo

- Furtado, C., & Gaspar, M. (2010). Observatório do Medicamento e Produtos de Saúde Direcção de Economia do Medicamento e Produtos de Saúde Análise da Evolução da Utilização de Psicofármacos em Portugal Continental entre 2000 e 2009. *Infarmed*.
- Goto, T., Yamaza, T., & Tanaka, T. (2003). Cathepsins in the osteoclast. *Journal of Electron Microscopy*, 52(6), 551–558.
- Hanauer, A., & Young, I. D. (2002). Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features. *Journal of Medical Genetics*, 39(10), 705–713.
- Hartmann, C. (2009). Transcriptional networks controlling skeletal development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(5), 437–443.
- Horne, W. C., Sanjay, A., Bruzzaniti, A., & Baron, R. (2005). The role(s) of Src kinase and Cbl proteins in the regulation of osteoclast differentiation and function. *Immunological Reviews*, 208(1), 106–125.
- Jeong, S.-J., Pise-Masison, C. A., Radonovich, M. F., Park, H. U., & Brady, J. N. (2005). A Novel NF- κ B Pathway Involving IKK β and p65/RelA Ser-536 Phosphorylation Results in p53 Inhibition in the Absence of NF- κ B Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10326–10332.
- Jochmann, K., Bachvarova, V., & Vortkamp, A. (2014). Reprint of: Heparan sulfate as a regulator of endochondral ossification and osteochondroma development. *Matrix Biology*, 35, 239–247.
- Kanatani, N., Fujita, T., Fukuyama, R., Liu, W., Yoshida, C. A., Moriishi, T., ... Komori, T. (2006). Cbfb regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development. *Developmental Biology*, 296(1), 48–61.
- Kawai, M., Mödder, U. I., Khosla, S., & Rosen, C. J. (2011). Emerging therapeutic opportunities for skeletal restoration. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(2), 141–156.
- Kerschnitzki, M., Kollmannsberger, A. P., Burghammer, A. M., Duda, G. N., Weinkamer, R., Wagermaier, W., & Fratzl, P. (2013). J BMR Architecture of the Osteocyte Network Correlates With Bone Material Quality, 28(8), 1837–1845.
- Kobayashi, I., Kiyoshima, T., Wada, H., Matsuo, K., Nonaka, K., Honda, J.

Y., Kiyoshi, K., Sakai, H. (2006). Type II/III Runx2/Cbfa1 is required for tooth germ development. *Bone*, 38(6), 836–844.

- Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrughe, B., Nakashima, K., & Takayanagi, H. (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med*, 11(8), 880–885.

- Kronenberg, H. M. (2004). Twist Genes Regulate Runx2 and Bone Formation. *Developmental Cell*, 6(3), 317–318.

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

- Kumarasinghe, D. D., Sullivan, T., Kuliwaba, J. S., Fazzalari, N. L., & Atkins, G. J. (2015). Evidence for the dysregulated expression of TWIST1, TGFβ1 and SMAD3 in differentiating osteoblasts from primary hip osteoarthritis patients. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(11), 1357–1366.

- Kwon, Dong-Jin, The Genetics of Osteoporosis. *Journal of Women's Medicine*, 2(1), Março, 2009.

- Lai, X., Price, C., Modla, S., Thompson, W. R., Caplan, J., Kirn-safran, C. B., & Wang, L. (2015). The dependences of osteocyte network on bone compartment , age , and disease, (November 2014).

- Lee, K., Kim, H., Park, H. S., Kim, K., Song, H., Shin, H., & Kim, H. (2015). Targeting of the Osteoclastogenic RANKL – RANK Axis Prevents Osteoporotic Bone Loss and Soft Tissue Calcification in C oxsackievirus B3 – Infected Mice.

- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., ... Karsenty, G. (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 130(3), 456–469.

- Leite-Moreira, A., & Santos-Araújo, C. (2006). *Metabolismo ósseo e equilíbrio fosfocálcio*.

- Li, Y., & Xiao, Z. (2007). Advances in Runx2 regulation and its isoforms. *Medical Hypotheses*, 68(1), 169–175.

- Li, Y.-L., & Xiao, Z.-S. (2007). Advances in Runx2 regulation and its

isoforms. *Medical Hypotheses*, 68(1), 169–75.

• Liedert, A., Kaspar, D., Blakytyn, R., Claes, L., & Ignatius, A. (2006). Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(1), 1–5.

• Lookforadiagnosis, (2014). Diferenciação de osteoclastos. (2015, 3 de Outubro), retirado de http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Monocyte-Macrophage+Precursor+Cells&lang=5

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

• Makita, N., Suzuki, M., Asami, S., Takahata, R., Kohzaki, D., Kobayashi, S., Takashi, H., Hozumi, N. (2008). Two of four alternatively spliced isoforms of RUNX2 control osteocalcin gene expression in human osteoblast cells. *Gene*, 413(1-2), 8–17.

• Mandal, C. C., Das, F., Ganapathy, S., Harris, S. E., Ghosh Choudhury, G., & Ghosh-Choudhury, N. (2015). BMP-2 Activates NFATc1 via an Autoregulatory Loop Involving Smad/Akt/Ca²⁺ Signaling. *Journal of Biological Chemistry* .

• Marie, P. J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 98–105. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.030>

• Mohammadi, Z., Fayyazbakhsh, F., Ebrahimi, M., Amoli, M. M., Khashayar, P., Dini, M., ... Barikani, H. (2014). Association between vitamin D receptor gene polymorphisms (Fok1 and Bsm1) and osteoporosis: a systematic review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 13(1), 98.

• Nogueira, Rodrigo (2011)- Histologia Animal, (2015, 18 de Outubro) retirado de <http://pt.slideshare.net/arvoredenoz/histologia-animal-9012496>

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

- Park, S. E., Oh, K. W., Lee, W. Y., Baek, K. H., Yoon, K. H., Son, H. Y., Lee, W. C., Kang, M. Il. (2014). Association of osteoporosis susceptibility genes with bone mineral density and bone metabolism related markers in Koreans : The Chungju Metabolic Disease Cohort (CMC) study, *61*(11), 1069–1078.
- Piters, E., Boudin, E., & Van Hul, W. (2008). Wnt signaling: a win for bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *473*(2), 112–6.
- Ralston, S. H. (2010). Genetics of osteoporosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1192*(1), 181–189.
- Rubin, J., Rubin, C., & Rae, C. (2006). Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone, *367*, 1–16.
- 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. M., Lee, M. H., & Kim, Y. J. (2006). Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, *366*(1), 51–57.
- Ryoo, H.-M., Lee, M.-H., & Kim, Y.-J. (2006). Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, *366*(1), 51–7.
- Direcção Geral de Saúde. Circular Informativa nº 12/DSCS/DPCD/DSQC (2008).
- Schaffler, D. M. B., Cheung, D. W.-Y., Majeska, D. R., & Kennedy, D. O. (2015). Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. *Changes*, *29*(6), 997–1003.
- Schwartz, C., Willebrand, R., Huber, S., Rupec, R. A., Wu, D., Locksley, R., & Voehringer, D. (2015). Eosinophil-specific deletion of I κ B α in mice reveals a critical role of NF- κ B–induced Bcl-xL for inhibition of apoptosis. *Blood*, *125*(25), 3896–3904.
- Shekaran, A., Shoemaker, J. T., Kavanaugh, T. E., Lin, A. S., LaPlaca, M. C., Fan, Y., Guldberg, R. E., García, A. J. (2015). The effect of conditional inactivation of beta 1 integrins using twist 2 Cre, Osterix Cre and osteocalcin Cre lines on skeletal

phenotype. *Bone*, 68, 131–141.

• Singh, V. A., Haseeb, A., & Alkubaisi, A. A. H. A. (2014). Incidence and outcome of bone metastatic disease at University Malaya Medical Centre. *Singapore Medical Journal*, 55(10), 539–546.

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

• Takayanagi, H. (2007). The Role of NFAT in Osteoclast Formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116(1), 227–237.

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

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

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

• Vidal, C. (2007). The genetics of osteoporosis (Tese de douturamento). Universidade de Malta, Malta.

• Viveiro, J. (2008). Tratamento da osteoporose. *Ordem Dos Farmacêuticos*, 5-6. (2015, 9 de Novembro), em www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/doc6254.pdf

• Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N., Penninger, J. M. (2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Molecular Medicine*, 12(1), 17-25.

• Wu, S., Liu, Y., Zhang, L., Han, Y., Lin, Y., & Deng, H.-W. (2013). Genome-wide approaches for identifying genetic risk factors for osteoporosis. *Genome Medicine*, 5(5), 44.

• Yue, J., Ben Messaoud, N., & López, J. M. (2015). Hyperosmotic Shock Engages Two Positive Feedback Loops Through Caspase-3 Dependent Proteolysis of JNK1-2 and Bid. *Journal of Biological Chemistry* .

- Zhao, H., Feng, J., Ho, T.-V., Grimes, W., Urata, M., & Chai, Y. (2015). The suture provides a niche for mesenchymal stem cells of craniofacial bones. *Nature Cell Biology*, 17(4), 386–396.
- Ziros, P. G., Basdra, E. K., & Papavassiliou, A. G. (2008). Runx2: of bone and stretch. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(9), 1659–1663.