



TECIDO ÓSSEO

curso • **Histologia**

• TECIDO ÓSSEO

O osso consiste em uma forma especializada de tecido conjuntivo que consiste em células e em matriz extracelular mineralizada, que garante a rigidez do tecido que proporciona suporte e proteção. O mineral encontrado no osso é o fosfato de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita.

Devido à presença de minerais em sua composição, o osso também serve como local de armazenamento de cálcio e fosfato, que podem ser mobilizados da matriz óssea e captados pelo sangue para garantir a manutenção da homeostasia.

O principal componente estrutural da matriz óssea é o colágeno do tipo I, mas também se encontra o colágeno do tipo V. Outros tipos de colágeno, em menor quantidade, também podem ser encontrados, como o III, o XI e o XIII. Todas as moléculas de colágeno formam cerca de 90% do peso total das proteínas da matriz óssea. O colágeno e a substância fundamental se tornam mineralizados para formar o tecido ósseo.

A matriz óssea também contém outras proteínas não colágenas que são essenciais para o desenvolvimento, o crescimento, a remodelação e o reparo ósseos. Elas representam 10% do peso total das proteínas da matriz que constituem a substância fundamental do osso.

Os quatro grupos principais de proteínas não colágenas da matriz óssea são as macromoléculas de proteoglicanos, as glicoproteínas multiadesivas, as proteínas dependentes de vitamina K específicas do osso, os fatores de crescimento e as citocinas.

As macromoléculas de proteoglicanos apresentam uma proteína central, na qual as cadeias laterais dos glicosaminoglicanos, como o ácido hialurônico, o condroitim sulfato e o queratam sulfato, se ligam covalentemente. Essas moléculas, além de garantirem a força compressiva do osso, também se ligam à fatores de crescimento e inibem a mineralização.



As glicoproteínas multiadesivas garantem a fixação das células ósseas e das fibras colágenas à substância fundamental mineralizada. As principais glicoproteínas são a osteonectina, que atua como uma cola entre o colágeno e os cristais de hidroxapatita; a podoplanina (E11), produzida pelos osteócitos devido ao estresse mecânico; a proteína da matriz da dentina (DMP), muito importante para a mineralização da matriz óssea; e as sialoproteínas, como a osteopontina (BSP-1), que atua na fixação das células à matriz óssea, e a BSP-2, que atua na fixação das células e inicia a formação de fosfato de cálcio durante a mineralização.

As proteínas dependentes de vitamina K específicas do osso são a osteocalcina, que possui a função de capturar o cálcio da circulação e estimular os osteoclastos durante a remodelação do osso; a proteína S, que auxilia na remoção das células que sofrem apoptose; e a proteína Gla da matriz (MGP), que atua nas calcificações vasculares.

Os fatores de crescimento e as citocinas, pequenas proteínas reguladoras, consistem nos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), no fator de necrose tumoral α (TNF- α), no fator transformador do crescimento β (TGF- β), nos fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF), nas proteínas morfogênicas do osso (BMPs), na esclerostina (antagonista das BMP) e nas interleucinas (IL-1, IL-6).

Dentro da matriz óssea, pode-se encontrar espaços denominados lacunas, que possuem, cada um, uma célula óssea ou osteócito. Além disso, eles apresentam prolongamentos alojados em pequenos túneis, chamados canalículos. Os canalículos se distribuem ao longo da matriz mineralizada, conectando as lacunas e permitindo, através de junções comunicantes, a comunicação entre os prolongamentos celulares de osteócitos vizinhos.

Além dos osteócitos, há outros quatro tipos de células associadas ao osso: as células osteoprogenitoras, os osteoblastos, as células de revestimento ósseo e os osteoclastos.



As células osteoprogenitoras derivam das células-tronco mesenquimatosas e originam os osteoblastos, que são células que secretam a matriz extracelular do osso e que, quando está envolto pela sua matriz secretada, é denominado osteócito. As células de revestimento ósseo se originam dos osteoblastos que permanecem no tecido após a deposição óssea e consistem em células que estão presentes na superfície óssea quando não há crescimento ativo.

Os osteoclastos são células que realizam reabsorção óssea e são encontradas nas superfícies ósseas onde o osso está sendo removido, remodelado ou onde foi danificado. Os osteoclastos são células fagocíticas derivadas da fusão de células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea, que originam as linhagens de granulócitos neutrófilos e monócitos.

• ESTRUTURA GERAL DOS OSSOS

1) Osso como órgão

Os ossos podem ser considerados os órgãos do sistema esquelético, sendo o tecido ósseo o componente estrutural dos ossos. Um osso é formado por tecido ósseo e outros tecidos conjuntivos, como o tecido hematopoiético, tecido adiposo, vasos sanguíneos e nervos.

Quando o osso forma uma articulação móvel, como a articulação sinovial, também se verifica a existência de cartilagem hialina. A capacidade do osso de desempenhar suas funções é devida ao tecido ósseo, aos ligamentos e à cartilagem articular, quando presente.

O tecido ósseo pode ser classificado em compacto (denso) ou esponjoso (trabecular). Quando um osso é cortado, são vistos dois arranjos estruturais distintos: uma camada densa e compacta forma a parte externa do osso (osso compacto) e uma rede semelhante a uma esponja, que consiste em trabéculas forma o interior do osso (osso esponjoso). Os espaços dentro desta rede são ocupados pela medula óssea e por vasos sanguíneos, no osso vivo.



A localização do osso esponjoso e do osso compacto varia de acordo com o formato do osso. Os tecidos ósseos esponjoso e compacto são encontrados em partes específicas dos ossos. Com base no seu formato, os ossos podem ser classificados em: ossos longos, ossos curtos, ossos planos e ossos irregulares.

Os ossos longos são mais longos em uma dimensão em comparação com os outros ossos, e possuem uma diáfise e duas extremidades denominadas epífises. Exemplos de ossos longos são a tíbia e os ossos metacarpais.

Os ossos curtos apresentam um comprimento e diâmetro quase iguais, como os ossos carpais. Os ossos planos são finos e semelhantes a placas, como os ossos da calvária e o esterno. Os ossos irregulares apresentam um formato que pode ser complexo, como uma vértebra, ou o osso pode conter espaços aéreos ou seios, como o etmoide.

Os ossos longos possuem um corpo, chamado de diáfise, e duas extremidades, cada uma denominada epífise, as quais apresentam uma superfície articular coberta com cartilagem hialina. A porção entre a diáfise e a epífise é denominada metáfise. Dentro do osso, há uma grande cavidade ocupada pela medula óssea. Na região da diáfise, quase toda a espessura do tecido ósseo é compacto e nas extremidades do osso, o osso esponjoso é predominante.

Os ossos curtos possuem uma camada de osso compacto, osso esponjoso e um espaço medular no seu interior. Os ossos curtos geralmente possuem articulações móveis com suas superfícies articulares são cobertas com cartilagem hialina. O perióstio, uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, cobre a superfície externa do osso.

2) Superfície externa dos ossos

Os ossos são cobertos por perióstio, que consiste em uma bainha de tecido conjuntivo denso fibroso que possui células osteoprogenitoras, exceto nas áreas onde há articulações, pois estas são cobertas por cartilagem.



O perióstio que cobre um osso em crescimento ativo apresenta uma camada fibrosa externa e em uma camada interna que contém as células osteoprogenitoras. Quando não há formação ativa de osso, a camada fibrosa constitui o principal componente do perióstio. Porém, as células periosteais, presentes em pequena quantidade, podem se transformar em osteoblastos a partir de determinados estímulos.

O perióstio é diferente nos locais em que os ligamentos e tendões se inserem ao osso. As fibras colágenas dessas estruturas se dispõem obliquamente ou em ângulos retos ao osso, onde são contínuas com as fibras colágenas da matriz extracelular, sendo denominadas fibras perfurantes ou de Sharpey.

3) Cavidades ósseas

O tecido de revestimento do osso compacto para a cavidade medular e das trabéculas do osso esponjoso dentro da cavidade é chamado de endóstio. Geralmente, o endóstio é composto por apenas uma camada celular e consiste em células osteoprogenitoras e em células de revestimento ósseo.

A cavidade medular e os espaços no osso esponjoso possuem medula óssea. A medula óssea vermelha consiste em células sanguíneas e em uma rede de células reticulares e fibras que servem de estrutura para as células sanguíneas e os vasos em desenvolvimento.

• TIPOS DE TECIDO ÓSSEO

1) Osso maduro

O osso maduro é composto principalmente de unidades cilíndrica denominadas ósteons ou sistemas de Havers. Os ósteons consistem em lamelas concêntricas de matriz óssea que circundam um canal central, o canal de Havers, que abriga o suprimento vascular e nervoso do ósteon.



Os canalículos que apresentam os prolongamentos dos osteócitos geralmente estão dispostos radialmente ao canal e servem de passagem para as substâncias entre os osteócitos e os vasos sanguíneos. Entre os ósteons podem ser encontrados remanescentes de lamelas concêntricas prévias, denominadas lamelas intermediárias, por isso, o osso maduro também pode ser denominado osso lamelar.

Os canais de Volkmann, ou canais perfurantes, conectam os canais de Havers entre si e localizam-se no osso lamelar apresentando um percurso transversal em relação ao longo eixo do osso, através dos quais os vasos sanguíneos e os nervos seguem o seu trajeto para alcançar o canal de Havers. Além disso, os canais de Volkmann não são circundados por lamelas concêntricas, uma característica essencial para a sua identificação histológica.

O osso esponjoso maduro possui uma estrutura semelhante ao osso compacto maduro, com exceção do fato de o tecido estar disposto como trabéculas ou espículas. As artérias que entram na cavidade medular através dos forames nutritivos fornecem sangue à diáfise dos ossos longos.

O sangue que nutre o tecido ósseo se move da cavidade medular dentro e através do tecido ósseo e para fora através das veias periosteais. Por conseguinte, o fluxo ocorre em direção centrífuga. Quanto à nutrição do próprio tecido ósseo, os canais de Volkmann fornecem a principal via de entrada para os vasos que atravessam o osso compacto. O tecido ósseo não possui muitos vasos linfáticos e a drenagem linfática ocorre somente a partir do periósteo.

2) Osso imaturo

O tecido ósseo formado no feto em desenvolvimento é denominado osso imaturo, que é diferente do osso maduro por diversas razões. O osso imaturo não apresenta uma organização lamelar, também denominado osso primário ou osso trabecular, em virtude do arranjo não bem organizado das fibras colágenas.



O osso imaturo também contém um número relativamente maior de células por unidade de área do que o osso maduro, que possuem uma disposição aleatória.

A matriz do osso imaturo possui mais substância fundamental que a matriz do osso maduro. Além disso, o osso imaturo não é completamente mineralizado durante sua formação, enquanto o osso maduro sofre mineralização secundária prolongada.

Apesar do osso imaturo ser característico do feto, pode-se encontrar regiões de osso imaturo nas bolsas alveolares da cavidade oral do adulto e nos locais em que os tendões se inserem nos ossos.

• CÉLULAS DO TECIDO ÓSSEO

1) Células osteoprogenitoras

A osteogênese, ou seja, processo de formação de osso, é essencial para a função óssea normal e necessita de uma população de células osteoprogenitoras passíveis de renovação, que respondem à estímulos moleculares que as transformam em células formadoras de osso.

As células osteoprogenitoras se originam das células-tronco mesenquimatosas na medula óssea. O fator que induz a diferenciação das células osteoprogenitoras é o fator de ligação central alfa-1 (CBFA-1) ou o fator de transcrição relacionado com 2 (RUNX-2). Essa proteína leva à expressão de genes, como o IGF-1 e o IGF-2, que estimulam a proliferação das células osteoprogenitoras e a sua diferenciação em osteoblastos.

As células osteoprogenitoras são encontradas nas superfícies externa e interna dos ossos e na microvascularização que supre o osso. Nos ossos em crescimento, elas aparecem como células planas ou escamosas, com núcleos alongados ou ovoides, levemente corados, e citoplasma acidófilo ou ligeiramente basófilo imperceptível.



2) Osteoblastos

O osteoblasto consiste em uma célula formadora de osso diferenciada e que secreta a matriz óssea, ou seja, tanto colágeno do tipo I, quanto outras proteínas da matriz óssea.

As proteínas da matriz óssea produzidas pelo osteoblasto incluem as proteínas de ligação do cálcio (osteocalcina e osteonectina), glicoproteínas multiadesivas, como as sialoproteínas ósseas, trombospondinas, vários proteoglicanos e fosfatase alcalina (ALP). Os níveis circulantes de ALP e de osteocalcina são usados como marcadores da atividade osteoblástica.

O osteoblasto também é responsável pela calcificação da matriz óssea, que é iniciada através da secreção de pequenas vesículas da matriz contendo ALP durante o período em que a célula produz a matriz óssea.

Os osteoblastos são reconhecidos ao microscópio óptico pelo seu formato cuboide ou poligonal e pela sua agregação em uma única camada de células situada sobre o osso em formação. O citoplasma do osteoblasto é basófilo e, devido ao seu tamanho, pode-se visualizar o complexo de Golgi como uma área clara adjacente ao núcleo.

Os osteoblastos inativos são células planas que cobrem a superfície óssea e que respondem a estímulos mecânicos para mediar alterações no crescimento e na remodelação óssea. Conforme ocorre a deposição de osteoide, o osteoblasto é circundado por matriz osteoide e se transforma em osteócito. Apenas 10 a 20% dos osteoblastos se diferenciam em osteócitos, sendo que a maioria sofre apoptose.



3) Osteócitos

O osteócito consiste na célula óssea madura envolta pela matriz óssea previamente secretada pelo osteoblasto. Quando totalmente circundado por osteoide ou matriz óssea, o osteoblasto é denominado osteócito. Esse processo de maturação do osteoblasto em osteócito leva aproximadamente 3 dias.

Após a mineralização da matriz óssea, cada osteócito ocupa uma lacuna. Além disso, seus prolongamentos citoplasmáticos se alojam no interior de canalículos dentro da matriz e se comunicam com prolongamentos de osteócitos vizinhos e células de revestimento ósseo através de junções comunicantes.

Os osteócitos também são capazes de se comunicar indiretamente com osteoblastos distantes, células endoteliais da vascularização da medula óssea, pericitos dos vasos sanguíneos e outras células, através da expressão de várias moléculas sinalizadoras, como óxido nítrico e transportadores de glutamato.

Microscopicamente, em cortes corados pela hematoxilina e eosina (H&E), os canalículos e seus prolongamentos não são discerníveis, ao contrário de preparos com ossos desgastados, nos quais os canalículos são facilmente visualizados. Além disso, os osteócitos são menores suas células precursoras pela redução de seu citoplasma perinuclear e apresentem menor basofilia citoplasmática que os osteoblastos.

Os osteócitos são células metabolicamente ativas e multifuncionais, que respondem a forças mecânicas aplicadas ao osso. A diminuição dos estímulos mecânicos, como em casos de imobilização, fraqueza muscular e ausência de gravidade no espaço, provoca perda óssea, enquanto o aumento dos estímulos mecânicos promove formação óssea.

As forças mecânicas aplicadas sobre osso, como durante uma caminhada, provocam um fluxo de líquido intersticial para fora dos canalículos e lacunas do osso, o que gera um potencial elétrico transitório, que abre os canais de cálcio regulados por voltagem dos osteócitos, que, associado à outros fatores, alteram



a expressão dos genes responsáveis pela formação óssea.

O estresse de cisalhamento do fluxo de líquido também induz a abertura de hemicanais, que liberam moléculas intracelulares no espaço extracelular dos canalículos. Além disso, a expressão do gene do IGF-1 resulta promove a conversão das células osteoprogenitoras em osteoblastos, causando o depósito de osso novo em regiões estressadas.

O osteócito responde a uma redução do estresse mecânico pela secreção de metaloproteinases da matriz (MMPs), que geram um espaço vazio ao redor dos osteócitos devido à sua ação de degradação enzimática da matriz óssea.

O aumento do estresse mecânico ativa mecanismos moleculares dos osteócitos responsáveis pela remodelação reversível de sua matriz óssea pericanalicular e perilacunar, um processo denominado remodelação osteocítica.

Os osteócitos exibem diferentes estados funcionais durante a remodelação osteocítica de seu microambiente perilacunar e pericanalicular: os osteócitos quiescentes, os osteócitos formadores e os osteócitos de reabsorção.

Os osteócitos quiescentes apresentam escassez de RER e acentuada redução do complexo de Golgi. Os osteócitos formadores apresentam evidências de deposição da matriz e RER e o complexo de Golgi abundantes. Os osteócitos de reabsorção, também contém um RER e um complexo de Golgi desenvolvidos e lisossomos evidentes.

A degradação do osso por MMP secretadas pelos osteócitos era previamente denominada osteólise osteocítica. Atualmente, define-se a remodelação osteocítica como a atuação lítica dos osteócitos pela manutenção da homeostasia dos íons cálcio e fosfato.

Os osteócitos são células de vida longa, em torno de 10 a 20 anos, e a sua morte pode ser atribuída ao processo de apoptose, degeneração/necrose, senescência ou atividade de remodelação óssea dos osteoclastos.



• CÉLULAS DE REVESTIMENTO ÓSSEO

As células de revestimento ósseo se originam de osteoblastos e podem ser encontradas no osso que não está se remodelando. Nesses locais, há uma camada de células de revestimento ósseo, que são células planas, com citoplasma atenuado e escassez de organelas além da região perinuclear.

Quando presentes nas superfícies ósseas externas, as células de revestimento ósseo são denominadas células periosteais, e quando presentes nas superfícies ósseas internas são denominadas células endosteais.

Estudos sugerem que as células de revestimento ósseo atuam na manutenção e no suporte nutricional dos osteócitos da matriz óssea subjacente e na regulação do movimento de cálcio e de fosfato no osso.

Isso se baseia no fato de que os prolongamentos celulares destas células se estendem para dentro dos canais canaliculares do osso adjacente e têm contato por meio de junções comunicantes com prolongamentos dos osteócitos.

Osteoclastos

Os osteoclastos consistem em células grandes e multinucleadas encontradas em locais onde o osso está sendo removido. Devido à atividade do osteoclasto, uma cavidade denominada cavidade de reabsorção (lacuna de Howship), pode ser encontrada no osso subjacente ao osteoclasto.

Os osteoclastos apresentam uma forte reação histoquímica para a fosfatase ácida devido à presença de numerosos lisossomos em suas células. Inclusive, utiliza-se a fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) como marcador de atividade e diferenciação dos osteoclastos.

As células osteoclásticas se originam da fusão de células hematopoéticas mononucleares, principalmente células progenitoras de granulócitos /macrófagos (GMP/CFU-GM).



No começo da diferenciação, as células precursoras dos osteoclastos expressam dois fatores de transcrição importantes, c-fos e NF- κ B. Em seguida, um receptor denominado ativador do receptor do fator nuclear κ B (RANK) é expresso na superfície da célula.

Esse receptor interage com a molécula ligante do RANK (RANKL) produzida e expressa na superfície da célula do estroma da medula óssea. Esse mecanismo é essencial para a diferenciação e a maturação dos osteoclastos.

Além disso, em situações de inflamação, os linfócitos T ativados são capazes de secretar moléculas de RANK, podendo estimular a reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Esse mecanismo pode ser inibido por osteoprotegerina (OPG), que atua sequestrando o RANKL, dessa forma, a ausência dessa molécula é um potente inibidor da formação de osteoclastos.

A OPG é produzida principalmente pelos osteoblastos e é regulada por reguladores metabólicos ósseos, como IL-1, TNF, TGF- β e vitamina D. A PGE2 é secretada pelos osteócitos em situações de estresse e estimula a produção de RANKL, porém, os osteoblastos ativos na região de deposição óssea produzem OPG, que inativa a RANKL. Por isso, em regiões em que os osteoblastos depositam osso novo terão pouca ou nenhuma atividade osteoclástica.

Quando ativados, os osteoclastos exibem três regiões especializadas: a borda pregueada, a zona clara e a região basolateral.

A borda pregueada consiste na parte da célula que está em contato direto com o osso e apresenta pregas profundas da membrana plasmática que realizam a exocitose de enzimas hidrolíticas e prótons, além da endocitose dos produtos de degradação e resíduos ósseos.

A zona clara (zona de vedação) consiste em um perímetro anelar de citoplasma adjacente à borda pregueada, que demarca a área óssea a ser absorvida. Essa área apresenta grandes quantidades de filamentos de actina e outras organe-



las.

A região basolateral atua na exocitose do material digerido a partir das vesículas de transporte com material ósseo degradado que sofrem endocitose na borda pregueada se fundem com a membrana celular para liberar o seu conteúdo.

A maioria das vesículas no osteoclasto consiste em lisossomos com enzimas hidrolíticas, como a catepsina K (uma cisteína protease) e as metaloproteinases da matriz, que degradam o colágeno e outras proteínas da matriz óssea.

Porém, antes de ocorrer a digestão, a matriz óssea precisa ser descalcificada por meio da acidificação da superfície óssea, que degrada o componente mineral do osso (principalmente hidroxapatita) em íons cálcio, fosfatos inorgânicos solúveis e água.

Para realizar esse processo, o citoplasma do osteoclasto possui anidrase carbônica II, que produz ácido carbônico (H_2CO_3) a partir de dióxido de carbono e água. Assim, o ácido carbônico se dissocia em bicarbonato (HCO_3^-) e um próton (H^+). A partir de bombas de prótons dependentes de ATP, os prótons são transportados pela borda pregueada, produzindo um pH baixo na cavidade de reabsorção.

O paratormônio (PTH), secretado pelas paratireoides, é o regulador mais importante dos níveis de cálcio e de fosfato no líquido extracelular. Os osteócitos, os osteoblastos e os linfócitos T apresentam receptores de PTH que ativam a adenil-ciclase, aumentando os níveis intracelulares de cAMP (cAMP).

Uma exposição intermitente ao PTH aumenta a massa óssea através do monofosfato de adenosina cíclico cAMP/IGF-1 nos osteócitos e osteoblastos. Porém, uma exposição prolongada ao PTH aumenta a produção de RANKL pelos linfócitos T e osteoblastos, aumentando a atividade osteoclástica e consequente osteoporose. O estrogênio suprime a produção de RANKL e a calcitonina, secretada pelas células parafoliculares da glândula, reduz a atividade osteoclástica.



ca.

A deficiência das moléculas que regulam a atividade osteoclástica causa osteopetrose, uma doença congênita rara que causa o aumento da densidade óssea e deficiência da função osteoclástica. Apesar disso, os ossos são frágeis e sofrem fratura com facilidade.

• FORMAÇÃO ÓSSEA

O desenvolvimento de um osso é classificado em endocondral e intramembranoso baseado se há um modelo de cartilagem precursor do osso (ossificação endocondral) ou não (ossificação intramembranosa).

Os ossos dos membros e as partes do esqueleto axial que sustentam o peso, como as vértebras, desenvolvem-se por ossificação endocondral. Os ossos planos do crânio e da face, a mandíbula e a clavícula desenvolvem-se por ossificação intramembranosa.

Essa classificação se refere apenas ao mecanismo pelo qual o osso é inicialmente formado, pois, através da remodelação que ocorre posteriormente, o tecido ósseo inicialmente depositado é substituído.

1) Ossificação intramembranosa

Nos humanos, o início da ossificação intramembranosa ocorre em torno da oitava semana de gestação dentro do mesênquima a partir da condensação de células mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos em regiões específicas, formando centros de ossificação.

Nos centros de ossificação, as células mesenquimais se alongam e se diferenciam em células osteoprogenitoras, que expressam o fator de transcrição CBFA1, essencial para diferenciação dos osteoblastos. Após formados, os osteoblastos secretam moléculas colágenas, sialoproteínas ósseas, osteocalcina e outros componentes da matriz óssea (osteóide). Em seguida, o osteóide sofre minerali-



zação e os osteoblastos da matriz óssea se diferenciam em osteócitos.

Na matriz óssea, os osteócitos se afastam- conforme ocorre a deposição da matriz, mas permanecem unidos por prolongamentos citoplasmáticos. Assim, a matriz se mineraliza e os prolongamentos citoplasmáticos interconectados dos osteócitos ficam dentro dos canalículos.

A matriz óssea aparece em cortes histológicos como pequenas espículas e trabéculas de formato irregular, características do osso esponjoso. As células osteoprogenitoras que estão sobre as espículas ósseas vão se diferenciando em osteoblastos, que acrescentam matriz ao tecido ósseo em formação, dando origem ao tecido ósseo imaturo do osso não lamelar.

Através desse processo, chamado de crescimento aposicional, as espículas aumentam em número e em espessura e se unem em uma rede trabecular que vai construindo o formato do osso em desenvolvimento.

O osso imaturo apresenta em seu interior uma rede de espaços interconectados ocupados por tecido conjuntivo e por vasos sanguíneos. O crescimento adicional e a remodelação resultam em substituição do osso não lamelar por osso compacto na periferia e por osso esponjoso no centro do osso recém-formado. Os espaços entre as trabéculas ficam ocupados por células da medula óssea transportadas por vasos sanguíneos.

2) Ossificação endocondral

A ossificação endocondral se inicia a partir da proliferação e agregação das células mesenquimatosas nos locais de ossificação. Com a influência dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF) e das proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), as células mesenquimatosas se diferenciam em condroblastos, expressam colágeno do tipo II e a produzem matriz cartilaginosa.



Assim, há a formação de um modelo de cartilagem hialina com o formato do osso, que se desenvolve- por crescimento intersticial e aposicional. O aumento no comprimento do modelo de cartilagem é atribuído ao crescimento intersticial. O aumento de sua largura é causado principalmente pela adição de matriz cartilaginosa produzida pelos condrócitos que se diferenciam a partir da camada condrogênica do pericôndrio que circunda a massa cartilaginosa.

A ossificação se inicia com o aparecimento de um colar ósseo ao redor do modelo de cartilagem. Nessa fase, as células pericondrais na região mediana do modelo não mais originam condrócitos, mas sim osteoblastos. Assim, o tecido conjuntivo que circunda essa porção da cartilagem não é mais um pericôndrio, mas sim um periósteo. Além disso, com a presença dos osteoblastos, forma-se uma camada osteogênica dentro do periósteo.

Em ossos longos, o colar ósseo é formado ao redor do modelo de cartilagem na porção diafisária do osso em desenvolvimento. Conforme os condrócitos se hipertrofiam, ocorre a reabsorção da matriz cartilaginosa circundante, formando placas cartilaginosas irregulares e finas entre as células hipertróficas. Assim, essas células começam a sintetizar fosfatase alcalina ao mesmo tempo que a matriz cartilaginosa circundante sofre calcificação.

A matriz cartilaginosa calcificada inibe a difusão de nutrientes, causando a morte dos condrócitos no modelo de cartilagem e a decomposição da matriz, o que gera a formação de uma cavidade cada vez maior, que começa a ser vascularizada por vasos sanguíneos que penetram o colar ósseo diafisário. Além disso, as células-tronco mesenquimatosas também migram para o interior da cavidade nos vasos sanguíneos.

As células-tronco mesenquimatosas migram do periósteo pelos vasos sanguíneos e se diferenciam- em células osteoprogenitoras na cavidade da medula óssea. As células-tronco hemocitopoéticas (HSCs) também chegam na cavidade através da vascularização para formar a medula óssea.



A maioria da massa de cartilagem calcificada sofre degradação e é quase toda removida, exceto uma certa quantidade que permanece na forma de espículas irregulares.

Quando as células osteoprogenitoras chegam à essas espículas de cartilagem calcificada remanescentes, diferenciam-se em osteoblastos e começam a depositar matriz óssea (osteóide) sobre a espícula. Esse local onde o osso começa a se formar na diáfise de um osso longo é denominado centro de ossificação primário.

Essas espículas existem por um curto período até que a cartilagem calcificada seja removida. O componente ósseo remanescente da espícula pode continuar a se desenvolver ou pode sofrer reabsorção concomitantemente com a formação de novas espículas.

A combinação do tecido ósseo e da cartilagem calcificada subjacente é definida como espícula mista. Histologicamente, a cartilagem calcificada tende a ser basófila, enquanto o osso é claramente eosinófilo. Com a coloração de Mallory, o osso se cora em azul-escuro, e a cartilagem calcificada exibe uma coloração azul-claro.

3) Crescimento do osso endocondral

O crescimento do osso endocondral começa no segundo trimestre de vida fetal e continua até o início da vida adulta. Os eventos já descritos consistem no estágio inicial da formação de osso endocondral que ocorre no feto, começando em torno de 12 semanas de gestação.

O crescimento em comprimento dos ossos longos depende da cartilagem epifisária. Conforme a cavidade medular diafisária se expande pode-se notar uma região de cartilagem nas as extremidades da cavidade.



Durante a formação endocondral do osso, a cartilagem avascular é substituída por tecido ósseo vascularizado a partir da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e pela expressão de genes que produzem o colágeno do tipo X e as metaloproteases da matriz.

As zonas na cartilagem epifisária, começando com a zona mais distal ao centro diafisário de ossificação e indo em direção a esse centro, são a zona de cartilagem de reserva, a zona de proliferação, a zona de hipertrofia, a zona de cartilagem calcificada e a zona de reabsorção.

A zona de cartilagem de reserva ou em repouso não possui nenhuma proliferação celular ou produção de matriz. A zona de proliferação é onde as células cartilaginosas, ativas na produção de colágeno e outras proteínas da matriz cartilaginosa, sofrem divisão e se dispõem em colunas.

A zona de hipertrofia apresenta células cartilaginosas aumentadas e metabolicamente ativas, secretando colágeno e VEGF, que induz a invasão vascular.

Na zona de cartilagem calcificada, as células hipertrofiadas começam a se degenerar e a matriz cartilaginosa se calcifica e atua como arcabouço para a deposição de tecido ósseo. Assim, os condrócitos da porção mais proximal dessa zona sofrem apoptose.

A zona de reabsorção consiste na zona mais próxima da diáfise, onde pequenos vasos sanguíneos e células osteoprogenitoras, que irão se diferenciar em osteoblastos, invadem a região antes ocupada pelos condrócitos, formando uma série de alças. A cartilagem calcificada se organiza como espículas longitudinais.



A deposição óssea nas espículas cartilaginosas se dá da mesma forma que para a formação do centro de ossificação inicial. Conforme esse processo ocorre, a cartilagem é reabsorvida, deixando em seu lugar um osso esponjoso primário, que sofre reorganização através da atividade osteoclástica e adição de novo tecido ósseo. Após o nascimento, desenvolvem-se um centro de ossificação secundário na epífise proximal.

Com o desenvolvimento dos centros de ossificação secundários, a única cartilagem que permanece é a cartilagem articular nas extremidades do osso e um disco transversal de cartilagem, conhecido como disco epifisário de crescimento, que limita as cavidades epifisárias e diafisárias e é responsável pela manutenção do processo de crescimento.

Durante o processo de crescimento, a espessura do disco epifisário permanece relativamente constante, a quantidade de nova cartilagem produzida (zona de proliferação) é igual à quantidade reabsorvida (zona de reabsorção) e, naturalmente, a cartilagem reabsorvida é substituída por osso esponjoso.

O alongamento do osso ocorre quando há produção de nova matriz cartilaginosa no disco epifisário, que empurra a epífise, afastando-a da diáfise. Após isso, ocorrem os processos de hipertrofia, calcificação, reabsorção e ossificação, assim como na cartilagem recém-formada.

O osso aumenta em largura ou diâmetro quando ocorre crescimento aposicional de novo osso entre as lamelas corticais e o perióstio. Conforme o osso se alonga, ocorre a remodelação, que consiste na reabsorção de osso em algumas áreas e na deposição em outras.

Quando o indivíduo atinge o crescimento máximo, a proliferação de nova cartilagem no disco epifisário acaba. Nessa fase, as cavidades medulares epifisária e diafisária se tornam confluentes. Esse processo é denominado fechamento epifisário.



4) Desenvolvimento do sistema osteonal de Havers

O osso compacto pode ser formado a partir do osso esponjoso fetal pela deposição de osso sobre as espículas, pode ser depositado diretamente na forma de osso compacto adulto ou pode consistir em osso compacto antigo composto por ósteons e lamelas intermediárias.

O processo pelo qual são formados novos ósteons, chamado remodelação interna, ocorre quando os osteoclastos formam uma cavidade de reabsorção através do osso compacto, semelhante a um túnel, que terá as dimensões do novo ósteon. Em seguida, esse túnel é ocupado por vasos sanguíneos e seu tecido conjuntivo circundante e, paralelamente, inicia-se a deposição de novo osso em sua parede.

O osso adulto compacto contém sistemas de Havers de idade e tamanho variáveis que sofrem mineralização secundária progressiva que continua mesmo após a formação completa do ósteon. Na remodelação interna dinâmica do osso compacto no adulto, geralmente, a deposição está em equilíbrio com a reabsorção, já no idoso, a reabsorção frequentemente excede a deposição, o que gera osteoporose.

• MINERALIZAÇÃO BIOLÓGICA E VESÍCULAS DA MATRIZ

A mineralização biológica consiste em um evento extracelular realizado por células. Esse processo ocorre na matriz extracelular do osso, na cartilagem e na dentina, cimento e esmalte dos dentes. As matrizes de todas essas estruturas, com exceção do esmalte, apresentam fibrilas colágenas e substância fundamental.



A mineralização necessita da secreção de vesículas da matriz dentro da matriz óssea. Nos locais em que a mineralização do osso, da cartilagem, da dentina e do cimento é iniciada, a concentração local de íons Ca^{2+} e PO_4 na matriz necessita passar o nível normal.

A mineralização se dá pela ligação do Ca^{2+} extracelular pela osteocalcina e por outras sialoproteínas, que criam uma concentração local elevada desse íon, que estimula os osteoblastos a secretar fosfatase alcalina (ALP), que aumenta a concentração local de íons PO_4 , que, por fim, estimula um aumento adicional na concentração de Ca^{2+} em que a mineralização será iniciada.

Nesse estágio, os osteoblastos liberam pequenas vesículas da matriz na matriz óssea por exocitose contendo ALP e pirofosfatase, que clivam os íons PO_4 de outras moléculas da matriz, fazendo com que o ponto isoelétrico local aumente e cause a cristalização de CaPO_4 nas vesículas da matriz circundantes.

Esses cristais iniciam a mineralização da matriz pela formação e depósito de cristais de hidroxiapatita na matriz que circunda os osteoblastos. Dessa maneira, a mineralização se expande pelo osteoide.

• ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO OSSO

O osso atua como reservatório para o cálcio corporal, possui grande importância para a saúde e a vida. O cálcio pode ser liberado pela matriz óssea no sangue quando os níveis sanguíneos circulantes de cálcio caem abaixo do nível necessário e, quando está em níveis elevados, o excesso de cálcio no sangue pode ser removido e armazenado no osso.



Esses processos são regulados pelo PTH, secretado pelas células principais das glândulas paratireoides, e pela calcitonina, secretada pelas células parafoliculares da glândula tireoide. O PTH atua sobre o osso para elevar os níveis sanguíneos baixos de cálcio para valores normais. A calcitonina atua sobre o osso para reduzir os níveis sanguíneos elevados de cálcio para a faixa normal.

O PTH estimula tanto os osteócitos quanto os osteoclastos (através das vias de sinalização RANK-RANKL) a reabsorver o osso e liberar o cálcio no sangue. A reabsorção do osso pelos osteócitos ocorre durante a remodelação osteocítica.

O PTH também diminui a excreção renal de cálcio e estimula a absorção do cálcio pelo intestino delgado. Além disso, ele ainda atua para manter a homeostasia, estimulando o rim a excretar o excesso de fosfato produzido pela reabsorção óssea. A calcitonina inibe a reabsorção óssea, ou seja, os efeitos do PTH sobre os osteoclastos.

Como já citado anteriormente, a exposição intermitente ao PTH aumenta a massa óssea através do monofosfato de adenosina cíclico cAMP/IGF-1 nos osteócitos e osteoblastos, mas uma exposição prolongada ao PTH aumenta a produção de RANKL pelos linfócitos T e osteoblastos, aumentando sua atividade osteoclástica.

As células ósseas produzem hormônios endócrinos envolvidos na regulação do metabolismo do fosfato e da glicose, como o fator de crescimento do fibroblasto 23 (FGF-23) e a osteocalcina.

O FGF23, produzido pelos osteócitos, regula os níveis séricos de fosfato por meio de alteração dos níveis de vitamina D ativa e atividade de transportadores de fosfato específicos no rim. A osteocalcina, produzida pelos osteoblastos, está ligada a uma via de regulação da energia e metabolismo da glicose, pois possui como alvo os adipócitos e as células produtoras de insulina no pâncreas.



Esses dois hormônios atuam como hormônios endócrinos clássicos, ou seja, são produzidos exclusivamente no tecido ósseo e atuam em órgãos-alvo distantes através de um mecanismo de retroalimentação regulador.

• **BIOLOGIA DO REPARO ÓSSEO**

O osso pode se reparar após lesão por um processo de consolidação óssea direto (primário) ou indireto (secundário). A consolidação óssea direta ocorre quando o osso fraturado é cirurgicamente estabilizado com placas de compressão, restringindo o movimento por completo entre os fragmentos fraturados de osso. Nesse processo, o osso sofre remodelação interna como a do osso maduro.

A consolidação óssea indireta envolve respostas do periósteo e dos tecidos moles adjacentes, assim como a formação óssea endocondral e intramembranosa. Esse tipo de reparo ósseo ocorre em fraturas tratadas com fixação óssea não rígida ou semirrígida, como tratamento com gesso, aplicação de placas metálicas sobre a fratura, entre outros.

A fratura óssea inicia uma resposta inflamatória aguda necessária para a consolidação óssea. A resposta inicial à fratura óssea é parecida com a de qualquer outra lesão que produza destruição tecidual e hemorragia. A lesão dos tecidos moles adjacentes e a degranulação das plaquetas do coágulo sanguíneo são responsáveis pela secreção de citocinas e pelo início da resposta inflamatória aguda.

Dessa forma, ocorre a infiltração dos neutrófilos, seguida de migração dos macrófagos e a proliferação de fibroblastos e capilares. Além disso, células-tronco mesenquimatosas chegam ao local provenientes dos tecidos moles e da medula óssea.

O hematoma da fratura é gradualmente substituído por tecido de granulação, um tipo de tecido conjuntivo frouxo recém-formado contendo colágeno. O tecido de granulação se transforma em um calo mole fibrocartilaginoso, que garan-



te à fratura uma estrutura estável e semirrígida.

Conforme o tecido de granulação se torna mais denso, os condroblastos diferenciam-se do revestimento periosteal, e a matriz cartilaginosa recém-produzida invade o tecido de granulação. O tecido conjuntivo denso e a cartilagem recém-formada crescem e cobrem o local de fratura, produzindo um calo mole.

Enquanto isso, as células osteoprogenitoras do perióstio se diferenciam em osteoblastos, que começam a depositar osteoide sobre a superfície externa do calo (ossificação intramembranosa) a uma distância da fratura. Essa nova formação de osso vai direção ao local de fratura até que o novo osso forme uma bainha óssea sobre o calo fibrocartilaginoso.

Os brotamentos osteogênicos do novo osso invadem o calo e começam a depositar osso dentro do calo, substituindo gradualmente o calo fibroso e cartilaginoso por um calo ósseo. Além disso, há proliferação e diferenciação do endóstio na cavidade medular, e o osso cresce a partir de ambas as extremidades da fratura em direção ao seu centro.

A região de junção do osso fraturado consiste, nesse momento, em osso esponjoso, que será substituído gradualmente por osso lamelar. Assim, o calo ósseo se torna mais sólido e mecanicamente rígido.

Mesmo que o calo ósseo seja uma estrutura rígida que dá estabilidade mecânica ao local de fratura, ele não restaura totalmente as propriedades do osso normal. Por isso, precisa-se que ocorra remodelação óssea do calo ósseo para transformar o osso não lamelar em osso maduro lamelar.

Dessa forma, enquanto o osso compacto está sendo formado, os remanescentes do calo ósseo são removidos pelos osteoclastos e a remodelação óssea restaura o formato original do osso.

Em indivíduos saudáveis, isso costuma levar 6 a 12 semanas, dependendo da



gravidade da fratura e do osso que foi fraturado. O calo mole é formado em torno de 2 a 3 semanas após a fratura, e o calo ósseo, em torno de 3 a 4 semanas.

O processo de remodelação óssea pode levar de meses à anos para que o osso recupere seu formato original. O alinhamento do osso e a manutenção das partes em posição por meio de fixação interna ou fixação externa aceleram esse processo.

