

IL TESSUTO OSSEO



Per gentile concessione del

Prof. Daniele Bani

Ordinario di Istologia Università di Firenze
Dip. Anatomia, Istologia e Medicina Legale
V.le G. Pieraccini, 6 50139 Firenze



INDICE

Generalità
Metodi Morfologici di studio del tessuto osseo
Sostanza intercellulare del tessuto osseo
Cellule del tessuto osseo
Interazioni funzionali tra cellule nel tessuto osseo
Organizzazione architettonica del tessuto osseo
Modificazioni morfo-funzionali del tessuto osseo
Istogenesi dell'osso
Accrescimento delle ossa
Fattori che influenzano la formazione dell'osso

Generalità

Il tessuto osseo fa parte, assieme alla cartilagine, dei tessuti connettivi specializzati per la funzione di sostegno. L'appartenenza del tessuto osseo ai tessuti connettivi è giustificata sia per la sua origine dal mesenchima, il tessuto embrionale che funge da matrice per tutti i tessuti connettivi, sia per la sua costituzione, essendo formato da cellule e da sostanza intercellulare composta da fibre collagene e sostanza fondamentale anista. La peculiarità del tessuto osseo è quella di essere mineralizzato: infatti la sostanza intercellulare è per la maggior parte impregnata di cristalli minerali, in prevalenza fosfato di calcio. La presenza di minerali, come pure la abbondanza e la particolare distribuzione delle componenti organiche della sostanza intercellulare, conferiscono a questo tessuto spiccate proprietà meccaniche di durezza e di resistenza alla pressione, alla trazione e alla torsione. In virtù di queste proprietà, il tessuto osseo costituisce un materiale ideale per la formazione delle ossa dello scheletro, che costituiscono nel loro insieme l'impalcatura di sostegno dell'organismo. Inoltre, dato il notevole contenuto in sali di calcio, il tessuto osseo rappresenta il principale deposito di ione calcio per le necessità metaboliche dell'intero organismo. La deposizione del calcio nell'osso e la sua mobilizzazione, finemente controllate da meccanismi endocrini, contribuiscono in modo sostanziale alla regolazione dei livelli plasmatici di questo ione.

Da un punto di vista macroscopico, si distinguono due varietà di osso: l'osso spugnoso e l'osso compatto. L'osso spugnoso lo si ritrova principalmente a livello delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle epifisi delle ossa lunghe: ha questo nome in quanto appare conformato come una spugna, con travate osse, dette trabecole, variamente orientate e intersecate tra loro e delimitanti cavità, dette cavità midollari, che in vivo sono ripiene di midollo osseo ematopoietico. L'osso compatto lo si ritrova a formare la porzione più superficiale delle ossa brevi, delle ossa piatte e delle ossa lunghe, nonché a costituire la diafisi di queste ultime. Esso è privo di cavità

macroscopicamente evidenti. Vedremo tuttavia come entrambe le varietà macroscopiche di osso si possano ricondurre, salvo rare eccezioni, ad un unico modello istologico di tessuto osseo.

Metodi morfologici di studio del tessuto osseo

Per lo studio istologico del tessuto osseo occorre tener conto del fatto che esso è un tessuto *sui generis*, essendo mineralizzato e quindi assai duro. Per allestire un preparato sottile di tessuto osseo per l'osservazione microscopica vengono generalmente impiegate delle varianti delle procedure tradizionali (le quali prevedono, subito dopo il prelievo, la fissazione, la disidratazione, l'inclusione in paraffina o in altro idoneo mezzo di inclusione e il sezionamento), che possono essere schematizzate come segue:

I metodi di sezionamento di frammenti mineralizzati sono quelli teoricamente preferibili, preservando nella sezione di tessuto osseo sia la componente organica che quella minerale. Esigono però particolari accorgimenti e attrezzature che non li rendono attuabili in tutti i laboratori di istologia. Il tessuto, una volta fissato e disidratato, per poter essere ridotto in sezioni di spessore adeguato all'osservazione microscopica deve essere incluso in resine di durezza non molto dissimile da quella della matrice ossea mineralizzata (es. resine acriliche). I campioni vengono quindi sezionati mediante lame di durezza adeguata (es. lame al carburo di tungsteno, o lame di diamante). Le sezioni così ottenute possono essere montate ed esaminate come tali o colorate con apposite metodiche. Apposite varianti dei metodi suddetti sono utilizzate per l'esame di frammenti di osso al microscopio elettronico.

I metodi per decalcificazione sono adeguati alla conservazione della componente organica, a scapito tuttavia della componente minerale che viene più o meno completamente rimossa. Il vantaggio di questi metodi rispetto ai precedenti è che sono di più facile esecuzione, non richiedendo strumentazione e abilità particolari. Il frammento di osso da esaminare viene fissato subito dopo il prelievo, al fine di preservare al meglio la morfologia delle cellule e l'integrità delle molecole organiche della sostanza intercellulare. Successivamente si procede alla rimozione della componente minerale, che viene dissolta chimicamente mediante il soggiorno del frammento in una soluzione acida. Caduti in disuso i metodi che si avvalevano di acidi inorganici forti (es. acido cloridrico, acido nitrico), in quanto deterioravano anche la componente organica creando considerevoli artefatti, sono attualmente in uso soluzioni di acidi organici (es. acido citrico, acido ascorbico), o di chelanti del calcio (es. acido etilendiamminotetraacetico o EDTA, acido etilenglicoltetraacetico o EGTA), che rimuovono la parte inorganica senza troppo danneggiare la parte organica. Una volta rimosso il minerale, il frammento osseo ha perso la sua durezza e può essere ulteriormente trattato come un qualsivoglia campione di tessuto molle, includendolo in paraffina e sezionandolo in sezioni sottili per mezzo di un comune microtomo. Le sezioni potranno essere successivamente colorate con metodi routinari o sottoposte a indagini istochimiche ed immunoistochimiche. I metodi per decalcificazione si prestano anche all'esame ultrastrutturale del tessuto osseo previa fissazione con i fissativi appositi per la microscopia elettronica (es. glutaraldeide) e successiva decalcificazione, osmizzazione, inclusione in resina epossidica o acrilica e sezionamento in sezioni ultrasottili.

I metodi per usura sono metodi di microscopia ottica adeguati a preservare la componente minerale e la componente organica mineralizzata, rappresentata fundamentalmente dalle fibre collagene. Non consentono tuttavia la preservazione delle cellule e di gran parte delle molecole della sostanza fondamentale anista. Il frammento osseo da studiare viene prelevato ed immerso in acqua per un periodo di tempo sufficientemente lungo da consentire la macerazione dei componenti organici non mineralizzati. In seguito, dal frammento macerato viene tagliata manualmente una sezione piuttosto spessa che viene fatta asciugare e poi aderire ad un vetrino portaoggetto tramite

una goccia di mezzo di montaggio (es. balsamo del Canada o balsami sintetici). Una volta che questo si è solidificato, la sezione di osso viene lavorata con carta abrasiva a grana decrescente, fino a ridurla per usura ad uno spessore sufficientemente sottile da renderla attraversabile dalla luce. Prima dell'osservazione, la sezione viene montata ponendole sopra una goccia di mezzo di montaggio ed infine un vetrino coprioggetto. Il mezzo, avendo una certa densità, non riesce a permeare le cavità microscopiche presenti nel tessuto osseo, che rimangono piene di aria. Pertanto, quando il preparato verrà osservato al microscopio ottico, l'aria contenuta nelle microcavità causerà la diffrazione dei raggi luminosi, che non verranno raccolti dall'obiettivo del microscopio. Pertanto tali cavità appariranno nere su uno sfondo chiaro, e quindi ben evidenti.

Sostanza intercellulare del tessuto osseo

Essendo un tessuto connettivo, il tessuto osseo contiene una quota rilevante di sostanza intercellulare organica, composta da fibre connettivali e da sostanza fondamentale anista. Alla componente organica si aggiunge inoltre la componente minerale.

1 - le **fibre connettivali** sono rappresentate per la quasi totalità da fibre collagene, composte da collagene di tipo I come nella maggior parte dei tessuti connettivi. Rispetto a questi, il collagene dell'osso possiede un maggior numero di legami crociati che tengono unite le singole molecole di tropocollagene. L'abbondante contenuto in collagene è il principale responsabile della marcata *acidofilia* della sostanza intercellulare dell'osso, quale si può mettere in evidenza nei preparati demineralizzati allestiti per la microscopia ottica. Quando esaminate al microscopio elettronico nei preparati demineralizzati, le microfibrille collagene presentano la tipica striatura trasversale con periodo di 70 nm. Esse si aggregano a formare fibre collagene di spessore rilevante (5-10 µm) soltanto nel cosiddetto tessuto osseo fibroso, mentre nell'altra varietà di tessuto osseo, cosiddetto lamellare, le microfibrille collagene (spesse circa 60 nm) non tendono a riunirsi in fibrille ma formano un feltro omogeneo. Dallo strato di tessuto connettivo che avvolge esternamente l'osso, detto periostio, si dipartono spessi fasci di fibre collagene che penetrano all'interno del tessuto osseo corticale e si perdono nella sostanza intercellulare dell'osso: questi fasci costituiscono le *fibre perforanti di Sharpey*, che ancorano il periostio alla superficie dell'osso.

Le fibre elastiche sono virtualmente assenti nel tessuto osseo, ad eccezione di una piccola quota di queste nelle fibre perforanti di Sharpey. Le fibre reticolari sono localizzate a livello della membrana basale che circonda i vasi sanguigni intraossei, ma non sono presenti nella sostanza intercellulare vera e propria dell'osso.

2 - la **sostanza fondamentale anista** ha una composizione peculiare e in buona misura diversa da quella degli altri tessuti connettivi. Di essa fanno parte varie classi di macromolecole (vedi Tabella 1).

a) **Proteoglicani**, composti da glicosaminoglicani acidi, solitamente solforati, uniti assieme da brevi catene proteiche. Quelli meglio conosciuti sono:

Proteoglicano di tipo I (PG-I), detto anche *biglicano* in quanto costituito da due molecole di condroitinsolfato unite ad una estremità da un polipeptide ricco di leucina, lo si ritrova sia nella sostanza intercellulare mineralizzata che in quella non mineralizzata adiacente alle cellule ossee e ai loro prolungamenti, il cosiddetto *tessuto osteoide* ;

Proteoglicano di tipo II (PG-II), detto anche *decorina* in quanto tende ad associarsi alle microfibrille collagene come a decorarle. E' formato da una parte proteica analoga a quella del PG-I unita ad una sola molecola di condroitinsolfato. Lo si ritrova nella sostanza intercellulare mineralizzata ma non nel tessuto osteoide, per cui si ipotizza che abbia un ruolo nell'orientare la

deposizione dei cristalli minerali lungo le microfibrille collagene.

b) **Glicoproteine**, di solito fosforilate o solfatate, includono molecole diverse alcune delle quali sono ritenute giocare un ruolo fondamentale nel controllo dei processi di mineralizzazione. Tra queste si annoverano:

Osteonectina, la glicoproteina più abbondante. E' dotata di alta affinità per il calcio, sia come ione libero che associato in complessi di tipo cristallino. Si ritiene che essa agisca come elemento di nucleazione dei cristalli minerali, in quanto ritenuta capace di concentrare il calcio nelle sue adiacenze creando così le condizioni per avviare la precipitazione del fosfato di calcio.

Fosfatasi alcalina, un enzima capace di idrolizzare gruppi fosfato legati a substrati organici (quali ad es. il piridossal-5-fosfato) attivo in ambiente alcalino (pH 8-10). Alcuni studiosi ritengono che essa potrebbe giocare un ruolo nei processi di mineralizzazione, mettendo a disposizione gli ioni fosfato per la formazione dei cristalli minerali. Secondo altri, sarebbe invece coinvolta nella sintesi della matrice organica dell'osso.

Fibronectina, una molecola di adesione localizzata prevalentemente nella matrice pericellulare e caratterizzata da una porzione capace di legarsi al collagene. Si ritiene che la fibronectina sia coinvolta nei processi di migrazione, adesione alla matrice e organizzazione delle cellule dell'osso.

c) **Sialoproteine**, o **BSP** (dall'acronimo inglese *bone sialo-proteins*, sialoproteine dell'osso), glicoproteine peculiari contenenti residui glicidici di acido sialico. Queste proteine posseggono una sequenza aminoacidica particolare Arg-Gly-Asp (sequenza RGD) che in esperimenti in vitro è stata vista mediare l'adesione al substrato di svariati tipi cellulari, incluse le cellule dell'osso. Si ritiene pertanto che le sialoproteine ossee abbiano la funzione fisiologica di consentire l'adesione delle cellule alla matrice ossea. Se ne conoscono più tipi: la *osteopontina* (o BSP-I), la BSP-II e la glicoproteina acida dell'osso (o BAG-75).

d) **Proteine contenenti l'acido γ -carbossiglutammico (GLA)**, un aminoacido particolare derivato dall'acido glutammico con un ulteriore gruppo carbossilico legato al carbonio in posizione γ . Il GLA incluso in una proteina possiede, nella porzione del residuo, due gruppi carbossilici liberi e ravvicinati che a pH fisiologico sono ionizzati e carichi negativamente, e pertanto capaci di agire come una sorta di chelanti per i cationi bivalenti quali lo ione calcio. Le proteine dell'osso contenenti il GLA sono di due tipi.

Osteocalcina, o *proteina GLA dell'osso*, una piccola proteina contenente 3-5 residui di GLA. E' stato ipotizzato che essa possa giocare un ruolo di inibizione della mineralizzazione in quanto ritenuta capace di legarsi allo ione calcio e di renderlo indisponibile per la combinazione con lo ione fosfato, inibendo così l'accrescimento dimensionale dei cristalli minerali. Questa ipotesi è avvalorata dalla constatazione che l'osteocalcina abbonda nel tessuto osseo maturo ed è invece scarsa nel tessuto osseo in via di formazione, nonché dal reperto che questa proteina inibisce la crescita di cristalli di fosfato di calcio in vitro.

Proteina GLA della matrice, di peso molecolare maggiore della osteocalcina, è presente sia nell'osso maturo che in quello in via di formazione, nonché nella cartilagine destinata a essere sostituita da tessuto osseo, come la cartilagine di accrescimento. Il suo ruolo biologico non è chiarito.

Tabella 1 – Molecole della sostanza fondamentale dell'osso

PROTEOGLICANI	PG I – Biglicano	??
	PG II - Decorina	orientamento fibre collagene/cristalli
GLICOPROTEINE	Osteonectina	Induzione mineralizzazione
	Fosfatasi alcalina	Mineralizzazione (?)
	Fibronectina	Adesione cellule-matrice
SIALOPROTEINE (BSP)	BSP – I Osteopontina	Adesione cellule-matrice
	BSP II	Adesione cellule-matrice
	BAG - 75	Adesione cellule-matrice
PROTEINE CONTENENTI L'ACIDO	GLA dell'osso – Osteocalcina	Inibizione mineralizzazione
γ -CARBOSSIGLUTAMMICO (GLA)	GLA della matrice	??
FATTORI DI CRESCITA	TGF- β	Proliferazione e/o differenziamento
	IGF	
	PDGF	
	FGF	
	EGF	

3 - la **componente minerale** è rappresentata da cristalli di sali di calcio, prevalentemente fosfato di calcio a cui si aggiungono quantità minori di carbonato di calcio e tracce di altri sali (fluoruro di calcio, fosfato di magnesio). Il fosfato di calcio è presente sotto forma di *cristalli di apatite*, la cui cella elementare ha la forma di un prisma esagonale appiattito e formula chimica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^{++}$; le due cariche positive sono di norma neutralizzate dal legame con due ioni ossidrilici (OH^-), formando così la *idrossiapatite*, ma si possono ritrovare anche altri anioni (ione carbonato nella carbonatoapatite; ione fluoruro nella fluoroapatite). Il cristallo si origina dall'impilamento delle singole celle elementari ed ha la forma di un ago lungo e sottile, spesso circa 2 nm e lungo 20-40 nm.

I cristalli di apatite sono ben riconoscibili nei preparati di tessuto osseo allestiti per la microscopia elettronica in quanto fortemente elettrondensi; essi tendono a disporsi parallelamente tra sé e alle microfibrille collagene, di cui ricoprono la superficie e permeano le porosità. Osservazioni condotte durante il processo di mineralizzazione dell'osso hanno consentito di precisare che il fosfato di calcio precipita inizialmente sotto forma di minutissimi aggregati amorfi. Questi nuclei iniziali di concrezione minerale vengono rapidamente rimpiazzati da sottilissimi cristalli aghiformi disposti parallelamente a molecole filamentose della sostanza fondamentale detti *filamenti assili* (o *crystal ghosts*), verosimilmente costituiti da decorina, in rapporto col periodo delle microfibrille collagene. Tali cristalli crescono assumendo l'aspetto tipico dei cristalli di apatite, occupando progressivamente gran parte dello spazio interposto tra le microfibrille collagene e permeando le microfibrille stesse. Una volta formati i cristalli di apatite, la deposizione di nuovo minerale può avvenire sia per formazione di nuovi cristalli che per apposizione sui cristalli preesistenti. Tale fenomeno è finemente regolato dalle cellule ossee tramite la produzione di specifiche molecole della matrice ossea, come già accennato in precedenza.

Cellule del tessuto osseo

Le cellule proprie del tessuto osseo sono morfologicamente distinguibili in 4 varietà: le *cellule osteoprogenitrici* (dette anche *preosteoblasti*), gli *osteoblasti*, gli *osteociti* e gli *osteoclasti*. Di queste, cellule osteoprogenitrici, osteoblasti e osteociti sono in realtà fasi funzionali consecutive dello stesso tipo cellulare, a sua volta derivato dalla differenziazione in senso osteogenico della cellula mesenchimale pluripotente dei tessuti connettivi; sono pertanto considerabili come cellule autoctone dell'osso. Gli osteoclasti, per contro, derivano da precursori immigrati nel tessuto osseo dal sangue, i cosiddetti preosteoclasti, i quali a loro volta si differenziano da cellule staminali del midollo osseo ematopoietico.

1 - le **cellule osteoprogenitrici**, o **preosteoblasti**, hanno forma fusata o ovalare, con citoplasma scarso e basofilo e nucleo eucromatico con grande nucleolo. Al microscopio elettronico, la basofilia citoplasmatica si dimostra dovuta a un gran numero di poliribosomi liberi. Gli altri organuli sono poco rappresentati.

Le cellule osteoprogenitrici si collocano sulle superfici libere delle ossa: le si riconoscono a livello dello strato più interno del periostio apposto all'osso, il cosiddetto *strato osteogenico di Ollier*, riccamente vascolarizzato. Tali cellule sono altresì localizzate a livello del tessuto connettivo lasso che riveste le cavità interne dell'osso, il cosiddetto *endostio*, in vicinanza dei capillari sanguigni. Le cellule osteoprogenitrici sono dotate di capacità proliferativa, che si manifesta in modo particolare durante l'accrescimento corporeo ma che può esplicarsi anche durante la vita adulta. Esse sono in grado di produrre e secernere le *bone morphogenetic proteins (BMP)*, fattori di crescita e di differenziamento autocrini. Quando imboccano la via del differenziamento, le cellule osteoprogenitrici si trasformano in osteoblasti.

2 - gli **osteoblasti** sono le cellule primariamente responsabili della sintesi della sostanza intercellulare dell'osso e della sua mineralizzazione. Esse hanno forma globosa o poliedrica e tendono a giustapporsi le une alle altre a formare delle lamine epitelioidi a ridosso delle superfici ossee in via di formazione. Gli osteoblasti hanno dimensioni rilevanti (circa 20 μm), un nucleo rotondeggiante, eucromatico, con grande nucleolo ed un citoplasma abbondante e basofilo in cui possono mettersi in evidenza granulazioni PAS-positive. Istochimicamente, queste cellule si caratterizzano per la positività alla reazione per la fosfatasi alcalina. Al microscopio elettronico, gli osteoblasti presentano un ergastoplasma sviluppato e un grande apparato di Golgi. I mitocondri contengono numerosi granuli densi, interpretabili come accumuli di ioni calcio. In prossimità dell'apparato di Golgi sono visibili vescicole con vario aspetto contenenti sostanze da esocitare: alcune di queste sono oblunghe e contengono un materiale fibrillare a modico arresto elettronico, rappresentato verosimilmente da molecole di procollagene; altre vescicole sono rotonde, a contenuto elettronegativo, e si pensa contengano proteoglicani e altre molecole della sostanza fondamentale anista. Nel citoplasma periferico possono essere presenti dei corpi delimitati da membrana, detti *globuli calcificanti*, di 0,2-0,5 μm di diametro, contenenti una matrice a medio arresto elettronico, in cui sono localizzati enzimi glicoproteici come la fosfatasi alcalina e la pirofosfatasi. Essi non vanno confusi con le cosiddette *sferule calcaree* (in inglese dette appunto *calcifying globules*), che si incontrano nella matrice ossea mineralizzata e che rappresentano i nuclei iniziali di aggregazione dei cristalli. Vescicole di secrezione e globuli calcificanti sono verosimilmente il corrispettivo delle granulazioni PAS-positive visibili al microscopio ottico. Gli osteoblasti sono uniti tra loro e con gli osteociti vicini tramite giunzioni serrate (o *gap junctions*), tramite le quali le cellule si scambiano molecole segnale per la coordinazione dell'attività metabolica e di deposizione della matrice ossea.

L'osteoblasto è la sede di sintesi delle molecole organiche della sostanza intercellulare

dell'osso, le quali vengono successivamente esocitate ed assemblate all'esterno della cellula. L'osteoblasto presiede anche alla mineralizzazione della sostanza intercellulare, secondo modalità che non sono del tutto chiarite.

- Nel tessuto osseo che viene depositato per primo, il cosiddetto *osso fibroso*, si ritiene che giochino un ruolo chiave i globuli calcificanti. Questi verrebbero estrusi dalla cellula per gemmazione, pertanto li si ritroverebbero nella matrice ossea in via di mineralizzazione sotto forma di *vescicole della matrice*, caratteristicamente provviste di un involucro membranoso. Sembra che l'iniziale deposizione di minerale avvenga proprio a ridosso della membrana interna di queste vescicole, le cui componenti agirebbero da catalizzatori per tale processo. Quando poi la membrana si disgrega, tali molecole si disperderebbero nella sostanza intercellulare dove tuttavia manterrebbero questa loro proprietà. Non è ben compreso se un ulteriore ruolo nel processo di mineralizzazione sia svolto dalle sostanze contenute nelle vescicole della matrice che si liberano quando queste si disgregano. Si ritiene verosimile che i precipitati di minerale fungano da centri di nucleazione dei cristalli di apatite. Meno chiaro sarebbe il ruolo della fosfatasi alcalina: secondo alcuni studiosi essa si attiverebbe producendo ioni fosfato che si combinano con lo ione calcio presente nella sostanza extracellulare a cui si aggiunge quello che contemporaneamente si libera dai mitocondri dell'osteoblasto realizzando le condizioni critiche per l'associazione di calcio e fosfato; tale teoria (ipotesi di Robinson) è stata recentemente messa in discussione, poiché questo enzima è attivo anche in tessuti che non mineralizzano (dove è coinvolta nella sintesi della componente organica della matrice intercellulare) e poiché la presenza di concentrazioni sufficienti di substrati organici fosforilati nei centri di mineralizzazione non è mai stata effettivamente dimostrata. Altrettanto oscuro è il possibile ruolo svolto dalla pirofosfatasi: secondo alcuni ricercatori anch'essa potrebbe attivarsi liberando gruppi pirofosfato da particolari molecole, denominate *difosfonati*, ed inattivandole. I difosfonati, quando sono integri, si combinano con le estremità dei cristalli di apatite e impediscono l'ulteriore concrezione di ioni calcio e fosfato, agendo quindi da inibitori della mineralizzazione. Quando vengano scissi dalla pirofosfatasi osteoblastica, i difosfonati perdono affinità per i cristalli di apatite consentendo così la crescita dei cristalli stessi.

Nel tessuto osseo che viene depositato successivamente all'osso fibroso e che lo rimpiazza, il cosiddetto *osso lamellare*, le vescicole della matrice sono invece virtualmente assenti. Si ritiene che, in questa sede, il processo di mineralizzazione sia avviato da componenti delle fibre collagene e/o da molecole della sostanza fondamentale anista associati alle fibre collagene. Sembra inoltre importante la presenza dei cristalli di idrossiapatite già presenti dallo stadio di osso fibroso, che in qualche modo ancora non chiaro potrebbero fungere da catalizzatori per la deposizione di nuovi cristalli.

In entrambi i casi, alla regolazione della mineralizzazione della matrice ossea contribuirebbero inoltre altre molecole prodotte dagli osteoblasti, tra le quali vanno ricordate l'osteonectina, che favorisce la nucleazione dei cristalli minerali, e la osteocalcina, che agirebbe invece da inibitore della precipitazione di fosfato di calcio. Una fisiologica deposizione di sostanza minerale è il risultato di un fine equilibrio che si raggiunge nell'azione di tutti i vari fattori capaci di influire su di essa.

La produzione della matrice ossea e la sua mineralizzazione avvengono secondo un orientamento ben preciso: inizialmente l'osteoblasto depone osso dal lato rivolto verso la superficie ossea preesistente; successivamente ne depone da ogni lato tutto attorno a sé, di modo che ciascuna cellula si allontana progressivamente dalle circostanti a causa dell'interposizione di sostanza intercellulare. A questo punto l'osteoblasto rallenta sostanzialmente la sua attività metabolica e si trasforma in un *osteocita*, mentre nuovi osteoblasti si differenziano via via dalle cellule

osteoprogenitrici. Quando il processo di formazione di nuovo tessuto osseo si è esaurito, gli osteoblasti che rimangono a ridosso della superficie ossea cessano la loro attività, riducono i loro organuli e si trasformano in una membrana di cellule appiattite, le cosiddette *cellule di rivestimento dell'osso (bone lining cells)*, a cui si attribuisce un ruolo nel mediare gli scambi tra vasi sanguigni e osteociti.

Gli osteoblasti producono e secernono fattori solubili, il più studiato dei quali è il *fattore di crescita trasformante (transforming growth factor)- β* (TGF- β) che è un potente stimolatore degli osteoblasti stessi. Esso fa parte della stessa famiglia a cui appartengono le BMP; agendo in maniera paracrina ed autocrina, è capace di modulare la proliferazione delle cellule osteoprogenitrici, di promuovere il loro differenziamento in osteoblasti e di incrementare il metabolismo e le sintesi macromolecolari degli osteoblasti maturi. Il TGF- β viene secreto in forma di precursore inattivo, il quale viene convertito nella forma attiva ad opera di proteasi presenti nell'ambiente extracellulare. Oltre al TGF- β , gli osteoblasti producono gli *insulin-like growth factors* (IGF), molecole proteiche strettamente apparentate tra loro con una spiccata azione di stimolo sulla crescita e sul metabolismo osteoblastico.

Gli osteoblasti sono coinvolti nei processi di rimaneggiamento dell'osso. Infatti, queste cellule sono in grado di innescare il riassorbimento della matrice ossea sia indirettamente, in quanto producono fattori solubili che attivano gli osteoclasti, le cellule preposte al riassorbimento osseo, sia direttamente, in quanto secernono enzimi proteolitici capaci di scindere i componenti della matrice organica dell'osso. Tra questi enzimi vi è la *collagenasi*, che viene secreta sotto forma di *procollagenasi* inattiva. La sua attivazione avviene nell'ambiente extracellulare ad opera di un'altra proteasi, l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), anch'esso prodotto dagli stessi osteoblasti. Il tPA attiva una proteasi ad ampio spettro, la *plasmina*, presente nel plasma sanguigno come precursore inattivo, detto plasminogeno. La plasmina opera il clivaggio proteolitico della procollagenasi trasformandola nella collagenasi attiva. La collagenasi osteoblastica agirebbe rimuovendo lo strato di tessuto osteoide non mineralizzato che riveste la superficie dell'osso, consentendo così agli osteoclasti di aderire alla matrice mineralizzata e dissolverla.

3 - gli **osteociti** sono le cellule tipiche dell'osso maturo, responsabili del suo mantenimento ed anche capaci di avviarne il rimaneggiamento. Sono cellule terminali, con una autonomia di vita finita, finemente regolata da meccanismi endocrini. L'osteocita è una cellula stellata, con un corpo cellulare a forma di lente biconvessa e numerosi prolungamenti citoplasmatici. Al microscopio ottico, l'osteocita presenta un nucleo eterocromatico con un piccolo nucleolo ed un citoplasma perinucleare piuttosto scarso che, negli osteociti più giovani, è tenuemente basofilo. Al microscopio elettronico, gli osteociti mostrano un aspetto diverso a seconda dell'età della cellula: gli osteociti giovani sono caratterizzati dalla presenza di cisterne di reticolo endoplasmatico granulare e da un apparato di Golgi piuttosto esteso; via via che la cellula invecchia si riduce il reticolo endoplasmico granulare e compaiono vacuoli autofagici e lisosomi secondari; infine compaiono segni di degenerazione quali alterazioni nucleari caratteristiche dell'apoptosi, dilatazione della cisterna perinucleare e condensazione della matrice citoplasmatica che preludono alla dissoluzione dell'intera cellula.

Il corpo dell'osteocita rimane racchiuso in una nicchia scavata nella sostanza intercellulare ossea, detta *lacuna ossea*, la cui forma ricalca quella della cellula, mentre i prolungamenti sono accolti all'interno di sottili canali scavati nel tessuto osseo e definiti *canalicoli ossei*. Alle loro estremità, i prolungamenti di un osteocita sono connessi mediante giunzioni serrate con quelli degli osteociti circostanti. Tra la membrana plasmatica del corpo cellulare e dei prolungamenti e la matrice mineralizzata rimane uno spazio sottile occupato da tessuto osteoide che non mineralizza. Attraverso il tessuto osteoide delle lacune e dei canalicoli ossei, che sono ampiamente comunicanti,

l'acqua e le sostanze disciolte (gas respiratori e metaboliti) riescono a raggiungere tutti gli osteociti, anche quelli più distanti dai vasi sanguigni. Metaboliti e molecole segnale disciolti nel citoplasma possono inoltre essere scambiate tra gli osteociti per il tramite delle giunzioni serrate.

Quando l'osteocita giunge al termine del suo ciclo vitale, esso ritrae i propri prolungamenti e degenera. Per molto tempo si è ritenuto che la morte degli osteociti fosse alla base del cosiddetto *minirimaneggiamento*, che avviene a livello di singoli osteociti e che nel suo insieme era ritenuto essere coinvolto nel mantenimento dei livelli circolanti di ione calcio (calcemia). Dagli osteociti morti si sarebbero infatti liberati nella lacuna acidi organici derivati dal metabolismo cellulare (es. acido lattico) ed enzimi lisosomiali: i primi avrebbero disciolto i cristalli di apatite ed i secondi avrebbero scisso le macromolecole organiche della sostanza intercellulare, operando la cosiddetta *osteolisi osteocitica*. Si riteneva altresì che l'osteolisi osteocitica fosse promossa dal *paratormone* (PTH), l'ormone ipercalcemizzante prodotto dalle paratiroidi, il quale interagendo con recettori posti sulla membrana degli osteociti avrebbe determinato un'abbreviazione del loro ciclo vitale. In epoca recente, tuttavia, il ruolo dell'osteolisi osteocitica è stato ridimensionato: la mobilitazione di ioni calcio dalla matrice ossea stimolata dal paratormone è ritenuta dipendere principalmente dall'azione combinata di osteoblasti ed osteoclasti. Vi sono dati a favore dell'ipotesi che, nelle zone di riassorbimento della matrice ossea da parte degli osteoclasti, gli osteociti non muoiano affatto ma vadano ad arricchire il patrimonio di cellule di rivestimento dell'osso, anche se non è chiaro se esse siano ancora capaci di trasformarsi nuovamente in osteoblasti attivi.

4 - Gli **osteoclasti** sono le cellule preposte al riassorbimento osseo. Come già accennato, essi non sono cellule autoctone del tessuto osseo, in quanto non appartengono alla linea che deriva dalle cellule osteoprogenitrici. I precursori degli osteoclasti, detti *preosteoclasti*, originano nel midollo osseo ematopoietico e sono apparentati con la linea differenziativa di una categoria di globuli bianchi, i monociti. I preosteoclasti vengono trasportati dal torrente circolatorio fino alle sedi in cui debbono avvenire processi di riassorbimento osseo; qui giunti, essi migrano nel tessuto osseo e si fondono insieme originando gli osteoclasti attivi, elementi sinciziali capaci di dissolvere la componente minerale e di digerire enzimaticamente le componenti organiche del tessuto osseo.

Gli osteoclasti maturi sono cellule giganti (100-200 μm), plurinucleate in quanto originate dalla fusione dei singoli precursori mononucleati: in un singolo osteoclasto possono infatti essere presenti fino a 50 nuclei, con cromatina lassa e nucleolo ben evidente. Il citoplasma è acidofilo. L'osteoclasto attivato è aderente alla matrice mineralizzata in via di riassorbimento ed è solitamente accolto in una cavità, detta *lacuna di Howship*, che si forma a seguito dell'azione erosiva della cellula sull'osso. Sul versante della cellula che si appone all'osso è visibile il cosiddetto *orletto increspato*, che appare come un'ispessimento della superficie cellulare con una sottile striatura disposta perpendicolarmente alla superficie stessa. Con metodi istochimici, a livello dell'orletto increspato si può rivelare la presenza dell'enzima anidrasi carbonica e di pompe a protoni. Ai margini dell'orletto increspato vi è una porzione di citoplasma di aspetto astrutturato, detta *zona chiara*.

Al microscopio elettronico, la zona dell'orletto increspato si rivela composta da un gran numero di sottili lamine citoplasmatiche, diverse tra loro per calibro e lunghezza, che ampliano grandemente l'estensione del plasmalemma. La zona chiara appare invece a superficie liscia ed è occupata da abbondanti strutture citoscheletriche, in particolare microfilamenti contrattili: immaginandola nelle tre dimensioni, la zona chiara costituisce una sorta di cercine periferico all'orletto increspato tramite la quale l'osteoclasto aderisce strettamente alla superficie dell'osso da riassorbire, delimitando l'ambiente extracellulare compreso tra la superficie dell'osso e l'orletto increspato, la cosiddetta *zona sigillata*; qui le sostanze liberate dall'osteoclasto possono agire sulla matrice ossea senza diffondersi all'intorno. Il citoplasma più prossimo all'orletto increspato prende

il nome di *zona delle vescicole chiare*, a causa della presenza di numerose formazioni rotondeggianti apparentemente vuote delimitate da membrana, interpretabili come le porzioni più profonde degli spazi tra le lamine dell'orletto increspato. Prossimi alle vescicole chiare, sono presenti numerosi granuli elettrondensi interpretabili come lisosomi. Nel citoplasma dal lato opposto all'osso sono presenti i nuclei, diplosomi multipli, apparati di Golgi e un buon numero di mitocondri e di cisterne di reticolo endoplasmico granulare.

Il riassorbimento della matrice ossea inizia con la dissoluzione della componente minerale dovuta all'acidificazione del microambiente della zona sigillata. A questo livello l'anidrasi carbonica, sita sul versante ialoplasmatico del plasmalemma dell'orletto increspato, genera acido carbonico a partire da CO_2 e H_2O ; le pompe di membrana localizzate sul plasmalemma dell'orletto increspato trasportano attivamente protoni, derivati dalla dissociazione dell'acido carbonico e di altri acidi organici di origine metabolica (es. acido citrico, acido lattico), nell'ambiente extracellulare. L'abbassamento del pH che ne consegue porta alla dissoluzione dei cristalli di apatite. Nel contempo l'osteoclasto esocita il contenuto degli enzimi lisosomiali all'esterno: a basso pH le idrolasi lisosomiali si attivano e digeriscono i componenti organici della matrice ossea. Inoltre, l'osteoclasto libera l'attivatore tissutale del plasminogeno, il quale a sua volta attiva la plasmina e, per suo tramite, la collagenasi latente prodotta dagli osteoblasti. Quest'ultimo enzima contribuisce con la sua azione litica alla digestione della sostanza intercellulare organica dell'osso. Osservando al microscopio elettronico un osteoclasto in attività è possibile documentare, negli interstizi tra i microvilli dell'orletto striato, cristalli di apatite e microfibrille collagene distaccatisi dalla matrice ossea e in via di disgregazione.

L'azione erosiva dell'osteoclasto si manifesta con la formazione della lacuna di Howship. Una volta formata una prima lacuna, l'osteoclasto si distacca dalla matrice ossea, si muove per moto ameboide su una porzione di osso adiacente a quella appena riassorbita, aderisce nuovamente e forma una nuova lacuna. Procedendo un po' come una ruspa che compie uno sterro, l'osteoclasto procede lungo l'osso scavandovi solchi profondi. Nel loro insieme, più osteoclasti attivati riescono in un tempo relativamente breve a riassorbire porzioni anche cospicue di osso.

La funzione osteoclastica è finemente regolata da fattori ormonali e locali. In particolare, gli osteoclasti sono le uniche cellule dell'osso che possiedono i recettori per l'ormone *calcitonina*, prodotto dalle cellule parafollicolari (o cellule C) della tiroide, con azione antagonista al paratormone. La calcitonina è un inibitore del riassorbimento dell'osso, essendo capace di indurre il distacco degli osteoclasti dall'osso, la scomparsa dell'orletto increspato e la riduzione del metabolismo cellulare. Il recettore per la calcitonina è già espresso dai precursori circolanti degli osteoclasti, e la sua evidenziazione può essere un valido metodo per la identificazione di queste cellule. Per contro, gli osteoclasti non esprimono il recettore per il paratormone, che non ha alcun effetto diretto su di essi. L'azione osteolitica del paratormone sembra esplicarsi per il tramite degli osteoblasti: questi, sotto stimolo dell'ormone, libererebbero fattori solubili detti OAF (*osteoclast activating factors*), che agirebbero sugli osteoclasti attivandoli e promuovendo così il riassorbimento osseo. La natura chimica degli OAF non è nota: probabilmente alcuni di questi fanno parte della categoria delle BMP (as es. la BMP-2 è un potente stimolatore del differenziamento osteoclastico in vitro). Questa ipotesi sembra avvalorata dai risultati di esperimenti condotti in vitro, che hanno dimostrato come fattori di stimolo del riassorbimento osseo, come il paratormone, la vitamina D ed alcune citochine, siano incapaci di stimolare gli osteoclasti a riassorbire l'osso, a meno che questi non siano mantenuti in coltura insieme con osteoblasti.

Interazioni funzionali tra cellule nel tessuto osseo

Da quanto detto nel paragrafo precedente, emerge che vi è una stretta correlazione funzionale tra osteoblasti e osteoclasti. L'induzione del riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti richiede infatti la presenza degli osteoblasti, i quali liberano gli OAF. Gli osteoblasti sono anche coinvolti nel differenziamento dei preosteoclasti in osteoclasti maturi. Ricerche recenti hanno infatti dimostrato che la migrazione di preosteoclasti avviene laddove sono presenti osteoblasti: la differenziazione dei preosteoclasti sembra inoltre richiedere sia la produzione di fattori solubili, quali il GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), da parte degli osteoblasti, sia un contatto diretto tra questi e i preosteoclasti, tale da consentire il passaggio di molecole segnale attraverso giunzioni serrate.

Le cellule endoteliali sono anch'esse coinvolte nella funzione delle cellule proprie dell'osso. E' stato infatti dimostrato in esperimenti in coltura in vitro che le cellule endoteliali ossee producono fattori solubili, quali gli IGF, che promuovono la crescita delle cellule osteoprogenitrici e il loro differenziamento in osteoblasti. Le cellule endoteliali rilasciano inoltre fattori chemiotattici per i precursori circolanti degli osteoclasti, tra cui gli stessi IGF, ed esprimono molecole di adesione che consentono ai precursori osteoclastici di arrestarsi e di migrare nel tessuto osseo ove sia richiesta la loro presenza.

Vari tipi di leucociti e di cellule da essi derivate, tra cui i macrofagi e i linfociti T, producono fattori capaci di influenzare le cellule dell'osso. Tra questi si annoverano: l'*interleuchina 1* (IL-1) e la *interleuchina 6* (IL-6), che attivano gli osteoclasti, probabilmente non in via diretta ma per il tramite degli osteoblasti; l'*interleuchina 3* (IL-3), che promuove la differenziazione dei preosteoclasti in osteoclasti maturi; il *tumor necrosis factor* (TNF) e le *prostaglandine* (PG), anche essi ritenuti essere induttori del riassorbimento osseo.

E' stato dimostrato che nella matrice ossea mineralizzata rimangono incarcerati numerosi fattori di crescita prodotti dalle cellule ossee o di provenienza plasmatica, tra cui il TGF- β e gli IGF osteoblastici, il *platelet-derived growth factor* (PDGF), l'*epidermal growth factor* (EGF), il *fibroblast growth factor* (FGF), etc. Questi fattori si liberano quando gli osteoclasti riassorbono la matrice ossea ed agiscono a livello locale sulle cellule dell'osso, promuovendo attività biologiche diverse, quali ad esempio proliferazione e differenziamento degli osteoblasti ed angiogenesi.

Organizzazione architettonica del tessuto osseo

In base alle dimensioni ed alla disposizione delle fibre collagene, si distinguono due varietà di tessuto osseo, il *fibroso* e il *lamellare*.

a) il **tessuto osseo fibroso** è caratterizzato dalla presenza di fibre collagene di dimensioni rilevanti (5-10 μm di calibro), ben visibili nei preparati demineralizzati allestiti per la microscopia ottica. Il decorso di queste fibre non segue un orientamento definito, per cui esse appaiono intrecciarsi in tutte le direzioni dello spazio, così come avviene nei tessuti connettivi densi a fasci di fibre intrecciati (derma profondo, aponeurosi, sclera, etc.). Gli osteociti occupano lacune scavate negli interstizi tra le fibre collagene senza un ordine preciso. Frequentemente accade che l'osso fibroso venga depositato sotto forma di lamine mal definite, con fibre collagene orientate variamente, attorno ad un canale centrale occupato da un vaso sanguigno, detto *canale di Havers*. Queste formazioni sono denominate *osteoni primitivi*, e non vanno confusi con gli osteoni propriamente detti che caratterizzano la varietà omonima di tessuto osseo lamellare. Il tessuto osseo fibroso è il primo ad essere deposto, sia durante lo sviluppo fisiologico che nella riparazione di fratture, dopo di che esso viene rapidamente riassorbito e rimpiazzato con tessuto osseo di tipo lamellare. Ne

rimane soltanto a livello delle inserzioni dei tendini e dei ligamenti. Anche il cemento dentario, che riveste la dentina della radice dei denti, è da molti considerato una varietà *sui generis* di tessuto osseo fibroso.

b) il **tessuto osseo lamellare** è la varietà più diffusa, costituendo la quasi totalità dell'osso compatto e buona parte dell'osso spugnoso. Esso è caratterizzato dalla ordinata disposizione delle fibre collagene e degli osteociti, che si dispongono in strati sovrapposti, detti *lamelle ossee*. A seconda della disposizione delle lamelle, si distinguono:

- il *tessuto osseo lamellare semplice*, caratterizzato da un numero limitato di lamelle con andamento parallelo tra sé. Esso forma le trabecole e le lamine ossee più sottili, come la lamina papiracea dell'etmoide e le estremità dei turbinati. Forma anche i *sistemi limitanti*, o *circonfenziali*, *interno* ed *esterno* della diafisi delle ossa lunghe, in cui le lamelle sono parallele alle superfici diafisarie interna ed esterna.
- il *tessuto osseo lamellare osteonico*, caratterizzato da un numero variabile di lamelle (8-20) disposte concentricamente attorno ad un canale centrale che accoglie un vaso sanguigno, detto *canale di Havers*. Il gruppo di lamelle centrato attorno al canale di Havers costituisce l'*osteone*, l'unità fondamentale del tessuto lamellare osteonico, autonomo dal punto di vista trofico e funzionale dagli altri osteoni circostanti.

Nel tessuto osseo lamellare, le microfibrille collagene non tendono ad aggregarsi in fibrille né tantomeno in fibre collagene. La presenza di abbondanti microfibrille collagene, birifrangenti al microscopio a luce polarizzata, rende ragione di una particolarità del tessuto osseo lamellare quando osservato con questo strumento: si notano infatti lamelle luminose (birifrangenti) che si alternano a lamelle oscure (monorifrangenti). Basandosi su questi reperti, per molto tempo si è ritenuto che tutte le microfibrille di una lamella assumessero un decorso parallelo tra sé, e che l'orientamento delle microfibrille di lamelle contigue fosse angolato od ortogonale, ricordando la disposizione delle fibre collagene nei vari strati dello stroma della cornea. Pertanto le immagini ottenute con il microscopio a luce polarizzata venivano interpretate supponendo che le lamelle luminose contenessero microfibrille disposte parallelamente o quasi al piano della sezione (e quindi perpendicolarmente rispetto al fascio della luce polarizzata, sì da risultare birifrangenti), mentre le lamelle oscure contenessero microfibrille disposte pressoché perpendicolarmente al piano della sezione (e quindi parallele al fascio di luce polarizzata, risultando così monorifrangenti). Recentemente, accurati studi di microscopia elettronica a trasmissione ed a scansione hanno consentito di avanzare un'ipotesi più convincente per spiegare l'organizzazione strutturale del tessuto osseo lamellare. Secondo questi studi, in ogni lamella le microfibrille collagene formano un feltro più o meno fitto intrecciandosi in ogni direzione dello spazio. A lamelle più sottili (circa 3 μm), ricche in microfibrille e relativamente povere in cristalli di apatite, si alternano lamelle più spesse (circa 7 μm), scarse in microfibrille e più mineralizzate. In queste ultime lamelle sono scavate le lacune ossee che accolgono i corpi degli osteociti. L'aspetto a luce polarizzata dell'osso lamellare è quindi facilmente spiegabile con il fatto che appaiono luminose le sole lamelle che contengono una quantità sufficiente di microfibrille da originare il fenomeno della birifrangenza. Questo modello consente anche di spiegare le notevoli proprietà di resistenza meccanica del tessuto osseo lamellare: le lamelle più ricche in microfibrille sarebbero infatti più plastiche e più adeguate ad assorbire urti e sollecitazioni meccaniche di tensione e di torsione, mentre quelle più ricche in minerale sarebbero più rigide e più adatte a sopportare senza deformarsi le forze di pressione applicate sul segmento osseo. Sovrapponendosi a strati, i due tipi di lamelle unirebbero le loro proprietà meccaniche realizzando un edificio leggero e straordinariamente resistente, secondo un principio costruttivo che ricorda quello dei cristalli infrangibili, in cui a strati di vetro, rigido ma fragile, si alternano strati di plastica, deformabile ma elastica.

Il tessuto osseo lamellare osteonico, come già accennato, costituisce la maggior parte dell'osso. Immaginati nelle 3 dimensioni, gli osteoni appaiono come delle lunghe strutture cilindriche, il cui asse longitudinale tende a disporsi parallelamente alle linee di forza applicate su un dato segmento osseo. Così il femore, che sostiene il peso del corpo ed è quindi soggetto a forze applicate in senso longitudinale, è formato in prevalenza da osteoni disposti parallelamente al suo asse maggiore. Analogamente, gli osteoni tendono a disporsi paralleli gli uni agli altri nei distretti scheletrici dove prevalgono forze di tensione. Le lamelle di questi osteoni appaiono costituite da microfibrille collagene che tendono ad orientarsi preferenzialmente in senso longitudinale, secondo una modalità che richiama il vecchio modello architetturale dell'osso lamellare. Per questi osteoni, particolarmente resistenti alla trazione, è stato proposto il termine di *osso lamellare osteonico a fibre parallele*.

Gli osteoni costituiscono unità funzionali e trofiche pressoché autonome, traendo il nutrimento per le loro cellule dal vaso sanguigno che percorre il canale di Havers. Di conseguenza, fenomeni di riassorbimento osseo che coinvolgano un'osteone influenzano solo marginalmente gli osteoni vicini. Sono tuttavia presenti anastomosi vascolari tra vasi sanguigni di osteoni contigui, sotto forma di rami che decorrono quasi ad angolo retto tra un vaso haversiano ed un altro, percorrendo canali scavati nella matrice ossea orientati perpendicolarmente ai canali di Havers, detti *canali di Volkmann*. Le lacune ossee della lamella più centrale comunicano tramite i loro canalicoli direttamente con lo spazio del canale di Havers mentre le lacune via via più periferiche aggettano tramite i canalicoli nelle lacune più centrali: in questo modo i metaboliti ed i gas respiratori possono scambiare tra i vasi haversiani e gli osteociti di tutte le lamelle, comprese quelle più periferiche. Per contro, le lacune della lamella più esterna di ogni osteone non sono connesse tramite canalicoli con quelle degli osteoni circostanti.

L'osso va incontro a continui processi di riassorbimento e deposizione di tessuto osseo, finalizzati ad adeguarlo in continuazione al carico meccanico applicato su di esso nonché a consentire la continua, fine regolazione della calcemia. Di conseguenza, gli osteoni preesistenti possono venire riassorbiti, in tutto o in parte, e nelle cavità che così si formano ne vengono deposti di nuovi. Gli interstizi tra osteoni contigui sono pertanto occupati da porzioni di precedenti osteoni residue da precedenti processi di riassorbimento, che nel loro insieme prendono il nome di *sistema interstiziale o breccia ossea*. I limiti degli osteoni e delle porzioni di breccia ossea sono evidenziati da sottili lamine, chiamate *linee cementanti*, al cui livello i canalicoli ossei si arrestano. La superficie esterna delle ossa mature, come pure la superficie del canale diafisario delle ossa lunghe, sono delimitate da un sottile strato di osso lamellare semplice, composto da alcune lamelle a decorso parallelo, che costituiscono, rispettivamente, il *sistema limitante*, o *circonfrenziale*, *esterno ed interno*.

Modificazioni morfo-funzionali del tessuto osseo

Il tessuto osseo è metabolicamente molto attivo. In esso coesistono continui processi di riassorbimento e di deposizione ossea, mirati ad adeguarne la struttura alle diverse e variabili sollecitazioni meccaniche a cui l'osso è sottoposto. Inoltre, ciò contribuisce alla regolazione dell'omeostasi del calcio, essendo il tessuto osseo la principale riserva di calcio dell'organismo, in equilibrio continuo con il calcio ione libero nel plasma. Le modificazioni morfo-funzionali del tessuto osseo vengono indicate con il termine di **rimaneggiamento osseo**, inteso come il risultato di fenomeni di riassorbimento e deposizione di osso rivelabili microscopicamente e che non comportano cambiamenti macroscopici della forma del segmento osseo coinvolto.

Il rimaneggiamento osseo inizia con il reclutamento di preosteoclasti, che vengono richiamati dal torrente circolatorio e vengono indotti a differenziarsi in osteoclasti nelle sedi dove deve

avvenire il riassorbimento di osso. Gli osteoclasti attivati disgregano la matrice ossea, aprendovi lunghe gallerie cilindriche dette *cavità di riassorbimento*. Questi eventi, come già detto in precedenza, richiedono la presenza e la partecipazione attiva degli osteoblasti e delle cellule endoteliali ossee. A loro volta, nuovi osteoblasti si differenziano dalle cellule osteoprogenitrici o dalle cellule di rivestimento quiescenti, aderiscono alle pareti delle cavità di riassorbimento e depongono strati successivi di osso, che formeranno le lamelle concentriche di un nuovo osteone. I residui delle precedenti generazioni di osteoni non completamente riassorbiti costituiscono la breccia ossea. Nell'uomo, già a partire dal primo anno di vita, viene depositato soltanto osso lamellare (cosiddetto *osso secondario*), che rimpiazza rapidamente i residui di osso fibroso depositato durante la vita intrauterina (cosiddetto *osso primitivo*, o *primario*).

La formazione di nuovo osso può essere messa in evidenza morfologicamente mediante la somministrazione *in vivo* di sostanze come il rosso di alizarina o le tetracicline, le quali si depositano nell'osso neofornato colorandolo. Somministrando queste sostanze in due momenti differenti e misurando lo spessore compreso tra le due bande ossee marcate, si è potuto calcolare che la velocità media di formazione è di circa 1 µm al giorno. Nel suo complesso, la genesi di un nuovo osteone richiede circa 4-5 settimane. È stato calcolato che, nell'uomo, il turn-over totale del tessuto osseo che forma lo scheletro avviene in media ogni 10 anni, con tempi più brevi nel giovane e tempi più lunghi nell'anziano.

Esaminando una sezione trasversale di osso lamellare è dunque possibile distinguere: 1) osteoni maturi, in cui l'attività di deposizione è giunta al termine; 2) osteoni nuovi in via di formazione, caratterizzati da un canale di Havers ampio e dalla presenza di osteoblasti disposti in fila lungo la superficie ossea che si affaccia sul canale; 3) cavità di riassorbimento, caratterizzate dalla presenza di osteoclasti adesi alle pareti ossee. Nell'individuo giovane, in cui i processi di rimodellamento e di rimaneggiamento sono molto vivaci, vi sono numerosi osteoni nuovi che coesistono con quelli maturi e svariate cavità di riassorbimento. Nell'adulto prevalgono gli osteoni maturi e l'osso appare assai compatto per la scarsità di cavità di riassorbimento. Nell'anziano invece, in cui l'equilibrio tra deposizione e riassorbimento di osso è spostato a favore di quest'ultimo, sono assai scarsi gli osteoni nuovi mentre abbondano le cavità di riassorbimento, molte delle quali non saranno riempite da nuovi osteoni. Pertanto, col progredire dell'età, si assiste ad una perdita progressiva di tessuto osseo, con riduzione della massa ossea totale, condizione conosciuta in medicina come *osteoporosi*, che comporta una maggiore fragilità delle ossa le quali divengono suscettibili alle fratture, spontanee o per traumi di modesta entità.

Istogenesi dell'osso

L'osso si sviluppa sempre per sostituzione di un preesistente tessuto, sia esso il mesenchima oppure un tessuto connettivo differenziato. I processi che portano alla genesi di tessuto osseo nel contesto di un altro tessuto prendono il nome, nel loro insieme, di **ossificazione**, od **osteogenesi**. Questi processi sono massimi durante la vita prenatale e rimangono sostenuti per tutto il periodo dello sviluppo somatico.

Si distinguono tre tipi fondamentali di ossificazione, e cioè:

- 1) *ossificazione diretta, o membranosa*
- 2) *ossificazione mantellare*
- 3) *ossificazione indiretta, o condrale*

L' **ossificazione diretta**, o **membranosa**, è tipica delle ossa piatte della volta cranica e di ossa del massiccio facciale, quali certe porzioni delle ossa mascellari e zigomatiche. Essa inizia da *centri di*

ossificazione che si sviluppano nel mesenchima, in fasi precoci della vita fetale, oppure in membrane di tessuto connettivo fibroso denso evolute dal mesenchima, in fasi più tardive della vita intrauterina e nella vita postnatale.

L'ossificazione diretta procede per fasi: 1) il primo evento morfologicamente riconoscibile è il differenziamento di una ricca trama vascolare; 2) accanto ai vasi sanguigni si ha il differenziamento di cellule mesenchimali in cellule osteoprogenitrici, le quali a loro volta si trasformano in osteoblasti: tale fenomeno è mediato dall'azione autocrina/paracrina delle BMP; 3) gli osteoblasti si dispongono in filiere simil-epiteliali, unendosi mediante giunzioni serrate, ed iniziano la deposizione della matrice organica dell'osso, o tessuto osteoide; 4) il tessuto osteoide va incontro a mineralizzazione, trasformandosi in osso fibroso; 5) via via che la deposizione di osso prosegue, i primi osteoblasti restano racchiusi in lacune ossee trasformandosi in osteociti, mentre nuovi osteoblasti si differenziano apponendosi alla superficie dell'osso neoformato, che si accresce progressivamente in spessore; 6) arrivano i preosteoclasti e si differenziano in osteoclasti, che avviano la dissoluzione dell'osso fibroso, che verrà successivamente rimpiazzato con osso lamellare da nuovi contingenti di osteoblasti. I residui delle membrane connettivali in cui si sono sviluppati i centri di ossificazione permangono tra le ossa piatte della volta cranica durante la vita infantile, costituendo le fontanelle e le suture. Esse hanno la funzione di consentire l'incremento del volume della scatola cranica per tutto il periodo dell'accrescimento.

L'**ossificazione mantellare** avviene a livello del corpo della mandibola. Essa può essere considerata una variante di ossificazione diretta, in quanto avviene nel contesto di un mesenchima e poi di un tessuto connettivo, seguendo le stesse tappe già descritte per l'ossificazione diretta. La peculiarità di questa modalità di ossificazione è che l'osso in formazione si modella attorno ad un abbozzo cartilagineo conformato a ferro di cavallo, detto *cartilagine del Meckel*, che deriva dal mesenchima del primo arco branchiale. Si ritiene che la cartilagine del Meckel svolga un'azione di induzione sulla differenziazione in senso osseo del mesenchima circostante. Tuttavia, a differenza di quanto avviene per gli abbozzi scheletrici cartilaginei nell'ossificazione indiretta, essa non ossifica, ma viene invece circondata completamente dal tessuto osseo ed infine involge; il vuoto che rimane viene colmato da tessuto osseo. Solo nella regione del mento un piccolo tratto della cartilagine del Meckel viene inglobato nella mandibola ed ossifica con meccanismo condrale.

L'**ossificazione indiretta**, o **condrale**, è la variante più diffusa, interessando tutte le restanti ossa dello scheletro assiale e degli arti nonché la base del cranio. Tipicamente, l'osso è preceduto da un abbozzo cartilagineo che richiama la forma del futuro segmento osseo e che viene successivamente riassorbito e rimpiazzato da tessuto osseo. Le ossa che si formano con tale modalità sono anche dette *ossa di sostituzione*. L'osso si forma sia alla superficie dell'abbozzo cartilagineo, apponendosi all'esterno tra cartilagine e pericondrio (*ossificazione pericondrale*) sia all'interno di questo (*ossificazione endocondrale*).

L'**ossificazione pericondrale** prende l'avvio da cellule osteoprogenitrici che si differenziano nel pericondrio, che si trasforma così in periostio. Si assiste all'incremento dei vasi del pericondrio, alla differenziazione di cellule osteoprogenitrici che si trasformano poi in osteoblasti, alla deposizione di tessuto osteoide che mineralizzando si trasforma in osso fibroso ed al rimaneggiamento di quest'ultimo da parte degli osteoclasti, con successiva deposizione di osso lamellare. Le fasi della ossificazione pericondrale avvengono secondo modalità che ricordano l'ossificazione mantellare attorno alla cartilagine di Meckel. La differenza principale è che in questa l'osso si forma attorno al pericondrio della cartilagine del Meckel, mentre nella ossificazione pericondrale l'osso si appone direttamente alla superficie della cartilagine, al di sotto del pericondrio che si trasforma in periostio.

Negli abbozzi delle ossa lunghe, l'ossificazione pericondrale inizia già durante la vita intrauterina, ancor prima della comparsa del centro di ossificazione endocondrale diafisario, attorno alla porzione mediana della diafisi. Ciò porta alla formazione di un *manicotto periostale* di tessuto osseo, che si accresce sia in senso radiale che in senso longitudinale avvicinandosi alle epifisi. Dopo la nascita, osso pericondrale viene depositato anche a ridosso delle epifisi delle ossa lunghe, nonché delle restanti ossa brevi e piatte.

L'**ossificazione endocondrale** prende l'avvio già durante la vita intrauterina dai cosiddetti *centri di ossificazione* e procede per fasi, schematizzabili come segue: 1) i condrociti del centro di ossificazione proliferano, riunendosi in gruppi isogeni voluminosi con scarsa sostanza intercellulare interposta; 2) i condrociti vanno incontro a ipertrofia: nel loro citoplasma compaiono gocce di grasso, accumuli di glicogeno e granulazioni PAS-positive simili ai globuli calcificanti degli osteoblasti; 3) i condrociti liberano vescicole della matrice e inducono la calcificazione della matrice cartilaginea, dopo di che vanno incontro ad apoptosi; 4) la matrice cartilaginea calcificata viene in parte erosa grazie all'intervento di cellule di natura osteoclastica, definite anche *condroclasti*, provenienti dal circostante osso periostale già formatosi, per cui le lacune cartilaginee si ampliano e confluiscono tra di loro; 5) in tali cavità penetrano vasi sanguigni che si fanno strada a partire dal pericondrio, accompagnati da cellule mesenchimali; 6) le cellule mesenchimali sopraggiunte coi vasi sanguigni si differenziano in cellule osteoprogenitrici e poi in osteoblasti, i quali depongono osso fibroso a ridosso dei residui della matrice cartilaginea calcificata; 7) intervengono gli osteoclasti, che riassorbono sia l'osso fibroso che la matrice cartilaginea mineralizzata, mentre nuovi osteoblasti depongono osso lamellare. Parte delle cellule mesenchimali penetrate assieme ai vasi sanguigni danno origine a nuovi vasi e al midollo osseo ematopoietico.

Ancor prima della nascita, nel centro della diafisi degli abbozzi cartilaginei delle ossa lunghe compaiono i *centri di ossificazione endocondrale primari, o diafisari*. Dopo la nascita, all'interno delle epifisi compaiono i *centri di ossificazione secondari, o epifisari*. Contemporaneamente a questi, si formano centri di ossificazione endocondrale anche al centro degli abbozzi delle restanti ossa brevi e piatte. Fatta eccezione per i segmenti scheletrici cartilaginei che non subiscono il processo di ossificazione (come ad es. la porzione sternale delle coste), la cartilagine viene progressivamente sostituita con osso. Nell'osso adulto, la cartilagine rimane solamente a livello delle superfici articolari (*cartilagine articolare, o di incrostazione*).

Accrescimento delle ossa

Grazie ai processi di crescita e di rimodellamento che persistono per tutto il periodo dell'accrescimento, i vari segmenti ossei assumeranno progressivamente la forma e le dimensioni definitive.

L'**accrescimento in lunghezza** delle ossa lunghe avviene grazie alla persistenza di tessuto cartilagineo proliferante a livello delle zone di transizione tra la diafisi e le epifisi. Questa cartilagine, detta *cartilagine di coniugazione*, presenta in successione topografica tutte le varie fasi che caratterizzano l'ossificazione endocondrale: si riconoscono infatti più strati adiacenti che, partendo dal versante epifisario, sono: 1) la *zona della cartilagine a riposo*, con piccoli gruppi isogeni di cellule globose; 2) la *zona della cartilagine proliferante*, detta anche *seriata*, in cui i condrociti proliferano dividendosi secondo un piano di clivaggio perpendicolare all'asse maggiore dell'osso; pertanto i gruppi isogeni sono formati da cellule disposte le une sulle altre in pile ordinate parallele all'asse maggiore dell'osso; l'accrescimento in lunghezza del segmento osseo è dovuto appunto all'attività proliferativa della cartilagine di questo strato; 3) la *zona della cartilagine ipertrofica*, con condrociti voluminosi infarciti di glicogeno e di lipidi; 4) la *zona della cartilagine calcificata*, i cui condrociti presentano segni di apoptosi, lasciando lacune vuote che

vengono occupate da gettoni vascolari con condroclasti e cellule mesenchimali che poi divengono cellule osteoprogenitrici; 5) la *zona di invasione ossea*, o *zona dell'osso neoformato*, in cui sono presenti osteoblasti che depongono osso fibroso a ridosso dei residui della matrice cartilaginea calcificata ed osteoclasti impegnati nei processi di riassorbimento. Al termine dell'accrescimento corporeo, la cartilagine di coniugazione rallenta e poi cessa la proliferazione, viene raggiunta dal fronte di ossificazione e viene completamente sostituita da osso (*chiusura delle epifisi*).

L'**accrescimento in larghezza** delle ossa avviene per apposizione di osso dal periostio. Nelle scabrosità della superficie esterna delle ossa si dispongono nuovi vasi sanguigni accompagnati da cellule mesenchimali. Queste si differenziano in osteoblasti, che formano osteoni primitivi di osso fibroso attorno ai vasi neoformati, che saranno successivamente sostituiti con osso lamellare. Al termine dell'accrescimento, alla superficie dell'osso vengono depositi alcuni strati di lamelle a decorso parallelo che costituiscono il sistema circonferenziale esterno. Nelle ossa lunghe, l'attività erosiva degli osteoclasti determina la formazione del canale diafisario, che si amplia progressivamente via via che il diametro della diafisi incrementa per apposizione di osso dal versante periostale. Pertanto l'osso compatto della diafisi è tutto di origine periostale. Quando l'osso ha raggiunto la taglia definitiva, da osteoblasti differenziatisi dall'endostio che riveste la superficie interna del canale diafisario vengono deposte le lamelle del sistema circonferenziale interno ed uno strato sottilissimo di osso trabecolare. Nelle ossa lunghe, la combinazione di riassorbimento osseo sul versante interno e di deposizione ossea sul versante esterno è anche responsabile del cambiamento di forma delle estremità diafisarie: durante la vita fetale ed infantile, queste hanno forma conica, poichè devono raccordare il diametro diafisario con quello assai maggiore delle epifisi; col tempo, questa sproporzione tra diafisi ed epifisi si attenua molto e le estremità diafisarie assumono progressivamente una forma pressoché cilindrica. Un meccanismo analogo può spiegare l'incremento del raggio di curvatura delle ossa piatte della volta cranica, che si ottiene dalla combinazione di fenomeni di erosione sul versante intracranico e di apposizione sul versante esterno. Questi fenomeni, che persistono per tutto il periodo dell'accrescimento corporeo e che sono il risultato di fenomeni di riassorbimento e deposizione di osso con cambiamenti macroscopici della forma del segmento osseo interessato, vengono indicati nel loro insieme come **rimodellamento osseo**. Rimodellamento può aver luogo anche in ossa completamente formate in risposta a intense e protratte sollecitazioni meccaniche, in corso di riparazione di fratture e in alcune malattie.

Fattori che influenzano la formazione dell'osso

Svariati fattori, prevalentemente di natura endocrina e metabolica, sono in grado di influenzare la formazione dell'osso.

Il **paratormone** (PTH), prodotto dalle ghiandole paratiroidi, agisce sugli osteoblasti stimolandone la proliferazione e promuovendone la differenziazione e le sintesi macromolecolari. Per il tramite degli OAF (*osteoclast activating factors*) osteoblastici, il paratormone promuove l'attivazione degli osteoclasti, e quindi il riassorbimento della matrice ossea e l'innalzamento della calcemia. Inoltre, il paratormone promuove il riassorbimento di ione calcio a livello renale, il che contribuisce all'effetto ipercalcemizzante dell'ormone.

La **calcitonina**, prodotta dalle cellule C, o parafollicolari, della tiroide, agisce sugli osteoclasti inibendone la funzione; ha azione ipocalcemizzante.

L'**ormone della crescita** (*growth hormone*, o GH), prodotto dalla ghiandola ipofisi, agisce sul fegato inducendovi la produzione di fattori di crescita detti *somatomedine*, i quali stimolano la crescita ed il metabolismo dei condrociti della cartilagine proliferante, promuovendo così

l'accrescimento dimensionale delle ossa. Difetti congeniti di produzione di ormone della crescita provocano il cosiddetto *nanismo ipofisario*, mentre l'eccesso di produzione di questo ormone durante lo sviluppo porta alla condizione opposta, nota come *gigantismo*. L'ormone della crescita agisce anche promuovendo il riassorbimento di calcio a livello renale, contribuendo pertanto all'omeostasi plasmatica di questo ione.

Gli **ormoni tiroidei** (tri- e tetraiodotironina, T3 e T4), prodotti dalle cellule follicolari della tiroide, sono capaci di promuovere il metabolismo cellulare e pertanto giocano un ruolo importante per stimolare la deposizione e la maturazione dell'osso. Anomalie di produzione di ormoni tiroidei durante lo sviluppo portano a malformazioni ossee di vario grado, fino al cosiddetto *nanismo tiroideo*.

Gli **ormoni sessuali** (estrogeni, testosterone), che iniziano a prodursi dalle gonadi al momento della pubertà, hanno un'azione positiva sulla differenziazione e sulla attività funzionale degli osteoblasti, promuovendo il turn-over dell'osso. Al termine dell'accrescimento, essi esercitano altresì una azione inibitoria sulla crescita dei condrociti della cartilagine proliferante, promuovendo la chiusura delle epifisi e l'arresto dell'accrescimento osseo. E' peraltro noto che tra i fattori che condizionano la statura di un individuo vi è anche il momento di avvio dello sviluppo puberale. Gli estrogeni in particolare sembrano essere coinvolti nei processi di deposizione ossea: tra l'altro, essi controllano l'espressione renale dell'enzima che attiva la vitamina D (vedi di seguito) e sarebbero in grado di stimolare la proliferazione degli osteoblasti e di promuovere la morte cellulare programmata degli osteoclasti, come emerge da esperimenti *in vitro*. Questi reperti potrebbero contribuire a spiegare la ragione per cui dopo la menopausa, venendo meno l'azione di stimolo sugli osteoblasti e di freno sugli osteoclasti esercitata dagli estrogeni, si ha una progressiva riduzione della massa ossea con l'eventuale affermazione di un quadro clinico di osteoporosi.

La **vitamina D** è una vitamina liposolubile che viene in parte assunta con la dieta (vitamina D2, o ergocalciferolo) ed in parte sintetizzata endogenamente a partire da un precursore steroideo, il 7-deidrocolesterolo, che viene convertito a vitamina D3 (o colecalciferolo) ad opera dell'azione fotochimica delle radiazioni UVB che impattano sulla cute. Entrambe le isoforme subiscono modifiche chimiche, che constano nell'aggiunta di un primo ossidrile a livello epatico, e di un secondo ossidrile a livello renale. Il metabolita che così viene a formarsi, detto 1,25-diidrossicalciferolo, è quello principalmente responsabile dell'attività biologica della vitamina D. Le azioni della vitamina D si esplicano a vari livelli: sull'osso, essa promuove la differenziazione degli osteoblasti, che possiedono specifici recettori, stimolando la produzione di matrice ossea e la deposizione di calcio nelle ossa; a livello intestinale, essa promuove l'assorbimento di calcio, mentre a livello renale inibisce l'escrezione di questo ione. Una carenza di vitamina D porta a una difettosa mineralizzazione delle ossa che tendono a deformarsi sotto il carico meccanico: questa condizione clinica è nota come *rachitismo* quando insorge durante l'accrescimento e come *osteomalacia* quando insorge durante la vita adulta.

La **vitamina C** è una vitamina idrosolubile che agisce come importante coenzima per la sintesi del collagene. Essa è un cofattore per gli osteoblasti impegnati nella biosintesi del collagene della matrice ossea. Deficit gravi di vitamina C, come avviene nello *scorbuto*, portano a produzione insufficiente di collagene con conseguente ritardo nella crescita e difficoltà nella riparazione delle fratture.

La **vitamina A** è una vitamina liposolubile capace di agire sugli osteoblasti riducendone la proliferazione ed incrementando l'espressione dei recettori per la vitamina D. Essa agisce pertanto come fattore differenziante per gli osteoblasti. La carenza di questa vitamina provoca ritardo nella crescita delle ossa. Per contro, un suo eccesso causa la precoce chiusura delle epifisi con arresto

premature della crescita.

L'**ossigeno** molecolare sembra giocare un ruolo importante per la formazione dell'osso non solo in quanto indispensabile per la fosforilazione ossidativa, ma anche come fattore di stimolo sulle cellule ossee. E' degno di nota che, in ogni tipo di ossificazione, la differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule osteoprogenitrici e poi in osteoblasti avviene in stretta concomitanza con la genesi di nuovi vasi sanguigni, che possono assicurare una elevata pressione parziale di ossigeno nelle sedi dove avviene formazione di osso. Questo può spiegare l'effetto benefico sull'osteogenesi prodotto dalla ossigenoterapia iperbarica, che vede tra le sue indicazioni d'uso i ritardi di consolidamento delle fratture e l'osteoporosi.

L'**ossido nitrico** (NO) è un radicale gassoso prodotto da molte cellule, incluse le cellule endoteliali. Recentemente, è stato dimostrato che esso è capace di indurre la differenziazione degli osteoblasti. E' pertanto verosimile che il ruolo dell'endotelio vasale nei processi di osteogenesi possa essere almeno in parte mediato tramite la liberazione di ossido nitrico.

Bibliografia essenziale

- Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology. Academic Press, San Diego , USA , 1996
- Boskey AL. Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. Bone Min 6: 111, 1989
- Canalis E *et al.* Growth factors and the regulation of bone remodeling. J Clin Invest 81: 277, 1988
- Dickson GR. Methods of calcified tissue preparation. Elsevier, Amsterdam , NL, 1984.
- Formigli L *et al.* Cell-to-cell interactions in bone tissue. NY Acad Sci 673: 120, 1992
- Formigli L *et al.* In vitro structural and functional relationships between preosteoclastic and bone endothelial cells: a juxtacrine model for migration and adhesion of osteoclast precursors. J Cell Physiol 162: 199, 1995
- Glimcher MA *et al.* Macromolecular aggregation states in relation to mineralization: the collagen-hydroxyapatite system as studied in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 43: 860, 1957.
- Hancock NM . Biology of bone. University Press, Cambridge , UK , 1972
- Henry HL, Norman AW. Vitamin-D metabolism and biological activities. Ann Rev Nutrition 4: 493, 1984
- Holtrop ME. The ultrastructure of bone. Am J Clin Lab Sci 5: 264, 1975
- Little K. Bone behaviour. Academic Press , New York , USA , 1973
- Mann S. Molecular recognition in biomineralization. Nature 332: 119, 1988
- Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: regulation of development, structure and function in the skeleton. Am J Anat 183: 1, 1988
- Marotti G, Muglia MA. A scanning electron microscope study of human bony lamellae. Proposal for a new model of collagen lamellar organization. Ital J Anat Embryol 93: 163, 1988
- Marotti G. A new theory of bone lamellation. Calcif Tissue Int 53 (Suppl. 1): S47, 1993
- Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. Ital J Anat Embryol 101: 25, 1996
- Mbuyi-Muamba JM, Dequeker J, Gevers G. Collagen and non-collagenous proteins in different mineralization stages of human femur. Acta Anat 134: 265, 1989
- Owen M. Histogenesis of bone cells. Calcif Tissue Res 25: 205, 1978
- Raisz LG, Kream BE. Hormonal control of skeletal growth. Annu Rev Physiol 43: 225, 1981
- Scheven BA *et al.* In vitro osteoclast generation from different bone marrow fractions, including a highly enriched hemopoietic stem cell population. Nature 321: 79, 1986
- Urist MR *et al.* Bone cell differentiation and growth factors. Science 220: 680, 1983
- Zipkin I. Biological mineralization. J Wiley & Sons, New York , USA , 1973