

# Base Biológica da Regeneração Óssea

Dieter D. Bosshardt

Robert K. Schenk

Tanto para estética como para um resultado funcional bem-sucedido, uma quantidade suficiente de osso vital é necessária para a colocação de um implante endo-ósseo nos maxilares. Em cerca de 50% dos sítios para os implantes, entretanto, existe a necessidade de um procedimento que gere com previsibilidade volume ósseo suficiente para a colocação do implante dentário. Existem diversas opções para melhorar a formação óssea, incluindo (1) a osteoindução pelos enxertos ósseos ou fatores de crescimento; (2) osteocondução pelos enxertos ósseos ou substitutos ósseos que servem de arcabouço para a neoformação óssea; (3) transferência de células-tronco ou células progenitoras que se diferenciam em osteoblastos; (4) distração osteogênica; e (5) regeneração óssea guiada (ROG) com membranas. Independentemente do método usado, sempre existe um mecanismo básico de cicatrização óssea.

O tecido ósseo tem um potencial singular de regeneração, o que é provavelmente melhor ilustrado pelo reparo da fratura. O osso é capaz de cicatrizar fraturas ou defeitos locais com tecido regenerado, ou regenerar com organização estrutural muito similar sem deixar cicatrizes. O mecanismo deste padrão de cicatrização é considerado normalmente uma recapitulação da osteogênese e crescimento embrionário. Já que o osso possui a capacidade de cicatrização espontânea, o truque na cirurgia reconstrutiva é aumentar este potencial regenerativo melhorando a formação óssea para aplicações clínicas. Assim, o aumento ósseo adequado ou tratamento de qualquer defeito ósseo requer um entendimento profundo do desenvolvimento e morfogênese ósseos em níveis celular e molecular. Este capítulo resumirá o desenvolvimento, estrutura, função, bioquímica e a biologia celular do osso, fornecendo a base biológica para a discussão do padrão de cicatrização na ROG.

## Desenvolvimento e Estrutura do Osso

### Funções

O osso certamente é uma aquisição superior na evolução dos tecidos de suporte. Entretanto, ele possui funções muito além da sustentação. Estas funções incluem (1) suporte mecânico, movimento, e locomoção; (2) suporte dentário para mastigação e quebra dos alimentos; (3) suporte e proteção do cérebro, medula espinhal e órgãos internos; (4) alojamento da medula óssea, que é a fonte de células hematopoiéticas; e (5) homeostasia do cálcio.

Provavelmente, é devido a estas funções vitais importantes que o osso possui uma capacidade excepcional de autocicatrização, reparo e regeneração.

## Esqueletogênese

Da cabeça aos pés, o osso está presente em todo o organismo em diversos sítios anatômicos. A sua estrutura não é homogênea porque o osso é adaptado para os diversos requisitos funcionais específicos. O esqueleto dos mamíferos consiste de ossos longos e ossos achatados, e se desenvolve a partir de duas fontes embrionárias – o mesoderma nos somitos e os arcos braquiais. A formação óssea depende de dois pré-requisitos: suprimento sanguíneo amplo e suporte mecânico.

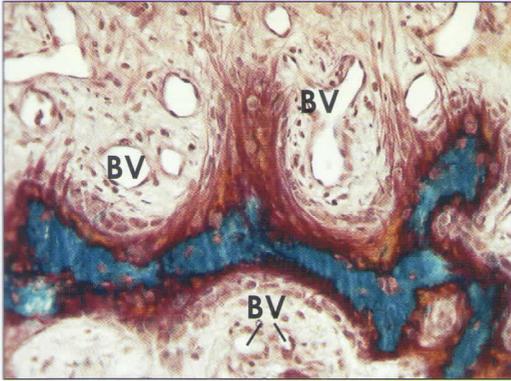
Existem dois modos diferentes de ossificação: intramembranosa e condral (endocondral). No caso da ossificação direta ou intramembranosa, o tecido conjuntivo serve de gabarito para a deposição da matriz óssea. Na ossificação indireta ou endocondral, a cartilagem forma um modelo que, depois da calcificação, serve de base sólida, sendo coberta primeiro e depois substituída pelo osso. A ossificação endocondral ocorre na cartilagem em fase de crescimento.

No desenvolvimento embrionário, o formato ósseo individual é elaborado tanto direta como indiretamente. Nos períodos de crescimento fetal e pós-natal, os ossos passam por três mudanças: (1) crescimento em comprimento e diâmetro, (2) refinamento da forma pelo modelamento periosteal e endosteal, e (3) remodelamento. (Os termos *modelamento e remodelamento* geralmente causam confusão. O modelamento indica uma mudança na forma, enquanto o remodelamento refere-se à substituição tecidual ou substituição sem mudança na arquitetura). Assim, modelamento e remodelamento são processos importantes não apenas no esqueleto maduro, mas também durante o desenvolvimento e crescimento ósseos. Basicamente, a diáfise dos ossos longos cresce em diâmetro por deposição periosteal e reabsorção endosteal. Ainda, o modelamento da forma também é controlado pelas mudanças na taxa de deposição da matriz.

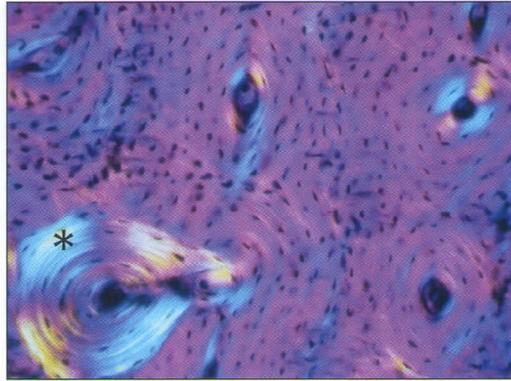
## Tipos e organização estrutural

Com base na orientação das fibrilas de colágeno, três tipos de tecido ósseo podem ser identificados: matriz osteoide, osso lamelar e um tipo intermediário – o osso primário com fibras paralelas.

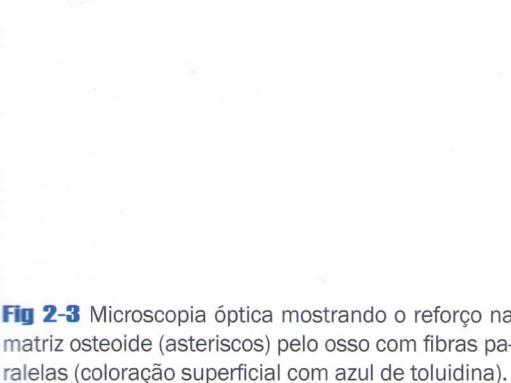
A matriz osteoide é formada predominantemente no embrião e crianças em fase de crescimento, mais tarde sendo substituída pelo osso lamelar. No adulto, a matriz osteoide reaparece quando uma formação óssea acelerada é necessária, como no calo ósseo durante o reparo da fratura, e em condições patológicas como a doença de Paget, osteodistrofia renal, hiperparatireoidismo ou fluorose dental. Na matriz osteoide, as fibrilas colágenas estão orientadas aleatoriamente. Os espaços interfibrilares são comparativamente amplos.<sup>1</sup> Além das fibrilas colágenas entrelaçadas, a matriz osteoide é caracterizada por muitos osteócitos extensos e alta densidade mineral (Fig. 2-1).



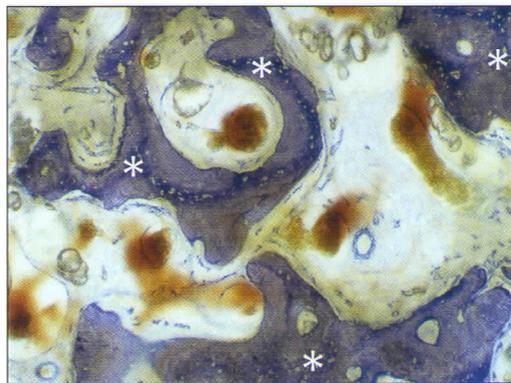
**Fig 2-1** Microscopia óptica da matriz osteoide. Esse tipo de osso é capaz de formar traves e ponte, sempre associadas ao suprimento sanguíneo (BV) (coloração com tricrômico de Goldner).



**Fig 2-2** Ósteons primários e secundários no osso cortical equino. Sob luz polarizada, os ósteons secundários (asterisco) revelam um padrão lamelar claro. A parede dos ósteons primários consiste de osso primário com fibras paralelas, que é menos birrefringente.



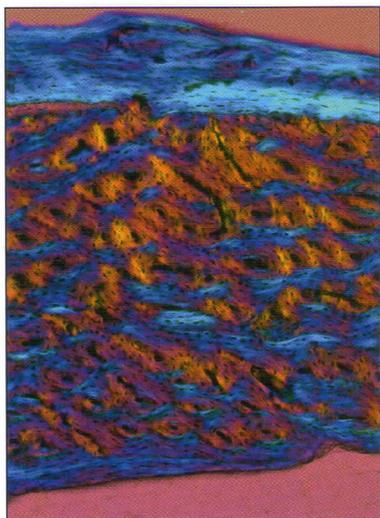
**Fig 2-3** Microscopia óptica mostrando o reforço na matriz osteoide (asteriscos) pelo osso com fibras paralelas (coloração superficial com azul de toluidina).



O osso lamelar possui uma estrutura mais complexa, caracterizada pelas camadas de matriz que consistem de fibrilas colágenas paralelas. Uma unidade lamelar tem 3 a 5  $\mu$ m de extensão, e a orientação das fibrilas muda de uma lamela para outra (Fig 2-2). Assim, o osso lamelar pode ser considerado uma estrutura compensada folheada complexa.<sup>2</sup>

O osso primário com fibras paralelas é depositado nos estágios iniciais da formação óssea, assim como durante a aposição óssea periosteal e endosteal. Suas fibrilas de colágeno correm paralelas à superfície óssea, mas não possuem organização lamelar (Fig 2-3). O osso primário de fibras paralelas compartilha muitas propriedades fisiológicas com o osteoide.

O osso maduro é formado pelos ossos cortical (compacto) e medular (trabecular ou esponjoso). Com base na orientação das lamelas, a matriz óssea cortical é subdividida em diversos compartimentos. As unidades estruturais básicas são os ósteons (ou sistemas de Havers), estruturas cilíndricas longitudinalmente orientadas com canais vasculares (haversianos) no centro. Nos ósteons secundários, a parede consiste de lamelas concêntricas, enquanto os ósteons primários são caracterizados por uma matriz óssea mais primitiva com fibras paralelas (veja a Fig 2-2). Ao longo das superfícies periosteais e endosteais, o crescimento aposicional geralmente resulta em conjuntos



**Fig 2-4** Luz polarizada do osso cortical de uma tíbia de coelho. Ósteons ao redor dos canais haversianos são aprisionados entre as lamelas circunferenciais das superfícies periosteais (acima) e endosteais (abaixo).



**Fig 2-5** Os ósteons são unidades metabólicas. A coloração dos osteócitos demonstra o sistema canaliculolacunar (asterisco). O fragmento necrótico de um ósteon depois da obliteração do canal haversiano (corte não descalcificado; coloração com fucsina básica).

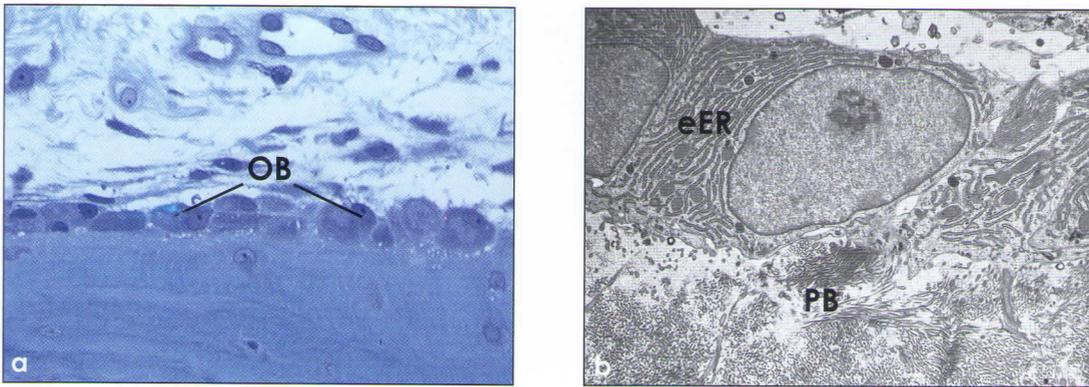
de lamelas circunferenciais (Fig 2-4). Remanescentes das lamelas circunferenciais e das primeiras gerações de ósteons ocupam o espaço remanescente como lamelas intersticiais. Os osteócitos dentro destes remanescentes da atividade remodeladora cortical em geral ficam sem suprimento vascular e morrem (Fig 2-5).

As trabéculas ósseas esponjosas também são compostas por unidades estruturais ósseas, isto é, conjuntos ou paredes, separadas (ou unidas) pelas linhas de cimento. Elas também refletem o remodelamento local nos primeiros períodos de crescimento e renovação do osso medular<sup>4</sup> (veja a discussão sobre o modelamento e remodelamento do osso medular no final deste capítulo).

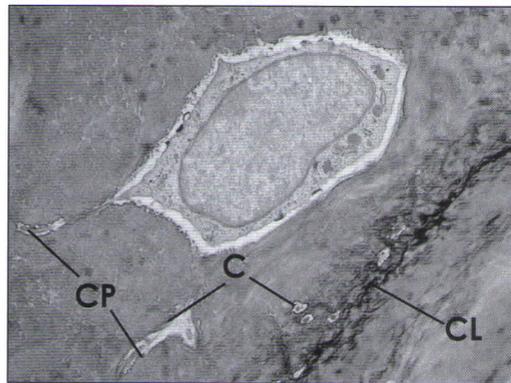
## Células ósseas

A formação, manutenção e o reparo ósseo são controlados por quatro tipos diferentes de células. Osteoblastos, células que revestem o osso, e osteoclastos, que cobrem as superfícies ósseas, enquanto os osteócitos são encontrados dentro da matriz óssea. Um pré-requisito para a formação e sobrevivência óssea é o suprimento sanguíneo adequado. Assim, a angiogênese é um pré-requisito necessário não apenas ao desenvolvimento ósseo, mas também para reparo e manutenção.

Os osteoblastos são células cuboidais extensas que formam uma camada única recobrindo todo o periósteo e endósteo onde a formação óssea está ativa.<sup>5</sup> Eles são células polarizadas que secretam osteoide unidirecionalmente para a superfície óssea. O núcleo do osteoblasto é ovoide, e seu citoplasma preenchido por retículo endoplasmático rugoso abundante, e um complexo Golgiense proeminente (Fig 2-6). A heterogeneidade entre os osteoblastos parece existir e pode refletir diferenças entre os tipos de osso e/ou sítios anatômicos.<sup>6</sup> O osteoblasto é responsável pela síntese, montagem e mineralização da matriz óssea.



**Fig 2-6** (a) Microscopia óptica mostrando a monocamada de osteoblastos (OB) que reveste a matriz óssea (coloração com azul de toluidina). (b) Eletromicrografia de transmissão mostrando os osteoblastos com retículo endoplasmático rugoso abundante (eER) revestindo o osteoide ou pré-osso (PB).

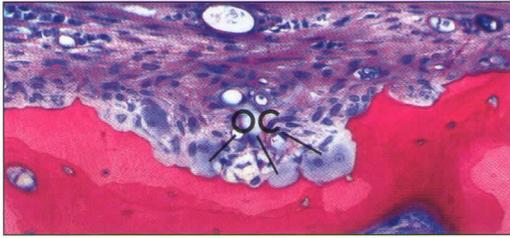


**Fig 2-7** Eletromicrografia de transmissão mostrando um osteócito embebido na sua lacuna próxima à linha cementoide (CL). Canaliculos cortados longitudinal e transversalmente (C) contendo processos citoplasmáticos (CP) são visíveis próximos ao osteócito.

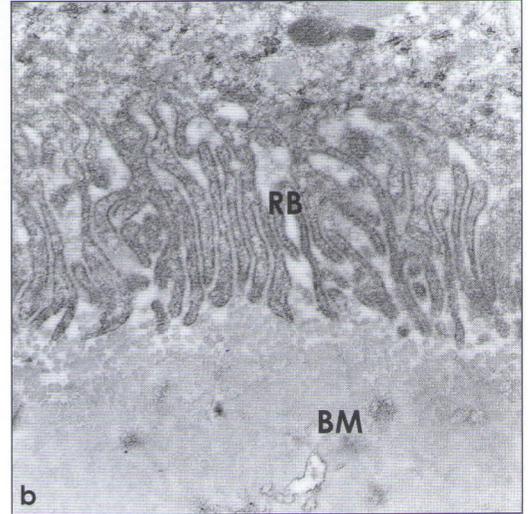
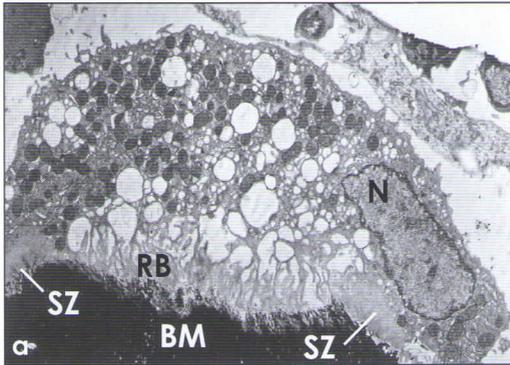
Alguns osteoblastos tornam-se osteócitos pela inversão da secreção da matriz ou pelo aprisionamento através dos osteoblastos adjacentes.<sup>5</sup> A velocidade de deposição da matriz pode determinar o número de osteócitos embebidos.<sup>7</sup> Isto é exemplificado na matriz osteoide, que é formada muito mais rápido do que qualquer outro osso e possui muitos osteócitos embebidos.<sup>8</sup>

O **osteócito** fica aprisionado na matriz óssea dentro de uma lacuna (Fig 2-7), e os osteócitos adjacentes ficam interconectados por processos citoplasmáticos delgados estendendo-se através de um sistema canaliculolacunar denso. Este sistema canaliculolacunar permite a difusão dos metabólitos e moléculas sinalizadoras para comunicação celular com os osteócitos adjacentes, osteoblastos e células que depositam osso. Ele é indispensável para a sobrevivência do osteócito porque a difusão de nutrientes e subprodutos pela matriz óssea densamente mineralizada é quase impossível. Entretanto, a capacidade de transporte do sistema também possui limitações. Nos mamíferos, a distância crítica de transporte para manter os osteócitos vivos é 100  $\mu\text{m}$ .<sup>9</sup> Isto explica porque a espessura da parede dos ósteons e conjuntos no sistema trabecular raramente excedem os 100  $\mu\text{m}$ . Os osteócitos podem participar ativamente na homeostasia óssea pelo seu envolvimento na renovação, troca iônica e captação de sinais mecânicos.<sup>10</sup>

A célula que reveste o osso é o terceiro tipo celular pertencente à família do osteoblasto. Ela é considerada um osteoblasto inativo cobrindo a superfície óssea. As



**Fig 2-8** Microscopia óptica mostrando osteoclastos (OC) nas lacunas de Howship formadas no osso alveolar (coloração com fucsina e azul de toluidina).

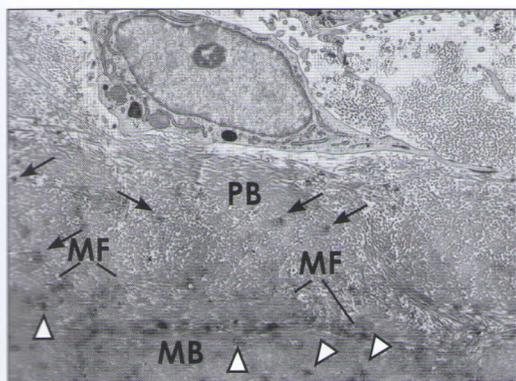


**Fig 2-9** (a) Microscopia eletrônica de transmissão mostrando um osteoclasto com a borda ondulada (RB), a zona de selamento (SZ) e numerosas mitocôndrias, vesículas e vacúolos, mas sem perfil nuclear (N). A borda ondulada representa o sítio de dissolução e degradação da matriz óssea (BM) (corte ultrafino não descalcificado). (b) Microscopia de transmissão aumentada na borda ondulada (RB) e a matriz óssea (BM) (corte ultrafino não descalcificado).

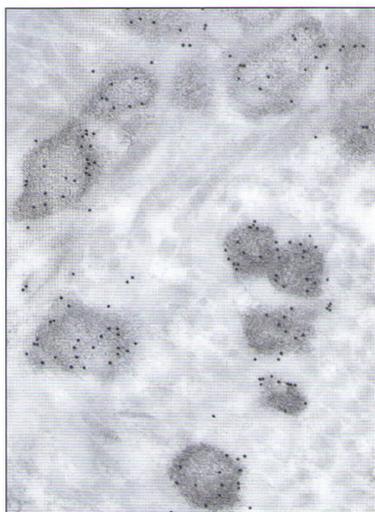
células que revestem o osso são achatadas e possuem um armamentário reduzido de organelas citoplasmáticas, indicativo de baixa atividade, tanto no metabolismo como na síntese proteica. Também são chamadas de *células inativas* ou *osteoblastos em repouso*. Estas células podem participar no início da reabsorção pela liberação de fatores de ativação de osteoclastos e pela contração ativa, tida como a exposição da superfície óssea para adesão dos osteoclastos.<sup>11</sup>

**Os osteoclastos** são células da linhagem hematopoiética dos monócitos-macrófagos.<sup>12</sup> A sua função primária é degradar a matriz óssea em diversos contextos fisiopatológicos. Eles diferem das outras células gigantes, em especial das células gigantes de corpo estranho, e são identificados convencionalmente pela sua localização numa cavidade resorptiva, a lacuna de Howship (Fig 2-8). Além disso, são amplos e multinucleados, corando-se positivamente para a fosfatase ácida tartarato-resistente.<sup>13</sup> Outras características singulares são a presença de diversos receptores na superfície das células, incluindo aqueles para o ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANK), fatores para estimuladores de colônias de macrófagos, vitronectina e calcitonina. O seu tamanho varia de 30 a 100  $\mu$ m e o número de núcleos, de 3 a 30.

O citoplasma é acidófilico e geralmente contém vacúolos (Fig 2-9a). A área marginal do osteoclasto adere-se à superfície mineralizada e sela a câmara de reabsorção com a zona denominada zona de selamento (zona clara). Na porção central des-



**Fig 2-10** Eletromicrografia de transmissão mostrando osteoblasto, osteoide ou pré-osso (PB), na frente de mineralização (MF) e a matriz óssea mineralizada (MB). Os focos de mineralização (setas) e as “placas cinzas” (cabeças de seta) são visíveis no osteoide e matriz óssea mineralizada respectivamente.



**Fig 2-11** Imunohistoquímica de alta resolução mostrando uma associação entre a marcação com partículas de ouro para osteopontina e os focos de mineralização no osteoide.

ta câmara, a superfície celular fica aumentada pelas diversas dobras citoplasmáticas que formam a borda ondulada (Fig 2-9b). Pela membrana celular aumentada, íons de hidrogênio e enzimas proteolíticas são liberadas para dissolver os cristais minerais e degradar a matriz óssea orgânica.

## Matriz óssea

### Deposição e mineralização

O osteoblasto sintetiza uma mistura de macromoléculas que são secretadas no ambiente extracelular para formar a matriz óssea – o osteoide ou pré-osso – que consiste de uma matriz feita de proteínas colagenosas e não colagenosas. À certa distância do osteoblasto, na frente de mineralização, o osteoide converte-se em osso mineralizado. A mineralização da matriz osteoide é iniciada pelas suas vesículas. Em contraste, as vesículas da matriz raramente são vistas no osteoide do osso lamelar em mineralização. Entretanto, o primeiro mineral que surge entre as fibrilas de colágeno pode ser encontrado em pequenos locais discretos distribuídos dentro do osteoide se acumulando na frente de mineralização (Fig 2-10). A co-localização das proteínas não colagenosas como a osteopontina (Fig 2-11) e sialoproteína óssea dentro destes pequenos locais de mineralização, e como placas amorfas cinzas ou reticulares de osso mineralizado indicam a associação destas proteínas com o processo de mineralização. A glicoproteína acídica óssea 75 e a osteocalcina, por outro lado, mostram uma distribuição difusa em toda a matriz óssea mineralizada.<sup>14</sup>

## Constituintes

A matriz óssea é um composto biológico que consiste de água, mineral, colágenos e macromoléculas não colágenas, sendo estas referidas como proteínas não colagenosas. A composição bioquímica do osso foi revisada recentemente.<sup>15-19</sup> Os colágenos possuem um papel estrutural e morfogenético.<sup>20</sup> Nos tecidos mineralizados, eles interagem com diversas proteínas não colágenas e fornecem um arcabouço para a acomodação dos cristais minerais.<sup>21</sup> As proteínas não colagenosas ósseas podem ser classificadas resumidamente em glicoproteínas, proteoglicanos, proteínas derivadas do plasma, fatores de crescimento e outras macromoléculas. Além de ter uma função estrutural, a matriz óssea armazena macromoléculas que desempenham papéis na biomineralização e interações célula-matriz, que servem de reservatório para os fatores de crescimento e citocinas.

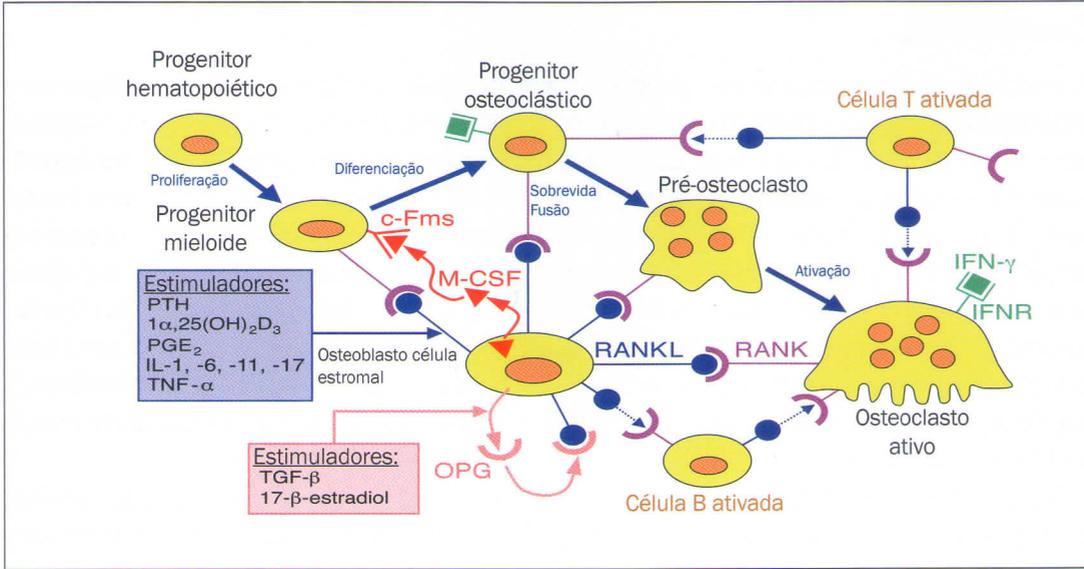
Durante o reparo tecidual, os fatores de crescimento e diferenciação não apenas podem ser produzidos pelas células locais, mas também liberados da matriz mineralizada. A opinião comum é que os fatores de crescimento liberados da matriz óssea mineralizada, no processo de reabsorção dos osteoclastos, exercem suas funções em células locais. Os fatores de crescimento presentes na matriz óssea incluem os fatores de crescimento semelhantes à insulina, fatores de crescimento para fibroblastos, fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento derivado de plaquetas.

De grande interesse com relação à regeneração óssea, mas também para a formação óssea heterotópica (de novo), é a superfamília do TGF- $\beta$ . Os membros desta família são fatores solúveis que controlam o desenvolvimento embrionário, morfogênese e uma variedade de respostas funcionais, incluindo a proliferação, diferenciação e apoptose celular, como também o ciclo celular. A sua ação depende não apenas do tipo celular, mas das citocinas e de outros fatores de crescimento no ambiente local.

## Osteoblastos

Os osteoblastos originam-se das células-tronco mesenquimais da medula óssea.<sup>22</sup> A diferenciação das células da linhagem osteoblástica é controlada por diversos fatores de transcrição em vários estágios do desenvolvimento. O fator de ligação ao núcleo  $\alpha 1$  (Cbf $\alpha 1$ ), também conhecido como fator de transcrição relacionado ao runt 2 (Runx2) e osterix (Osx), derivado do Cbf $\alpha 1$ , é a chave-mestra para a diferenciação osteoblástica.<sup>23</sup> A expressão de Cbf $\alpha 1$  não está restrita às células da linhagem osteogênica e condrogênica,<sup>24,25</sup> e a expressão do Cbf $\alpha 1$  em células totalmente diferenciadas sugere papéis adicionais na função osteoblástica.

Durante a vida, o esqueleto passa pelo remodelamento contínuo, servindo de motivo para o reparo e adaptação mecânicos. As consequências de um desequilíbrio na expressão das moléculas sinalizadoras são as desordens metabólicas ou doenças como a de Paget, osteopetrose, osteoporose, artrite ou perda óssea na periodontite.<sup>26,27</sup> O controle do remodelamento ósseo está sob a influência local e sistêmica. Os fatores locais agem de modo autócrino e parácrino, e os osteoblastos osteoclastos e células imunes e inflamatórias funcionam como fontes de alvos das moléculas sinalizadoras. Diversas citocinas e fatores de crescimento possuem efeitos anabólicos e/ou catabólicos na formação óssea.<sup>28,29</sup> Dentre estas moléculas osseocontroladoras estão o hormônio paratireoideano, o peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide, calcitonina,



**Fig 2-12** Sistema RANK-RANKL-OPG. (PTH) hormônio da paratireoide; ( $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ )  $1\alpha, 25$ -diidroxivitamina  $\text{D}_3$ ; ( $\text{PGE}_2$ ) prostaglandina  $\text{E}_2$ ; (IL-1) interleucina-1; (IL-6) interleucina 6; (IL-11) interleucina 11; (IL-17) interleucina 17; (TNF- $\alpha$ ) fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; (M-CSF) fator estimulador de colônias de macrófagos; (c-Fms) receptor do M-CSF; (RANK) ativador do receptor para o fator nuclear  $\kappa\text{B}$ ; (RANKL) ligante do RANK; (IFN- $\gamma$ ) interferon- $\gamma$ ; (IFNR) receptor do IFN- $\gamma$ ; (TGF- $\beta$ ) fator de crescimento transformador  $\beta$ ; (OPG) osteoprotegerina.

calcitriol (a forma ativa da vitamina D), prostaglandina  $\text{E}_2$ , hormônio de crescimento, hormônio da tireoide, esteroides sexuais (estrógeno e testosterona), leptina, estatinas, interferon  $\gamma$ , fator de necrose tumoral  $\alpha$ , fator de crescimento transformador  $\alpha$ , fator de crescimento semelhante à insulina 1, fatores de crescimento derivados das plaquetas, e as interleucinas 1, 6, 11 e 17.

## Osteoclastos

Diferente dos osteoblastos, os osteoclastos se originam-se das células-tronco hematopoiéticas.<sup>12</sup> É natural que muitos fatores de crescimento e de transcrição envolvidos na diferenciação hematopoiética de outras células também afetem a diferenciação osteoclastica.<sup>23</sup>

O remodelamento ósseo normal depende de um equilíbrio delicado entre a formação e reabsorção ósseas. A reabsorção óssea é controlada pelo sistema que consiste do **RANK** e seu ligante (**RANKL**), ambos membros da famílias de ligantes e receptores do fator de necrose tumoral, e da osteoprotegerina (OPG) (Fig 2-12). O RANKL é expresso pelas células estromais da medula óssea, osteoblastos e determinados fibroblastos, enquanto o RANK é expresso pelos precursores osteoclastícos e osteoclastos maduros. **A ligação do RANK ao RANKL induz a diferenciação e atividade osteoclastica, controlando a sobrevivência do osteoclasto.** A OPG, entretanto, que é produzida pelas células estromais da medula óssea, osteoblastos e certos fibroblastos, é um fator chamariz solúvel para a RANKL e compete pela sua ligação. Assim, a OPG é um inibidor natural da diferenciação e ativação osteoclasticas.

Qualquer interferência no sistema pode mudar o equilíbrio entre aposição e reabsorção ósseas. A expressão do fator estimulador de colônias para macrófagos desempenha um papel essencial no sistema regulatório. Além disso, diversas citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, em particular a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$ , controlam a expressão de RANKL e OPG. O sistema imunológico modifica o equilíbrio entre a formação e reabsorção ósseas num processo complexo envolvendo linfócitos T e B, células dendríticas e citocinas. Pela expressão do RANKL nas células B, células T, células estromais da medula e expressão do RANK nos precursores osteoclasticos, osteoclastos maduros, linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas, estas células podem influenciar diretamente na reabsorção óssea.<sup>30-32</sup>

A descoberta deste importante sistema regulador, que liga a biologia óssea à imunologia celular, tem criado a possibilidade de novas estratégias terapêuticas. Tentativas de uso da OPG recombinante foram bem-sucedidas na prevenção da reabsorção e perda ósseas. Entretanto, a produção de titulações significativas de anticorpos num paciente que recebeu OPG gerou a finalização precoce deste desenvolvimento. Outra maneira de bloquear a sinalização RANK é por meio do uso do denosumab, um anticorpo monoclonal humano contra a RANKL. Ensaio clínico estão atualmente explorando seus efeitos na perda óssea em pacientes com osteoporose, metástase óssea, mieloma e artrite reumatoide.<sup>33</sup>

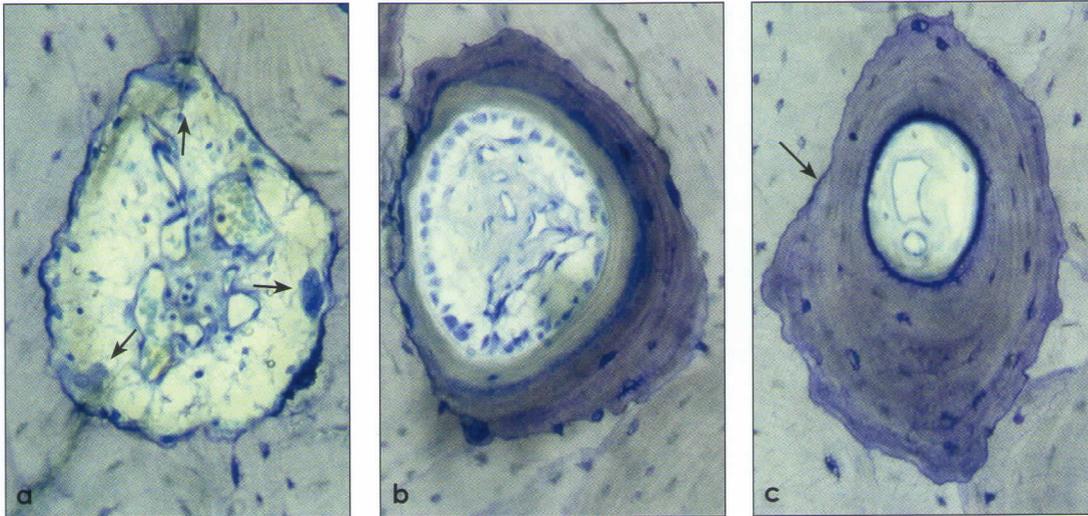
## ■ Manutenção Óssea

O modelamento e remodelamento ósseos continuam após a finalização do crescimento. As moléculas sinalizadoras envolvidas no controle da diferenciação e atividade celulares já foram discutidas. O objetivo desta seção é discutir os aspectos morfológicos do modelamento e remodelamento ósseos após a finalização do desenvolvimento e crescimento. O remodelamento do osso cortical pode ser distinguido do remodelamento trabecular. Ambos os tipos sofrem remodelamento fisiológico.

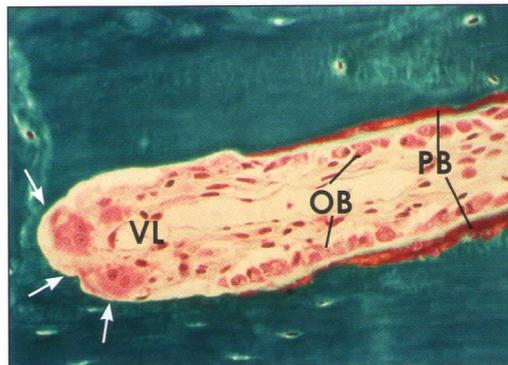
### Osso cortical

Os osteons primários são formados durante o crescimento aposicional, enquanto os osteons secundários resultam da substituição da matriz. A unidade estrutural fundamental do remodelamento ósseo cortical é o osteon (veja a Fig 2-2). A sequência de remodelamento é ilustrada nos cortes transversais na Fig 2-13. Primeiro, um canal de reabsorção é formado pelos osteoclastos. Mais tarde, os osteoblastos surgem e começam a preencher novamente o canal com lamelas concêntricas. No osso humano compacto, os osteons secundários completados possuem um diâmetro externo de 200 a 250  $\mu\text{m}$ , com o canal vascular central – o canal haversiano – medindo de 50 a 80  $\mu\text{m}$ .<sup>34</sup> Comparados com uma estrutura cilíndrica coerente, os osteons secundários raramente medem mais de 2 a 3 mm de comprimento. Eles estão interconectados em intervalos de 0,5 a 1,0 mm pelos canais vasculares transversais, os canais de Volkmann.

Os cortes longitudinais de osteons recém-formados têm mostrado que a reabsorção e deposição ósseas estão ligadas temporal e sequencialmente, ocorrendo em sítios



**Fig 2-13** Remodelamento ósseo cortical no úmero de um homem adulto. (a) Canal de reabsorção com osteoclastos (setas). (b) Lamelas concêntricas depositadas pelos osteoblastos. (c) Ósteon secundário finalizado, cercado pela linha cementoide (seta) (cortes transversais dos ósteons secundários em evolução; coloração com azul de toluidina).

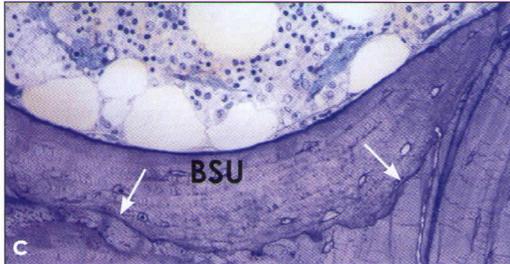
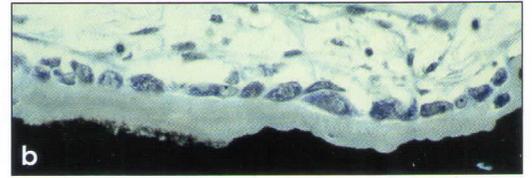
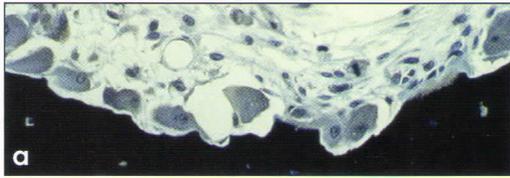


**Fig 2-14** Corte longitudinal na extremidade de um ósteon secundário em evolução (unidade óssea metabolizadora) durante o reparo da fratura no osso rádio de um cão. (Setas) cone de corte osteoclástico; (VL) alça vascular; (OB) osteoblastos; (PB) osteoide ou pré-osso (corte no micrótomo; coloração com tricrômico de Goldner).

discretos de remodelamento conhecidos como *unidades metabolizadoras ósseas*. Na frente de avanço do canal de reabsorção, os osteoclastos dispõem-se com um cone de corte (Fig 2-14). Enquanto os osteoclastos avançam longitudinalmente, eles alargam o canal de reabsorção até seu diâmetro final. A extremidade de uma alça vascular vem logo atrás dos osteoclastos. Esta alça repousa no centro do canal, sendo circundada por células perivasculares que teoricamente incluem células precursoras osteoclásticas e osteoblásticas. Na fase reversa, isto é, entre a reabsorção óssea e deposição da matriz, a parede do canal ficada revestida pelas células mononucleares. Na porção posterior do cone de corte, os osteoblastos surgem e depositam matriz óssea lamelar, que mais tarde é mineralizada. Dependendo das espécies, a finalização do ósteon requer 2 a 4 meses.



**Fig 2-15** Marcação sequencial policromática da unidade óssea metabolizadora em intervalos semanais (cabeças de setas) para medir a taxa de reabsorção osteoclástica diária.



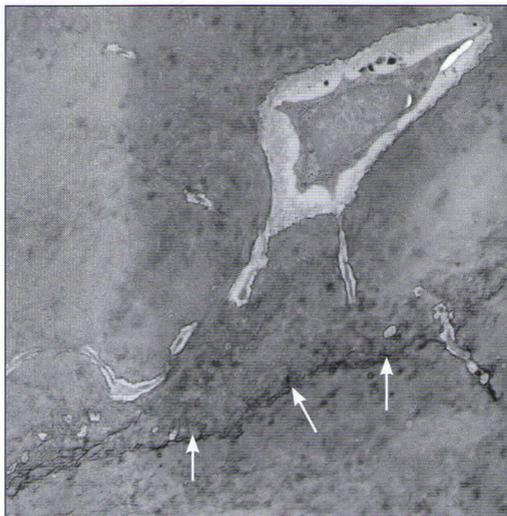
**Fig 2-16** Remodelamento ósseo trabecular numa biopsia da crista ilíaca humana. (a) Fase de reabsorção. (b) Fase formativa inicial. (c) Unidade estrutural recém-formada (BSU), nitidamente delineada pela linha reversa ou cimento (setas). (a e b) Coloração de Von Kossa-McNeal; (c) coloração com azul de toluidina.

Estas medidas e os cálculos são baseados nas marcações sequenciais com fluorocromios (Fig 2-15) e também permitem uma determinação precisa da taxa de reabsorção osteoclástica em cortes longitudinais, com valores de 50 a 60  $\mu\text{m}$  por dia em cães.<sup>35-37</sup>

## Osso medular

Enquanto a arquitetura original da estrutura trabecular é determinada pelo padrão de crescimento, o modelamento na camada esponjosa muda a arquitetura do osso medular por toda a vida. A rede trabecular sofre mudanças profundas que resultam na adaptação estrutural ao carregamento funcional prevalente, ou como já declarado, "de acordo com a lei de Wolff".<sup>38</sup> Esta adaptação permite ao osso suportar um determinado estresse com quantidade mínima de material. O mecanismo da adaptação funcional não é completamente entendido e; atualmente, a lei de Wolff só oferece um modo conveniente de aceitar isto como fato sem procurar por outras explicações.

O remodelamento ósseo melhora a qualidade tecidual relacionada às propriedades mecânicas e metabólicas. O remodelamento do osso trabecular substitui porções discretas (ou conjuntos) com novo osso lamelar (Fig 2-16). A formação de novos conjuntos começa com o recrutamento local de osteoclastos que formam uma cavidade na superfície trabecular.



**Fig 2-17** Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a linha de cimento (setas) na interface entre o osso antigo e o osso novo.

A profundidade média destas cavidades é de 50  $\mu\text{m}$  e raramente excede os 70  $\mu\text{m}$ . No final da fase resorptiva, e depois da fase reversa curta, os osteoblastos começam a depositar nova matriz óssea durante a fase formativa. Em analogia com os ósteons, o novo conjunto é considerado uma unidade óssea estrutural, e as populações celulares envolvidas nesta formação são consideradas uma unidade óssea metabolizadora.

Considerando a área da superfície trabecular no esqueleto humano, o controle e a dinâmica do remodelamento ósseo medular desempenham um papel importante na patogênese das desordens ósseas metabólicas, em especial na osteoporose.

## Linha de cimento

A linha de cimento é uma unidade estrutural muito característica do osso. Ela delimita (demarca) a interface entre osso velho e novo. Dois tipos de linhas de cimento são distinguidos: linha de repouso e linhas reversas. As linhas de repouso são uniformes e estritamente paralelas às lamelas. Elas são constituídas quando a formação óssea é interrompida e, depois do período de repouso, começa novamente. As linhas reversas são formadas durante a fase reversa, constituindo a matriz que é depositada diretamente contra uma superfície óssea previamente reabsorvida pelos osteoclastos (Fig 2-17). As linhas de repouso, que são produzidas pelos osteoblastos em sítios não expostos à reabsorção osteoclástica, mostram estrutura e composição similares às linhas reversas.

Os ósteons secundários estão sempre separados (ou conectados) da matriz óssea antiga pela linha de cimento. Da mesma forma, o novo conjunto formado após a finalização do remodelamento ósseo trabecular é separado da matriz óssea mais antiga pela linha de cimento. As lacunas de Howship deixadas para trás pelos osteoclastos dão um aspecto crenado à linha de cimento (veja Figs 2-13c e 2-16c). O número de linhas de cimento – tanto de repouso quanto de reversão – indica a intensidade da renovação da matriz.

## ■ Biologia da Regeneração Óssea

### Regeneração fisiológica versus reparadora

A regeneração é entendida como sendo a substituição dos componentes removidos ou perdidos no organismo pelos elementos de igual organização estrutural, de tal que a estrutura e função sejam restauradas por completo. A regeneração fisiológica é distinta da regeneração reparadora.

Muitos tecidos ou sistemas sofrem regeneração fisiológica, isto é, substituição contínua de células e elementos teciduais. O remodelamento dos ossos cortical e trabecular também representam regeneração; ambas as células e matrizes são substituídas.

A regeneração reparadora ocorre quando os tecidos são perdidos devido à injúria ou doença. O osso possui potencial único para restaurar completamente sua arquitetura original, mas existem determinadas limitações. A reconstrução do nível original de organização tecidual ocorre sequencialmente e lembra muito o padrão de formação óssea durante o desenvolvimento e crescimento. Assim, algumas condições básicas precisam ser preenchidas, como um amplo suprimento sanguíneo e estabilidade mecânica fornecidos por uma base sólida. Este padrão de regeneração óssea e algumas possibilidades de promover e proteger o processo de reparo serão demonstrados pelas observações histológicas em estudos experimentais selecionados.

### Ativação da regeneração óssea

Qualquer lesão óssea (fratura, defeito, inserção do implante ou interrupção do suprimento sanguíneo) ativa a regeneração óssea local pela liberação e produção local de fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras. O osso é uma das fontes mais ricas de fatores de crescimento. A osteoindução em seu conceito clássico implica na iniciação de formação óssea heterotópica (ectópica), que é a formação óssea em sítios onde o osso fisiologicamente não existe normalmente. O termo osteoindução é, entretanto, usado com muita frequência se a ossificação é ativada em contato com o osso existente, isto é, o caso da indução óssea ortotópica. Para evitar confusão, o termo ativação óssea é preferido para a formação óssea ectópica.

Na formação óssea heterotópica, células osteoprogenitoras induzíveis são encontradas à distância do osso. Estas células mesenquimais são abundantes no tecido conjuntivo subcutâneo, músculos esqueléticos e na cápsula do baço e rim. A sua resposta aos estímulos indutivos, como as BMPs, é muito mais complexa do que na formação óssea ortotópica e, na verdade, mimetiza a formação óssea endocondral.<sup>39</sup> Após a implantação subcutânea de BMPs em ratos, a proliferação de células mesenquimais começa em 3-4 dias. Dos dias 5 a 8 em diante, a cartilagem desenvolve-se e, em 1 dia, começa a mineralizar. A invasão vascular e substituição óssea da cartilagem em calcificação ocorrem dos dias 10 ao 11 em diante. Uma diferenciação intermediária da cartilagem parece mandatária, se a indução ocorrer em células osteoprogenitoras induzíveis. A resposta é sempre a formação óssea indireta.

Na formação óssea ortotópica, as células osteoprogenitoras são encontradas nos tecidos em proximidade direta ao osso, como no estroma da medula óssea, periósteo, endósteo e canais intracorticais. Estas células respondem aos sinais indutivos com proliferação e diferenciação diretamente em osteoblastos. Assim, na indução óssea ortotópica, os agentes indutores agem sob determinadas células osteoprogenitoras, e a resposta celular é a **formação óssea direta**. A fase de latência é curta – raramente acima dos 1-3 dias – e o osso recém-formado é depositado nas superfícies ósseas preexistentes.

## Reparo dos defeitos ósseos

O reparo dos defeitos ósseos é um bom modelo para o estudo da regeneração óssea. Contrário às fraturas, os defeitos estão menos sujeitos aos fatores mecânicos e às obstruções no suprimento sanguíneo. Assim, a cicatrização do defeito tem sido usada em muitos experimentos clássicos com a influência das medidas cirúrgicas e farmacológicas na regeneração óssea. O padrão básico de cicatrização do defeito com relação à ossificação e ao crescimento fisiológico é discutido nas seções seguintes.

### Pequenos defeitos corticais ósseos

Johner<sup>40</sup> examinou a cicatrização de perfurações com diâmetros de 0,1 a 1,0 mm nas tíbias de coelhos. A formação óssea dentro destas perfurações começa em dias, sem reabsorção osteoclástica precedente, e revela dependência em função do corte. Perfurações com diâmetro na faixa dos osteons (0,2 mm) são preenchidas concentricamente por osso lamelar (Fig 2-18). Nas perfurações maiores, um arca-bouço de matriz osteoide é formado primeiro, e então o osso lamelar é depositado nos espaços intertrabeculares recém-formados, que possuem um diâmetro correspondente de 150 a 200  $\mu\text{m}$  (Fig 2-19). Como no crescimento aposicional, a taxa de deposição de matriz de osso lamelar é restrita a alguns micrômetros por dia, enquanto a matriz osteoide rapidamente une os defeitos maiores. Após 4 semanas, tanto os defeitos menores como os maiores são preenchidos pelo osso compacto. Existe, entretanto, um limiar para a união rápida da matriz osteoide. Este limiar varia de 1 mm por perfuração no osso cortical do coelho.<sup>41</sup>

Estudos experimentais sobre a invaginação óssea em componentes porosos acetabulares de cães demonstraram resultados similares,<sup>42</sup> resumidos na fase distância de salto osteogênico. Este termo indica que o osso não é capaz de cruzar intervalos maiores que de 1 mm num único salto. No caso dos implantes, a situação torna-se ainda mais difícil porque a união dos defeitos começa pelo lado ósseo apenas. Isto não significa que perfurações mais largas ficaram abertas indefinidamente, mas o preenchimento demora mais, e não existe dúvida que as perfurações de 3 a 5 mm persistem por diversas semanas, se não por meses, até o reparo ser completado. A cicatrização óssea ao redor dos implantes dentários tem sido analisada em relação à distância entre a superfície do implante e o osso circundante<sup>43</sup> e em relação às características superficiais do implante.<sup>44,45</sup>

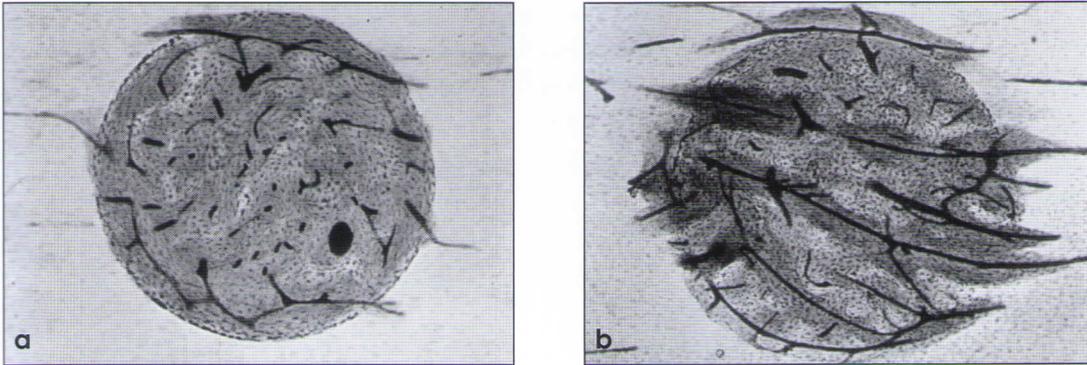
A finalização do preenchimento não significa que a cicatrização está completa, entretanto. Embora o regenerado ósseo pareça compacto, a sua estrutura ainda está muito longe da do osso cortical osteonal. Isto deve ser realizado pelo remodelamento haversiano. O remodelamento ósseo começa no córtex imediatamente adjacente à margem da perfuração original, em 3 semanas depois da criação do defeito. O remo-



**Fig 2-18** Reparo de defeitos ósseos corticais muito pequenos. As perfurações com diâmetro de 0,2 mm no córtex da tíbia de coelhos após 1 semana (a) e depois de 4 semanas (b) (coloração com fucsina básica).



**Fig 2-19** Reparo de defeitos ósseos corticais pequenos. Perfurações com diâmetro de 0,4 mm no córtex da tíbia de coelhos após 1 semana (a) e depois de 4 semanas (b) (coloração com fucsina básica).



**Fig 2-20** Microrradiografias mostrando o reparo de pequenos defeitos corticais medindo 0,6 mm de diâmetro, e remodelamento haversiano depois de 6 semanas (a) e após 6 meses (b). O preenchimento original compacto é parcialmente substituído pelos ósteons recém-formados.

delamento é ativado pelo ambiente tecidual local, incluindo o dano vascular produzido durante a perfuração. Da margem do defeito, o remodelamento progride para o osso recém-formado e substituí-lo com ósteons secundários orientados longitudinalmente (Fig 2-20). Em alguns meses, pequenos defeitos corticais são totalmente reconstruídos e podem ser identificados pela avaliação microscópica detalhada.

Em resumo, o reparo de pequenos defeitos corticais pode ser dividido em duas fases que lembram muito a formação do osso compacto no desenvolvimento e crescimento. Uma lesão simples produzida pela perfuração parece ativar uma sequência programada de eventos, começando pelo preenchimento da área do defeito pelo remodelamento haversiano.

#### *Pequenos defeitos ósseos medulares*

Pequenos defeitos ósseos medulares revelam um padrão similar de cicatrização. **A cicatrização também ocorre em duas fases, começando pela formação de matriz osteoide sobre o defeito e dentro dos espaços intertrabeculares adjacentes.** Este arcabouço primário é então reforçado pelo preenchimento concêntrico dos cristais esponjosos com osso primário de fibras paralelas, que aumenta consideravelmente a densidade na ex-área do defeito. **Numa segunda fase, o remodelamento restaura a arquitetura trabecular.**

## ■ Promoção da Regeneração Óssea

Como já descrito, o tecido ósseo exibe um potencial regenerador considerável e restaura perfeitamente a estrutura e propriedades mecânicas originais. Esta capacidade, entretanto, possui limitações e pode até mesmo falhar se determinadas condições não forem preenchidas. Fatores que interrompem ou impedem o reparo ósseo, entre outros, são (1)

falha no suprimento vascular, (2) instabilidade mecânica, (3) defeitos excessivos e (4) tecidos em competição com alta capacidade proliferativa. Entretanto, diversas opções, isoladas ou combinadas, estão disponíveis para promover e sustentar a formação óssea, incluindo (1) a osteoindução pelos fatores de crescimento, (2) osteocondução pelos enxertos e substitutos ósseos, (3) transferência de células-tronco ou células progenitoras que se diferenciam em osteoblastos, (4) distração osteogênica e (5) ROG usando membranas que funcionam como barreiras. Na seção seguinte, os princípios e observações experimentais de alguns destes métodos são discutidos.

### Uso terapêutico dos fatores de crescimento e diferenciação

A indução da formação óssea requer três elementos: (1) sinais osteoindutores solúveis, (2) células capazes de responder a este e outros sinais e (3) matriz ou arcabouço de suporte para carregar e liberar as células e/ou fatores moleculares. Fatores de crescimento como os fatores de crescimento para fibroblastos, fatores de crescimento derivados de plaquetas, fator de crescimento endotelial vascular, fatores de crescimento semelhantes à insulina e o hormônio de crescimento estão sob pesquisa experimental para esclarecer os seus papéis na melhora do reparo esquelético. Entretanto, estes fatores de crescimento não possuem propriedades osteoindutivas verdadeiras. Assim, pesquisadores e clínicos têm esperança no uso terapêutico das BMPs para melhorar a formação óssea.

A capacidade osteoindutiva do osso desmineralizado<sup>46</sup> e da matriz de dentina<sup>47</sup> é conhecida há muito tempo, e foi atribuída à capacidade das moléculas que mais tarde foram chamadas de *proteínas morfogenéticas ósseas*.<sup>48</sup> Pelo menos 20 moléculas da família da BMP foram identificadas. Duas delas, BMP-2 e BMP-7, têm chamado muita atenção e parecem as mais promissoras como ferramentas terapêuticas para a melhora do reparo ósseo. Nos Estados Unidos e na Europa, as proteínas recombinantes humanas BMP-2 e BMP-7 (rhBMP-2 e rhBMP-7) estão em uso clínico para casos problemáticos. A não-união, fraturas abertas em tíbia e fusões espinhais são as três condições onde existe aprovação clínica.

Embora as rhBMPs tenham sido testadas experimentalmente, seu uso em Implantologia e Periodontologia não é rotineiro. Num estudo feito por Jung e colaboradores,<sup>49</sup> o efeito da rhBMP-2 em conjunto com o osso mineral bovino liofilizado, como substituto ósseo, foi avaliado para regeneração óssea em humanos. A análise histomorfométrica mostrou que não havia diferença estatisticamente significativa na quantidade relativa de osso recém-formado. Entretanto, a adição de rhBMP-2 aumentou o contato osso-enxerto e melhorou o processo de maturação do osso recém-formado. Contudo, não se deve ter muita expectativa para uso rotineiro das rhBMPs em pequenos defeitos ou deiscências ósseas em Periodontia e Implantodontia.

As rhBMP-2 e rhBMP-7 atualmente são usadas em pacientes com problemas ortopédicos, onde todas as outras opções de tratamento já se esgotaram. Na cavidade bucal, uma reconstrução extraordinária foi obtida por Warnke e colaboradores<sup>50</sup> num paciente submetido à mandibulectomia subtotal. A reconstrução mandibular foi obtida com um novo segmento mandibular desenvolvido numa cela de titânio preenchida por blocos minerais, medula óssea do paciente e 7 mg de rhBMP-7 após a implantação no músculo latíssimo dorsal sobre o pedículo vascular da artéria toracodorsal.

Sete semanas depois, um retalho musculó-ósseo livre vascularizado foi transferido e anastomosado para reparar o defeito mandibular.

Existem diversas razões pelas quais o uso rotineiro das rhBMPs ainda não é possível, incluindo a necessidade de dosagens muito altas para que sejam eficientes em humanos, diminuindo a resposta com o aumento da idade do paciente, rapidez no *clearance* e custos altos. O uso de um carreador apropriado para conduzir e liberar as rhBMPs pode prolongar o tempo de permanência no ambiente da ferida. Entretanto, a busca pelo carreador perfeito ainda está em andamento. Uma questão inesperada e que surgiu nos últimos anos foi a observação que as rhBMPs aplicadas no defeito ou injúria óssea é a liberação de fatores que promovem a osteoclastogênese e ativação de osteoclastos, gerando reabsorção óssea.<sup>51</sup>

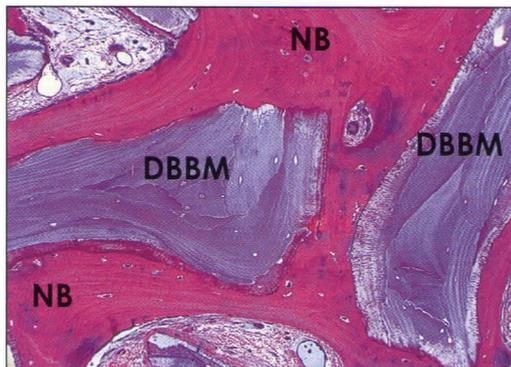
Avanços na tecnologia de transferência genética dão oportunidade de conduzir os DNAs complementários que podem codificar as proteínas osteogênicas. Esta estratégia, atualmente sendo testada sob condições experimentais, permite uma presença local sustentada do fator de crescimento ou diferenciação com exposição mínima dos sítios não visados. Ainda precisa ser confirmado se a tecnologia de transferência genética vai encontrar seu espaço na Odontologia reconstrutiva diária, não trazendo doenças comprometedoras.

## Enxertia óssea e substitutos ósseos

Os materiais de enxerto ósseo são usados na cirurgia reconstrutiva para preencher de defeitos, substituir porções ósseas, aumento ósseo, facilitar ou melhorar o reparo dos defeitos ósseos pela osteocondução, fornecer suporte mecânico para a membrana, estabilizar o coágulo sanguíneo e servir de veículos para antibióticos e fatores de crescimento. Um preenchedor ósseo deve pelo menos ser seguro, atóxico e biocompatível; fornecer suporte mecânico e ser um arcabouço osteocondutivo; torna-se osteointegrado ou ser substituído; permitir a invaginação por vasos sanguíneos; ser de uso fácil e ter bom custo-efetivo. Atualmente, existem diversas opções, incluindo osso autólogo ou alogênico e xenogênico ou materiais ósseos substitutos aloplásticos. Estes materiais podem mostrar uma ou mais propriedades que são comumente descritas como (1) osteocondutiva, (2) osteoindutiva e (3) osteogênica. O capítulo 4 discute a situação atual dos preenchedores ósseos em Implantodontia.

Materiais osteocondutores possuem uma matriz que serve de arcabouço ou infraestrutura, usada como gabarito e base sólida para a deposição óssea. Materiais com propriedades osteoindutoras contêm proteínas que estimulam e sustentam a proliferação e diferenciação de células progenitoras para se tornarem osteoblastos. A palavra osteogênico significa que o material contém células osteogênicas (osteoblastos ou precursores osteoblásticos) capazes de formar osso quando colocadas num ambiente adequado.

O osso autólogo é o enxerto de escolha porque possui as propriedades osteoindutoras, osteogênicas e osteocondutoras. Entretanto, a coleta do osso autólogo pode necessitar de uma intervenção cirúrgica adicional, que aumenta o tempo de cirurgia, os custos; o sangramento intraoperatório, a dor e o tempo de recuperação. Além disso, está associada ao alto risco de morbidade no sítio doador (p. ex., dor pós-operatória aumentada, lesão nervosa, lesão aos vasos sanguíneos, hematoma, infecção, formação de hérnia e desvantagens cosméticas). Finalmente, o suprimento de osso autólogo pode ser limitado.



**Fig 2-21** Corte semifino ilustrando a propriedade osteocondutiva do mineral ósseo bovino liofilizado (DBBM). O osso recém-formado (NB) cora-se mais intensamente do que o DBBM. Entretanto, observe a coloração diferencial das partículas de DBBM (tecido descalcificado embebido em resina acrílica, fucsina básica e coloração com azul de toluidina).

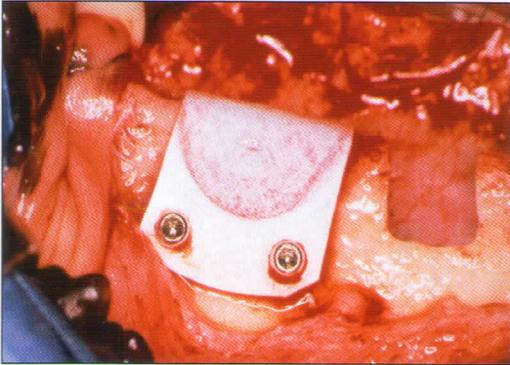
O osso alo gênico e determinados derivados ósseos ou substitutos ósseos sintéticos podem ter propriedades osteocondutivas similares. Os aloenxertos têm sido usados isoladamente ou em combinação com o osso autólogo para contornar os defeitos ósseos. Entretanto, a sua eficácia é menor do que a do osso autólogo isolado.<sup>52</sup> Quando a matriz óssea desmineralizada humana, comercialmente disponível, foi usada de forma separada, falhou em demonstrar eficácia equivalente ao osso autólogo.<sup>52</sup> Nos casos de fraturas ósseas sem união tratadas com Allomatrix (matriz óssea desmineralizada com sulfato de cálcio, Wright Medical), uma alta incidência de drenagem, infecção na ferida e falha no tratamento foi relatada.<sup>53</sup>

Os ossos xenogênico ou enxertos substitutos ósseos surgem cada vez mais no mercado e tornam-se mais e mais populares. Eles possuem propriedades osteocondutivas, embora em graus variados (Fig 2-21). O preenchimento ósseo de defeitos extensos é enormemente facilitado pela osteocondução. Duas condições importantes devem ser preenchidas para uma osteocondução bem-sucedida: (1) o arca-bouço deve consistir de um material bioativo ou bioinerte, e (2) o formato e as dimensões das suas estruturas interna e externa devem favorecer a invaginação e deposição óssea. Com relação ao formato e dimensão, um material semelhante a osso esponjoso fornece condições ideais para a invaginação óssea, que sempre depende da invaginação vascular pela angiogênese.<sup>54</sup>

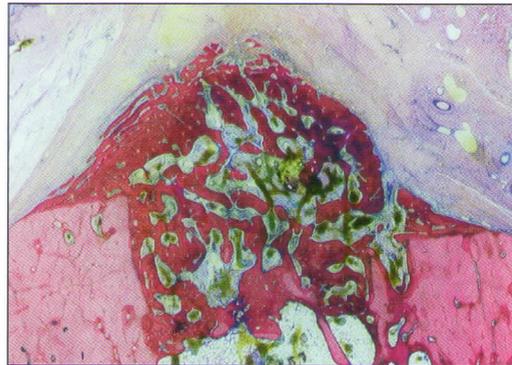
## Regeneração óssea guiada

### Princípios

A ROG, usada em conjunto com o material de enxerto, é o método mais amplamente usado para o aumento ósseo na prática odontológica. Já que o osso é um tecido de crescimento relativamente lento, tanto fibroblastos como células epiteliais têm a oportunidade de ocupar o espaço disponível com mais eficiência e construir um tecido conjuntivo mole muito mais rápido do que o osso é capaz de crescer. Assim, o mecanismo biológico da ROG é a exclusão de células indesejáveis no espaço preenchido pelo coágulo sob a membrana. Se a barreira oclusiva durar o suficiente, e se esta não for exposta à cavidade bucal, existem condições adequadas para as células-tronco



**Fig 2-22** Procedimento cirúrgico de ROG. Exposição da crista alveolar e criação do defeito numa mandíbula de cão, 2 meses após a extração dos pré-molares. O defeito distal está aberto, mas o mesial está coberto pela membrana. Miniparafusos fixam a membrana e marcam as margens do defeito para radiografia.



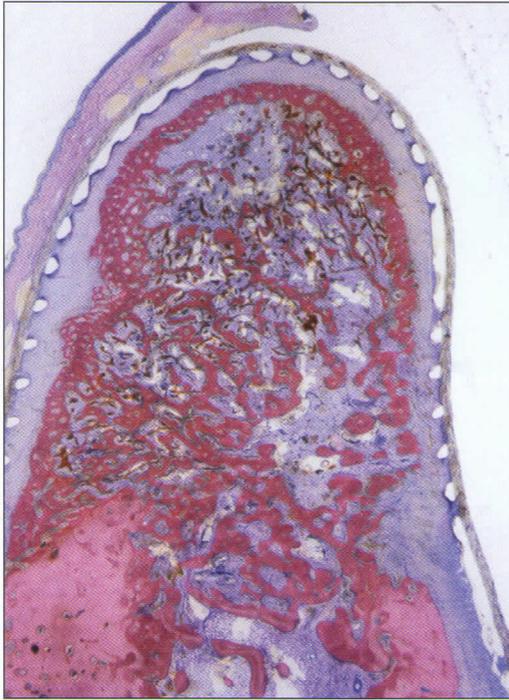
**Fig 2-23** Corte na porção central do defeito-controle sem a membrana, 2 meses depois. Uma cobertura óssea sela o espaço medular no fundo do defeito (azul de toluidina e fucsina básica).

e células osteoprogenitoras se diferenciarem em osteoblastos, que depositam matriz óssea. Em outras palavras, a membrana cria um espaço solitário que permite ao osso usar sua grande capacidade natural de modo seguro ou protegido. Tanto membranas reabsorvíveis como não reabsorvíveis estão disponíveis no mercado.

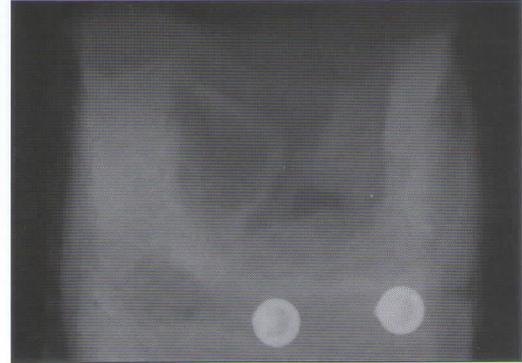
#### *Padrão de cicatrização óssea*

Nas seções seguintes, o padrão de cicatrização no reparo ósseo em defeitos protegidos pela membrana é ilustrado e discutido usando-se dados de um estudo experimental em mandíbulas de cães.<sup>55</sup> Neste estudo, defeitos em forma de sela medindo cerca de 8 x 12 x 10 mm foram criados 2 meses depois da extração dos pré-molares. Os defeitos foram cobertos ou não pelas membranas (Fig 2-22). Uma membrana-padrão de politetrafluoretileno expandido (ePTFE) e duas membranas de ePTFE usadas como protótipos, reforçadas pelo polipropileno, foram usadas. A posição das membranas foi mantida pelos miniparafusos. Nenhum material para preenchimento ósseo foi utilizado. Entretanto, o sangue venoso foi injetado sob cada membrana. A análise histológica foi realizada depois de 2 e 4 meses de cicatrização.

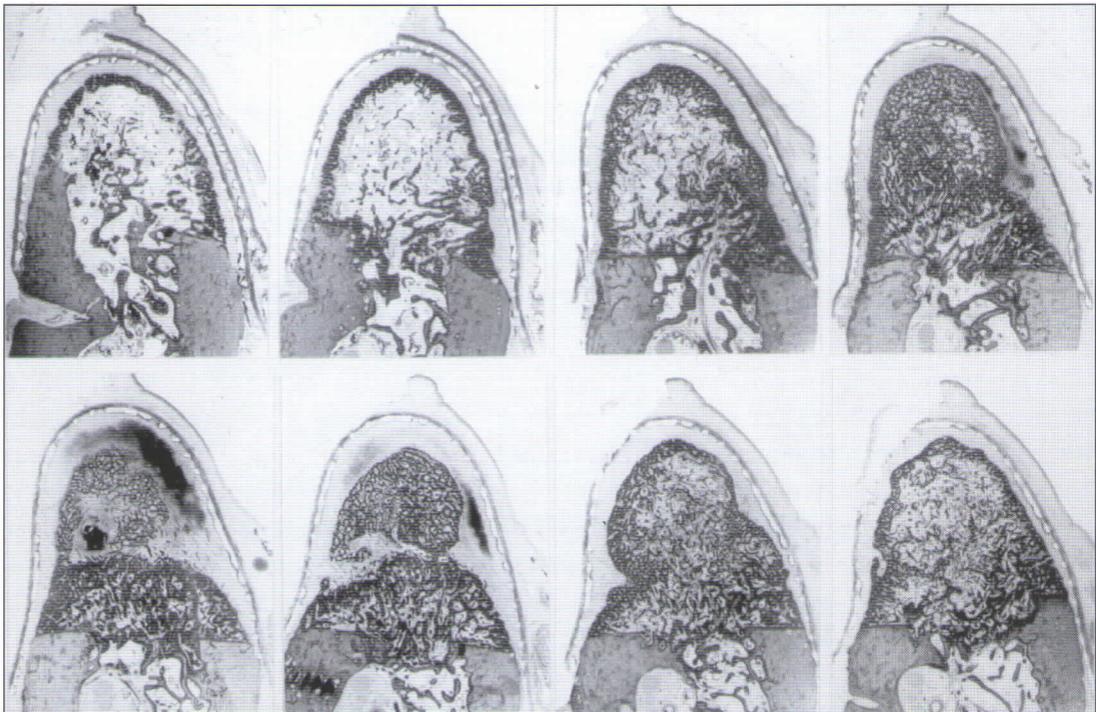
**Cicatrização sem a membrana.** Os defeitos-controle, que não receberam a membrana, mostraram um padrão de reparo consistente, onde a formação óssea foi restrita às margens do defeito, isto é, paredes mesial e distal do defeito, e no fundo (Fig 2-23). O fechamento do espaço medular foi finalizado após 2 meses, mas a formação óssea não progrediu. Aos 4 meses, o osso aumentou levemente em densidade.



**Fig 2-24** Corte vestibulolingual de um defeito coberto pela membrana, aos 2 meses, revelando o preenchimento ósseo do volume vazio (oco) abaixo da membrana (azul de toluidina e fucsina básica).



**Fig 2-25** Radiografia de um defeito coberto por membrana, 2 meses depois mostrando invaginação óssea oriunda das paredes mesial e distal, assim como do fundo do defeito (Reimpresso de Schenk et al.<sup>55</sup> com permissão).



**Fig 2-26** Cortes vestibulolinguais seriados, dispostos em sequência mesiodistal, de um defeito coberto por membrana, após 2 meses (aumento original, 2,5x) (Reimpresso de Schenk et al.<sup>55</sup>, com permissão).

**Fig 2-27** Secção próxima ao corte número 5 da série (esquerda, inferior, na Fig 2-26) revelando a cobertura óssea do fundo medular (1) e o corte tangencial no topo da elevação óssea originando-se da parede mesial do defeito (2), assim como do hematoma associado (3).

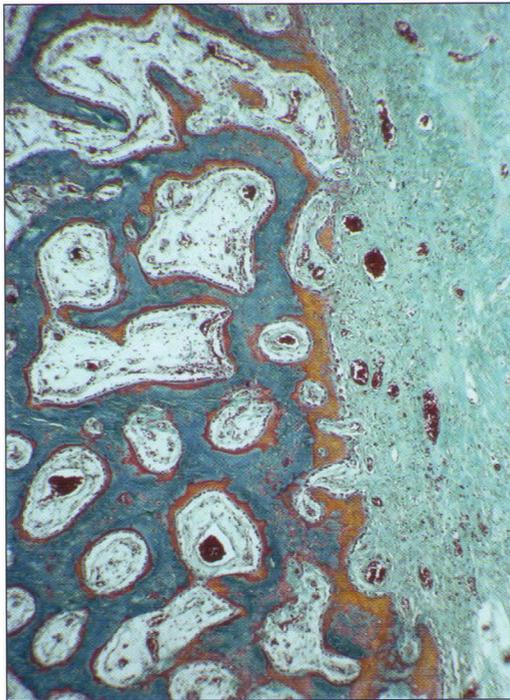


**Cicatrização com a membrana.** A proteção com a membrana resultou em mudança dramática no osso e regeneração tecidual. A membrana manteve o espaço criado durante a cirurgia e separou nitidamente o compartimento externo, constituindo a mucosa bucal, do espaço interno, principalmente acessível pela cavidade medular (Fig 2-24).

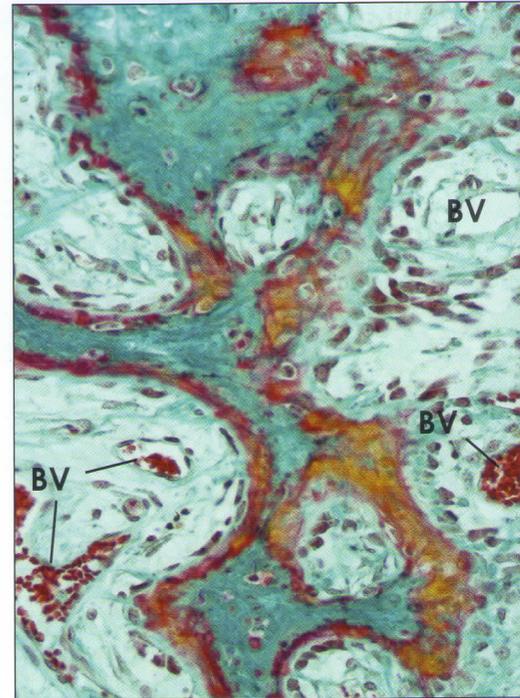
Este compartimento interno foi preenchido inicialmente pelo coágulo sanguíneo e, aos 2 meses, remanescentes do coágulo ainda podem ser reconhecidos na porção média do defeito (Figs 2-25 a 2-27). Entretanto, o hematoma foi completamente penetrado por tecido de granulação e vasos sanguíneos. A maioria do volume solitário agora consistia de osso regenerado esponjoso que, aprisionado pelas trabéculas, representava um labirinto de espaços medulares delgados interpenetrantes preenchidos pelo tecido conjuntivo mole frouxo e hipervascularizado. Tanto os vasos como o tecido fibroso estavam em continuidade com a medula óssea original. A formação óssea começou, semelhante à dos controles, partindo das margens dos defeitos, onde se espalhou sobre as aberturas da cavidade medular (Fig 2-27).

Assim, houve basicamente três centros de formação óssea, constituindo um selamento em forma de domo sobre as aberturas da cavidade medular. A partir destas coberturas ósseas, o osso se expandiu para o centro do espaço ocupado pela membrana. Tanto as radiografias (veja a Fig 2-25) como os cortes seriados (veja a Fig 2-26) demonstraram este padrão característico de cicatrização óssea. A figura 2-27 ilustra o terceiro centro de formação óssea no fundo da cavidade.

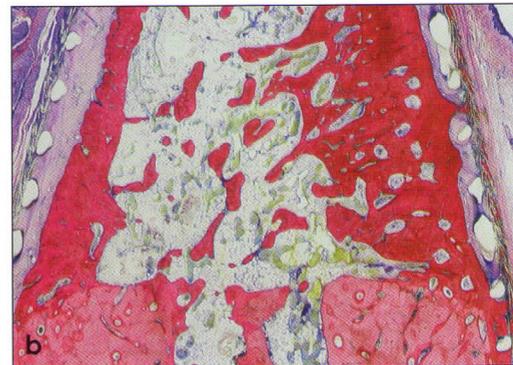
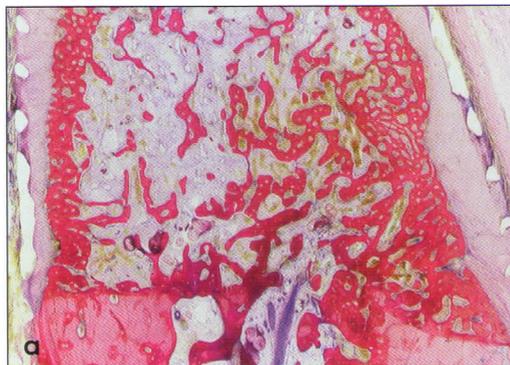
**Formação do arcabouço esponjoso primário.** A histologia da formação óssea no espaço protegido pela membrana exibiu uma semelhança considerável àquela encontrada no desenvolvimento e crescimento ósseos (Fig 2-28). A infiltração do hematoma pelo tecido de granulação seguiu o padrão básico de cicatrização das feridas. Os brotos vasculares foram acompanhados por células originando-se da medula óssea,



**Fig 2-28** Organização do hematoma e formação da matriz osteoide. Vasos sanguíneos e células formadoras de osso invadem o hematoma (à direita) e constroem um arcabouço de matriz osteoide (coloração com tricrômico de Goldner).

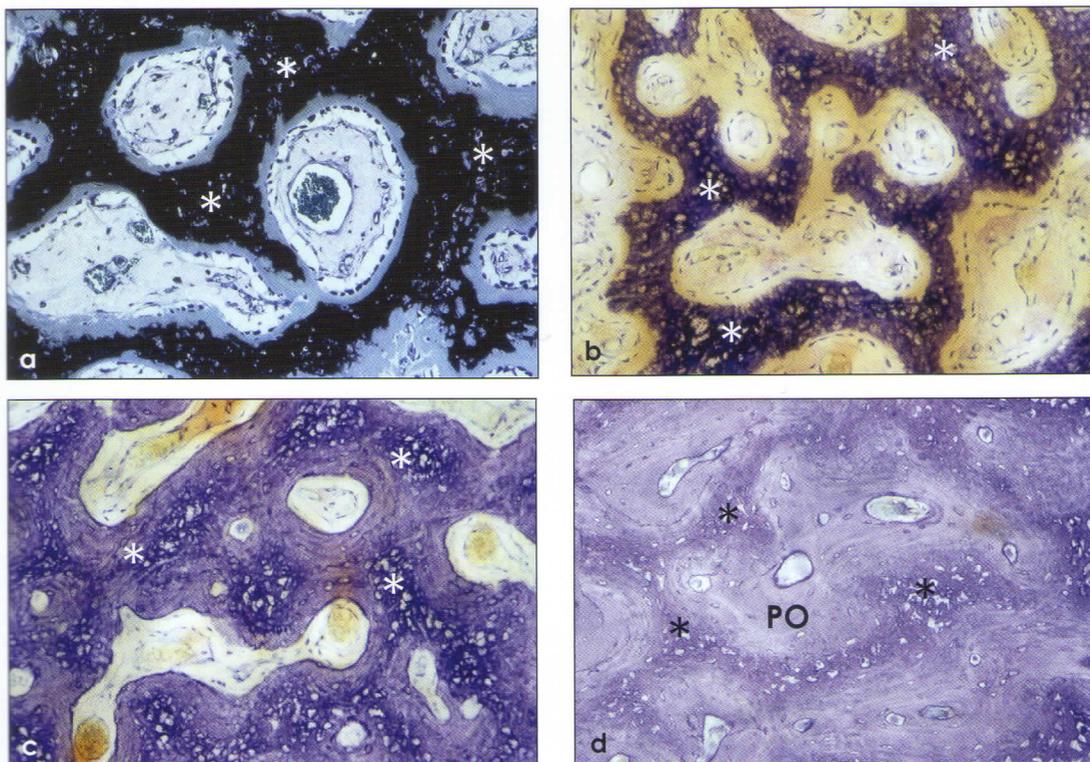


**Fig 2-29** Na frente de ossificação avançada, vasos sanguíneos (BV) e trabéculas em brotamento estão intimamente interconectadas. Ilhas de osteoide coradas em vermelho, e a matriz óssea mineralizada está em verde (coloração com tricrômico de Goldner).



**Fig 2-30** Transformação da rede esponjosa primária em ossos cortical e medular. (a) Após 2 meses, a camada esponjosa está mais densa na periferia do que no centro do osso regenerado. (b) Ossos cortical e esponjoso secundário após 4 meses. Uma camada de osso compacto na periferia confina o osso medular no centro de trabéculas bem definidas e da medula óssea regular (azul de toluidina e fucsina básica).

na periferia do defeito. A medula óssea continha células-tronco mesenquimais adultas capazes da diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica.<sup>56</sup> Dos espaços corticais e trabeculares seccionados, houve brotamento de matriz osteoide, grande parte na forma de placas bifidas delgadas (Fig 2-29). Uma característica particular do arcabouço esponjoso primário é a perfeita interdigitação com o plexo vascular. Como já mencionado, a angiogênese e o amplo suprimento sanguíneo são fundamentais para o desenvolvimento e manutenção ósseos.

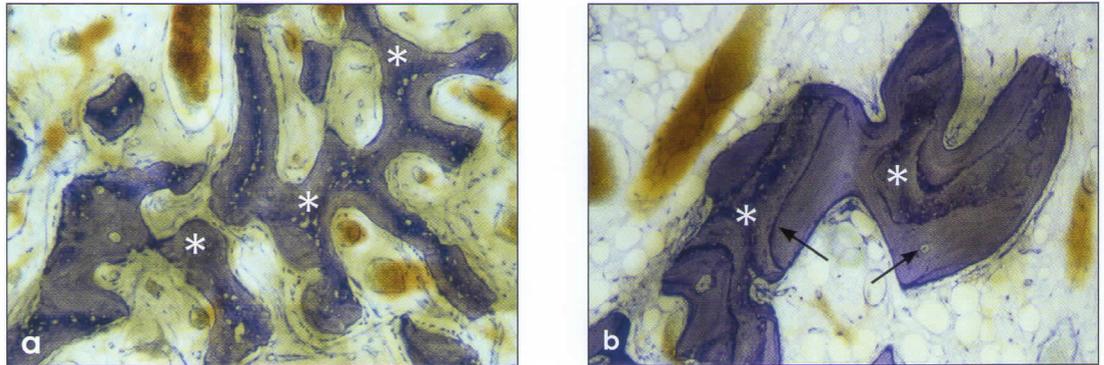


**Fig 2-31** Transformação do arcabouço de matriz osteoide em osso cortical. Cortes fino (a) e macroscópico (b) mostrando a matriz osteoide recém-formada (asteriscos) coberta por uma camada contínua de osteoblastos e circundada pelos espaços intertrabeculares bem vascularizados. O reforço de matriz osteoide (asteriscos) pelo osso com fibras paralelas, 2 meses depois da cirurgia, (c) e a transformação em osteons primários (PO) pelo preenchimento contínuo dos espaços intertrabeculares, 4 meses depois da cirurgia (d). A matriz osteoide (asteriscos) é claramente definida [(a) coloração de von Kossa-McNeal; (b a d) azul de toluidina]. (Reimpresso com a permissão de Schenk et al.<sup>55</sup>)

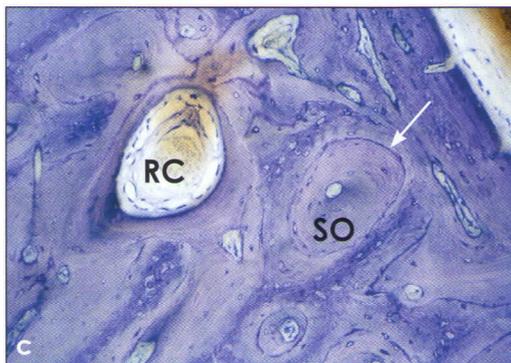
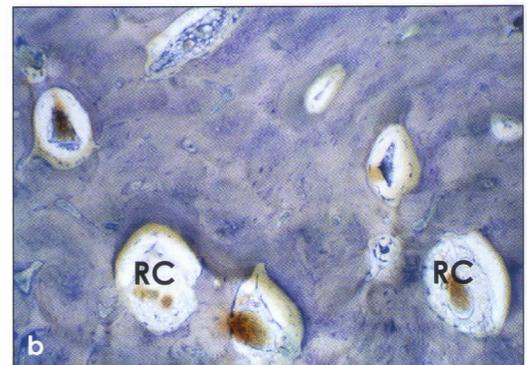
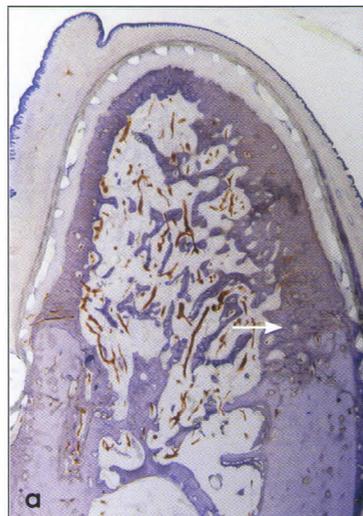
*Transformação em osso compacto e esponjosa regular.* Enquanto a rede esponjosa primária original consistia exclusivamente de matriz osteoide, ela servirá mais tarde de gabarito para a aposição de osso lamelar, que eventualmente constituiria tanto o osso compacto como a camada esponjosa regular com medula óssea madura. Estes eventos ocorreram 3 a 4 meses antes da cirurgia (Fig 2-30).

A formação da camada de osso compacto periférico começou nas proximidades das paredes mesial e distal do defeito, como uma continuação do córtex original. A superfície das trabéculas na rede esponjosa primária foi revestida por uma camada coerente de osteoblastos e espaços intertrabeculares adjacentes (Figs 2-31b e c). A estrutura do osso recém-formado mudou gradualmente de matriz osteoide para osso lamelar, com fibras paralelas, sendo um estágio intermediário do processo de maturação. O final deste processo foi alcançado quando os primeiro espaços intertrabeculares atingiram o porte de canais corticais regulares e, em conjunto com as lamelas concêntricas circundantes, constituíram os osteons primários (Fig 2-31d).

A formação da camada esponjosa secundária ou regular começou na porção central do espaço do defeito, onde o espaço medular foi preenchido pela reabsorção da

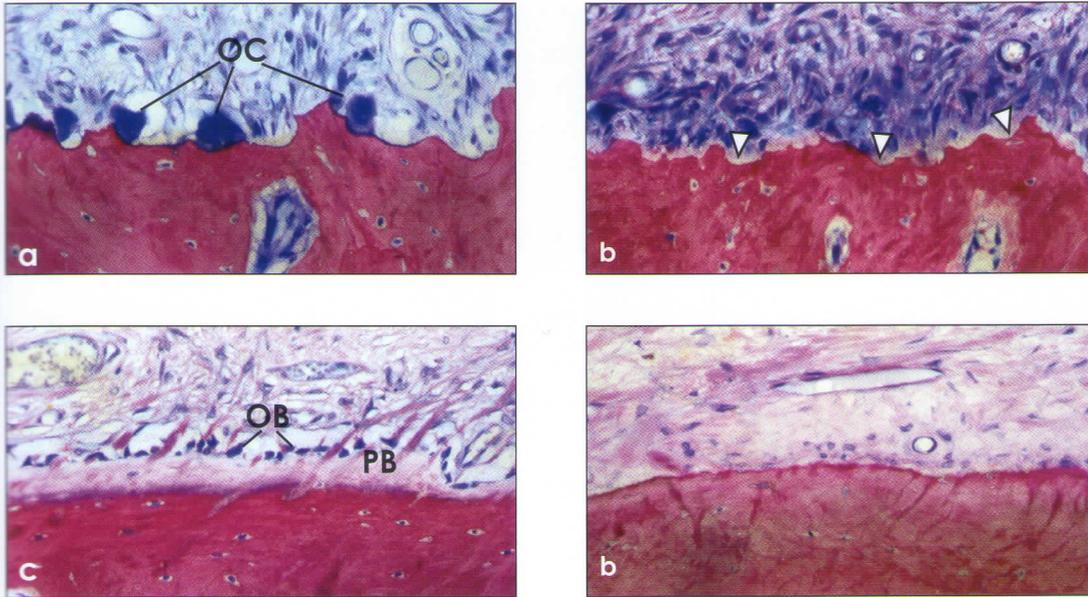


**Fig 2-32** Formação da camada esponjosa secundária. (a) Depois de 2 meses, as trabéculas da rede esponjosa primária consistem de matriz osteoide (asteriscos) reforçadas por uma camada de osso com fibras paralelas. (b) Após 4 meses, o remodelamento consiste de trabéculas ósseas compostas por remanescentes do arcabouço original (asteriscos) cobertos por conjuntos de osso lamelar (setas) (azul de toluidina).



**Fig 2-33** Remodelamento ósseo cortical aos 4 meses (cortes macroscópicos; coloração com azul de toluidina). (a) O remodelamento haversiano começa dentro da camada cortical compacta, preferencialmente em intimidade com o córtex original (seta). (b) Canais de reabsorção formados inicialmente (RC) serão preenchidos por osso lamelar maduro. (c) Aumento maior mostrando o canal de reabsorção (RC) com início de deposição óssea e um óstion secundário finalizado (SO) confinado pela linha de cimento (seta).

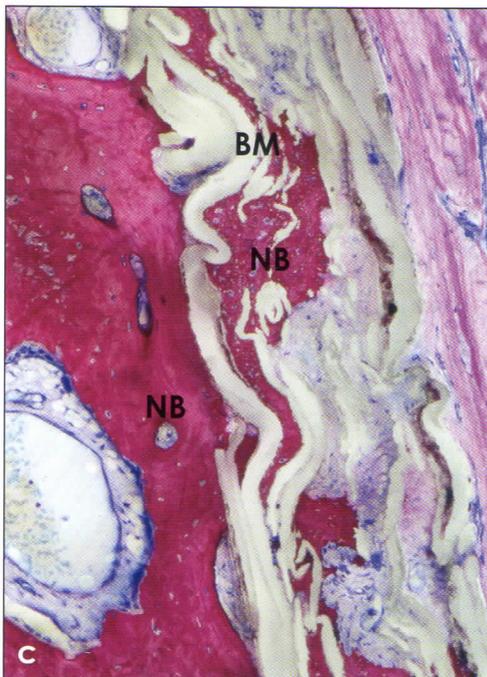
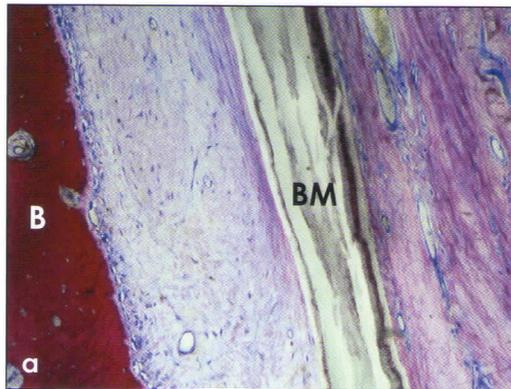
rede esponjosa primária (Fig 2-32a). As trabéculas não envolvidas sofreram remodelação profunda, e os remanescentes da matriz osteoide e osso com fibras paralelas foram gradualmente substituídos por conjuntos de osso lamelar (Fig 2-32b). Este processo também começou mesial e distalmente, procedendo para a porção central do defeito. O osso medular resultante foi contíguo com as trabéculas preexistentes nas paredes do defeito.



**Fig 2-34** Modelamento do osso cortical. (a) Reabsorção ativa indicada pela presença de osteoclastos (OC). (b) Lacunas de Howship (cabeças das setas), ou uma superfície erodida, persistindo após a reabsorção osteoclástica até serem cobertas pelo osso recém-formado. (c) A presença de osteoblastos (OB) e matriz osteoide [pré-osso (PB)] parece indicativa de aposição óssea. (d) Superfícies ósseas em repouso ou quiescentes revestidas pelas células formadoras de osso e um periosteio regular (cortes macroscópicos; azul de toluidina e fucsina básica).

*Remodelamento do osso cortical.* No quarto mês, o osso cortical entrou na fase de maturação, isto é, remodelamento haversiano. A ativação das unidades ósseas metabolizadoras levou à formação de canais de reabsorção, que mais tarde foram preenchidos por lamelas concêntricas (Figs 2-33a e b). Os ósteons secundários resultantes estavam nitidamente distinguíveis dos ósteons primários pelas linhas de cemento tipo invertidas (Fig 2-33c). O processo de remodelamento também começou na porção mais madura do osso regenerado, próxima às margens do defeito, e progrediu gradualmente na porção central do espaço do defeito.

*Modelamento do regenerado ósseo.* No final do quarto mês, o crescimento e modelamento ósseos dentro do espaço confinado pela membrana continuaram, em especial na porção central. Com a formação de uma camada óssea cortical, os envelopes periosteais e endosteais também foram restaurados. Eles finalizaram suas atividades remodeladoras através da reabsorção e deformação ao longo das superfícies corticais internas e externas (Fig 2-34). À medida que o modelamento ocorria, a superfície óssea era revestida por osteoblastos e matriz osteoide ou coberta por osteoclastos ou lacunas de Howship, como sinal de atividade resorptiva atual ou passada. Nos sítios quiescentes, a superfície óssea era uniforme, e o colágeno estava incorporado às fibras de Sharpey na matriz óssea mineralizada.



**Fig 2-35** Compartimentos dos tecidos duros e moles adjacentes à membrana de ePTFE (BM) (secções coradas com azul de toluidina e fucsina básica). (a) A porção densa da membrana separa o compartimento gengival externo do compartimento interno de tecido conjuntivo mole, principalmente acessível pelo compartimento ósseo (B). Não existem sinais de reação de corpo estranho. (b) A porção porosa da membrana (asteriscos) permite a invaginação de vasos sanguíneos e células nos interstícios da membrana. (c) Osso recém-formado (NB) fazendo contato com a superfície interna da membrana e crescendo nos espaços intersticiais.

Em todos os sítios de modelamento, o número de vasos sanguíneos aumentou. Assim, o córtex tornou-se mais claramente definido e os espaços intertrabeculares, melhor interconectados. Desta forma, o gradiente de maturação foi mantido, com a porção central ainda demonstrando algo da altura, densidade óssea e organização estrutural.

*Compartimentos de tecido mole.* O que ainda precisa ser discutido é a integração da membrana ao tecido mole. As características de biocompatibilidade do material implantado possuem um efeito importante na integração tecidual (veja o Cap. 3). A membrana separa o tecido mole em compartimentos externo e interno (Fig 2-35a). Na cicatrização, tanto a composição química como a estrutura superficial do material influenciam na invaginação ou adesão do tecido conjuntivo à membrana. Uma integração tecidual bem-sucedida é alcançada com um material que não provoque reação de corpo estranho muito pronunciada. Se o material é poroso e muito biocompatível, o tecido conjuntivo mole pode invadir os interstícios da membrana (Fig 2-35b).

Além disso, mesmo o crescimento ósseo nos poros e interstícios da membrana pode ocorrer em sítios onde a membrana está em contato íntimo com o osso (Fig 2-35c). O osso é depositado diretamente nos poros das paredes, preenchendo-os quase completamente, até mesmo penetrando na membrana. Esta ossificação intramembranosa novamente demonstra que a membrana é um material perfeitamente bioinerte e pode ter propriedades osteocondutivas.

Um fenômeno similar é verificado nas membranas de colágeno, em especial se possuem ligações cruzadas. Entretanto, no caso das membranas de colágeno com ligação cruzada, o colágeno modificado em si parece desencadear a ossificação da membrana.<sup>57,58</sup>

## ■ Conclusão

O osso possui uma capacidade singular de reconstruir sua estrutura e função original em resposta ao defeito ou à fratura. O padrão de cicatrização óssea lembra o do desenvolvimento e crescimento. Sob condições mecânicas estáveis, o osso é formado direta ou primariamente, dado que duas condições essenciais estejam presentes: um suprimento sanguíneo amplo e uma base sólida para a deposição óssea. A base sólida é fornecida pela superfície das extremidades dos fragmentos ou pelas margens ósseas do defeito.

O reparo dos defeitos ósseos lembra o crescimento aposicional. Na fase inicial rápida, uma matriz osteoide é construída e gradualmente reforçada pelo osso lamelar. Dependendo do ambiente local, esta rede esponjosa primária é então transformada em osso compacto cortical ou trabecular. Na segunda fase, a regeneração sofre remodelamento e substituição profunda pelas unidades ósseas remodeladoras (unidades ósseas metabolizadoras). No osso cortical, as unidades remodeladoras produzem ósteons secundários. No osso medular, as unidades ósseas resultantes formam conjuntos.

Enquanto a cicatrização dos defeitos ósseos possui limitações de tamanho da ordem de milímetros, existem diversos meios, combinados ou não, para promover a regeneração óssea:

- osteoindução pelos fatores de crescimento liberados de partículas ósseas autógenas ou adicionados como proteínas recombinantes num carreador transplantado no defeito;
- osteocondução pelos autoenxertos, aloenxertos, xenoenxertos ou aloplásticos. A osteocondução facilita a união de defeitos amplos oferecendo um arcabouço sólido onde o osso pode ser depositado. A taxa de substituição do material de preenchimento ósseo varia muito e depende do enxerto ou material ósseo substituto utilizado;
- a transferência de células-tronco ou células progenitoras que se diferenciam em osteoblastos pelo uso de enxertos ósseos medulares ou pelos aspirados de medula óssea;
- distração osteogênica pela canalização do calo ósseo em compartimentos longitudinais, confinados às fibras colágenas continuamente distendidas. Esta técnica gera resultados impressionantes;
- ROG, um procedimento bem estabelecido com base no princípio da regeneração óssea protegida contra a invasão de tecidos formados pela proliferação rápida de células não osteogênicas. Ela é aplicada com sucesso para aumentar o rebordo alveolar.

## Referências

- Bianco P. Structure and mineralization of bone. In: Bonucci E (ed). *Calcification in Biological Systems*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992:243–268.
- Weiner S, Traub W, Wagner HD. Lamellar bone: Structure-function relations. *J Struct Biol* 1999;126: 241–255.
- Frost HM. Micropetrosis. *J Bone Joint Surg* 1960; 42A:144–150.
- Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: A critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res* 1982;4:1–6.
- Marks SC Jr, Popoff SN. Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 1988;183:1–44.
- Candelieri GA, Liu F, Aubin JE. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone* 2001;28:351–361.
- Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM. Relationships between osteocyte density and bone formation rate in human cancellous bone. *Bone* 2002;31:709–711.
- Ferretti M, Muglia MA, Remaggi F, Cane V, Palumbo C. Histomorphometric study on the osteocyte lacuno-canalicular network in animals of different species. 2. Parallel-fibered and lamellar bones. *Ital J Anat Embryol* 1999;104:121–131.
- Ham AW. Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. *J Bone Joint Surg* 1952; 34A:701–728.
- Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2000;159:7–13.
- Jones SJ, Boyde A. Scanning electron microscopy of bone cells in cultures. In: Copp DH, Talmage RV (eds). *Endocrinology of Calcium Metabolism*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1978:97–104.
- Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003;4:638–649.
- Minkin C. Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982;34:285–290.
- Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: Relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* 1999;126:256–269.
- Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: Structure and function. *Connect Tissue Res* 1996;35: 131–136.
- Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000;24:99–126.
- Butler WT. Noncollagenous proteins of bone and dentin: A brief overview. In: Goldberg M, Boskey A, Robinson C (eds). *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopedic Surgeons, 2000:137–141.
- Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res* 2005;84:390–406.
- Lamoureux F, Baud'huin M, Dulomb L, Heymann D, Rédini F. Proteoglycans: Key partners in bone cell biology. *Bioessays* 2007;29:758–771.
- Hay ED. Collagen and other matrix glycoproteins in embryogenesis. In: Hay ED (ed). *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York: Plenum Press, 1991: 437–444.
- Christoffersen J, Landis WJ. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. *Anat Rec* 1991;230: 435–450.
- Aubin JE, Triffitt J. Mesenchymal stem cells and the osteoblast lineage. In: Bilezikian LG, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology*. New York: Academic Press, 2002:59–81.
- Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: Developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med* 2002;8:340–345.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997;89:765–771.
- Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, Gaikwad J, D'Souza RN. Cell-specific patterns of *Cbfa1* mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev* 2001;101:255–258.
- Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 1997;12: 869–879.
- Mogi M, Otagoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004;83:166–169.
- Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2001;2:81–94.
- Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 2003;423: 349–355.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$  B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79: 243–253.
- Goldring SR. Inflammatory mediators as essential elements in bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 2003;73:97–100.
- Clowes JA, Riggs BL, Khosla S. The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunol Rev* 2005;208:207–227.
- Kearns AE, Khosla S, Kostenuik P. Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008;29:155–192.
- Enlow DH. Functions of the Haversian system. *Am J Anat* 1962;110:269–305.
- Schenk R, Willenegger H. Morphological findings in primary fracture healing. In: Krompecher S, Kerner E (eds). *Callus Formation: Symposium on the Biology of Fracture Healing*. Symp Biol Hung 1967;7:75–86.

36. Jaworski ZF, Lok E. The rate of osteoclastic bone erosion in Haversian remodeling sites of adult dog's rib. *Calcif Tissue Res* 1972;10:103-112.
37. Schenk RK. Cytodynamics and histodynamics of primary bone repair. In: Lane JM (ed). *Fracture Healing*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987:23-32.
38. Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: Hirschwald, 1892.
39. Reddi AH. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Coll Relat Res* 1981;1:209-226.
40. Johner R. Zur Knochenheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße. *Helv Chir Acta* 1972;39:409-411.
41. Schenk R, Willenegger H. Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgröße. *Unfallheilkunde* 1977;80:155-160.
42. Harris WJ, White RE Jr, McCarthy JC, Walker PS, Weinberg EH. Bony ingrowth fixation of the acetabular component in canine hip joint arthroplasty. *Clin Orthop* 1983;176:7-11.
43. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. A model study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:251-262.
44. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:381-392.
45. Buser D, Brogginini N, Wieland M, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83:529-533.
46. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
47. Bang G, Urist MR. Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentin. *Arch Surg* 1967;94:781-789.
48. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1971;50:1392-1406.
49. Jung RE, Glauser R, Schärer P, Hämmerle CHF, Sailer HF, Weber FE. Effect of rhBMP-2 on guided bone regeneration in humans. A randomized, controlled clinical and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:556-568.
50. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, et al. Growth and transplantation of a custom vascularized bone graft in man. *Lancet* 2004;364:766-770.
51. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 2007;77:626-631.
52. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone graft substitutes. *J Bone Joint Surg* 2002;84:454-464.
53. Ziran BH, Smith WR, Morgan SJ. Use of calcium-based demineralized bone matrix/allograft for nonunions and posttraumatic reconstruction of the appendicular skeleton: Preliminary results and complications. *J Trauma* 2007;63:1324-1328.
54. Dai J, Rabie AB. VEGF: An essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res* 2007;86:937-950.
55. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: A histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9:13-29.
56. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007;53:121-127.
57. Connolly JM, Alferiev I, Clark-Gruel JN, et al. Triglycidylamine crosslinking of porcine aortic valve cusps or bovine pericardium results in improved biocompatibility, biomechanics, and calcification resistance: Chemical and biological mechanisms. *Am J Pathol* 2005;166:1-13.
58. Zubery Y, Goldlust A, Alves A, Nir E. Ossification of a novel cross-linked porcine collagen barrier in guided bone regeneration in dogs. *J Periodontol* 2007;78:112-121.