

Alfredo Feio da Maia Lima

Influência das proteínas morfogenéticas ósseas adsorvidas à hidroxiapatita e aglutinantes do colágeno bovino na consolidação da fratura do rádio em coelhos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Cirurgia Veterinária

Orientadora: Prof^a. Adj. Sheila Canevese Rahal

Co-orientador: Dr. Reinaldo dos Santos Volpi

**BOTUCATU - SP
2003**

***“ O Homem que mais vive não é aquele que somou mais idade, mas
sim aquele que mais aproveitou a vida”.***

Jean-Jaques Rousseau

AGRADECIMENTOS

À professora Doutora Sheila Canevese Rahal, pela oportunidade que me foi dada, pela competência e pela orientação precisa.

Ao Doutor Reinaldo dos Santos Volpi pela co-orientação desse experimento.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp - Campus de Botucatu, e à seção de pós-graduação, em especial a funcionária Denise Ap. Fioravante Garcia, pela ajuda durante essa minha jornada.

À Professora Doutora Tânia Cestari, pela leitura do material histológico.

Ao Professor Adjunto José Mauro Granjeiro, pelo apoio científico, que me proporcionou bases para a realização do trabalho.

À Professora Doutora Maria Jaqueline Mamprim, pelo grande auxílio durante as análises radiográficas, e pela amizade construída durante esse período.

Ao Professor Adjunto Luiz Carlos Vulcano, por ter viabilizado a utilização do programa de análise densitométrica.

Ao professor Adalberto José Crocci, do departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências, pela análise estatística dos resultados deste trabalho.

Ao pós-graduando Porfírio Candanedo Guerra, e ao residente Silvio Henrique Santi Antunes, pela realização das análises densitométricas.

Ao Pós-graduando Aristeu Vieira da Silva pelo auxílio na análise estatística dos resultados dos exames radiográficos.

Às Médicas Veterinárias Vanessa Bastos de Castro e Mariana Amaral Correia, pelas anestésias executadas nos animais do experimento.

À minha mãe, pela confiança e por toda a força, que sempre me conduziu às vitórias. **EU TE AMO.**

Ao meu pai, pela ajuda que me deu durante essa minha jornada.

À minha irmã Laura e meu cunhado Bob, pelos conselhos, oportunidades e palavras de incentivo.

Aos meus demais irmãos, pela compreensão de minha ausência, em momentos muito importantes de nossas vidas.

À minha querida Claudia, que durante todos os momentos esteve ao meu lado como fiel companheira.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Estrela Faria pelos conhecimentos passados e por toda a credibilidade depositada em mim.

À Professora e amiga Carmem Hilst, pelos valiosos ensinamentos e pela bela amizade que criamos.

Ao Professor e amigo Stélio Paca Loureiro Luna, pelo carinho com que me recebeu aqui em Botucatu.

Aos meus amigos Caio Henrique Paganini Burini e Ana Cristina Aranha Zabliith, pelos momentos de amizade que passamos juntos.

“Amigo é coisa prá se guardar, do lado esquerdo do peito”

Milton Nascimento

Ao funcionário João Borioli Cassetari e Benedito José Alho Favan, do Serviço de Radiologia, pela presteza durante os exames radiográficos.

À funcionária Ana Maria Sauer Tardivo pela imensa ajuda, preparando todos os instrumentais cirúrgicos.

Ao funcionário Luiz Antônio Souza Pinto.pelo carinho e responsabilidade com que tratou os animais desse experimento.

Ao fotógrafo Silvio Geraldo dos Santos Junior , pela produção do material fotográfico.

À bibliotecária Rosemary Cristina da Silva, pela colaboração na revisão das referências bibliográficas.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela Bolsa de Demanda Social.

À BAUMER S.A. pelo fornecimento dos biomateriais, essenciais para a viabilização desse experimento.

Aos animais que cedendo seus corpos, proporcionaram a mim um pouco mais de conhecimento veterinário.

Aos demais colegas da Veterinária, que de uma forma ou de outra contribuíram para que as coisas se tornassem mais fáceis.

**‘CINZA É TODA A TEORIA, MAS VERDE MEU AMIGO, É A COR DA
ÁRVORE DA VIDA’**
GOETHE

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	Introdução.....	18
2	Revisão da Literatura.....	22
2.1	Consolidação de fraturas.....	22
2.2	Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e carreadores.....	24
2.3	Experimentos e casos clínicos com BMP.....	27
2.4	Densitometria óssea.....	37
3	Material e Métodos.....	40
3.1	Animais e ambientes de experimentação.....	40
3.2	Técnica anestésica.....	40
3.3	Procedimento cirúrgico.....	41
3.4	Condutas pós-operatórias.....	43
3.5	Avaliação clínica.....	43
3.6	Exames radiográficos.....	43
3.7	Exames densitométricos.....	44
3.8	Técnica de exame histológico.....	45

4	Resultados.....	47
4.1	Avaliação clínico-cirúrgica.....	47
4.2	Exames radiográficos.....	47
4.3	Exames densitométricos.....	53
4.4	Avaliação histológica.....	54
5	Discussão.....	61
6	Conclusões.....	68
7	Referências Bibliográficas.....	70
8	Anexos	77
9	Apêndice.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Membro torácico direito posicionado para o procedimento cirúrgico (a). Fratura transversa induzida na porção média da diáfise do rádio (b). Preparação de BMPs adsorvidas à hidroxiapatita e grânulos de colágeno Bovino (c). Aplicação da mistura ao redor das extremidades da fratura (d).....	42
Figura 2	Aspecto radiográfico do membro torácico direito (tratado) do animal nº 3. No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 30 dias de pós-cirúrgico, constata-se linha de osteotomia radiodensa, calo ósseo periosteal nas corticais lateral e medial, ponte óssea nas corticais lateral e medial, restabelecimento da cortical lateral e medial e ausência de restabelecimento do canal medular (b).....	50
Figura 3	Aspecto radiográfico dos membro torácico esquerdo (controle) do animal nº 3. No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 30 dias de pós-cirúrgico, constata-se linha de osteotomia radiodensa, calo ósseo periosteal nas corticais lateral e medial, ponte óssea nas corticais lateral e medial, restabelecimento da cortical lateral e ausência de restabelecimento do canal medular (b).....	50
Figura 4	Aspecto radiográfico do membro torácico direito (tratado) do animal nº 10. No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 60 dias de pós-cirúrgico, constata-se linha de osteotomia ausente, calo ósseo periosteal (em remodelamento) e ponte óssea na cortical lateral, restabelecimento das corticais lateral e medial, restabelecimento do canal medular (b).....	51

Figura 5	Aspecto radiográfico do membro torácico esquerdo (controle) do animal nº 10. No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 60 dias de pós-cirúrgico, constata-se linha de osteotomia ausente, calo ósseo periosteal (em remodelamento) e ponte óssea na cortical lateral, restabelecimento das corticais lateral e medial, restabelecimento do canal medular (b).....	51
Figura 6	Aspecto radiográfico do membro torácico direito (tratado) do animal nº 12. No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 90 dias de pós-cirúrgico constata-se linha de osteotomia ausente, calo ósseo periosteal ausente, restabelecimento das corticais lateral e medial e do canal medular (b).....	52
Figura 7	Aspecto radiográfico do membro torácico esquerdo (controle) do animal nº 12. No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 90 dias de pós-cirúrgico constata-se linha de osteotomia ausente, calo ósseo periosteal ausente, restabelecimento das corticais lateral e medial e do canal medular (b).....	52
Figura 8	Representante dos membros controles no período de 30 dias. Observar presença de calo ósseo circundando os cotos da fratura (aspecto geral) e a união da cortical óssea por tecido ósseo primário (b). Na região mais externa do calo ósseo (a) reabsorção da superfície óssea por osteoclastos (seta larga) e na sua face ulnar (c) grande quantidade de tecido cartilaginoso (asterisco) sendo substituído por tecido ósseo (setas).....	55
Figura 9	Representante dos membros tratados no período de 30 dias. Observar presença de calo ósseo circundando os cotos da fratura (aspecto geral) e a união da cortical óssea por tecido ósseo de arranjo mais compacto e maduro em relação ao membro controle (b). Tanto a região do calo ósseo voltado para a epiderme (c) quanto ao localizado na região interóssea do antebraço (a) apresenta tecido ósseo (setas) em reabsorção por osteoclastos (setas largas).....	56

Figura 10	Tecido ósseo neoformado no período de 30 dias. Observar no membro controle (a) tecido ósseo mais imaturo, com trabéculas ósseas finas em relação ao tratado (b).....	57
Figura 11	Período experimental de 60 dias. Observar em ambos os membros, controle (a) e tratado (b), o restabelecimento do canal medular (asterisco), a região da cortical óssea (seta larga) voltada para a epiderme com características semelhantes ao original e o fusionamento do radio e ulna, com formação de um bloco ósseo de arranjo trabeculado em remodelação (área retangular).....	58
Figura 12	Período de 90 dias. Observar a redução do calo ósseo e a reparação morfofuncinal da cortical óssea (setas), do canal medular (asteriscos) e dos tecidos moles (M) adjacentes.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados percentuais da análise radiográfica em posição craniocaudal, dos focos das fraturas induzidas experimentalmente no rádio direito (tratado) de coelhos, aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório.....	48
Tabela 2	Resultados percentuais da análise radiográfica em posição craniocaudal, dos focos das fraturas induzidas experimentalmente no rádio esquerdo de coelhos, aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório.....	49
Tabela 3	Valores medianos de cinco repetições da variação da densitometria óptica por imagens radiográficas, segundo momentos (30, 60 e 90 dias de pós-operatório) e membros...	53
Tabela 4	Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos rádios direitos (tratados) aos 30 dias de pós-operatório.....	79
Tabela 5	Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos rádios esquerdos (controles) aos 30 dias de pós-operatório.....	80
Tabela 6	Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos rádios direitos (tratados) aos 60 dias de pós-operatório.....	81
Tabela 7	Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos rádios esquerdos (controles) aos 60 dias de pós-operatório.....	82
Tabela 8	Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos rádios direitos (tratados) aos 90 dias de pós-operatório.....	83

Tabela 9	Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos raios esquerdos (controles) aos 90 dias de pós-operatório.....	83
Tabela 10	Valores densitométricos do foco de fratura dos membros direitos (tratados) e esquerdos (controles), no pós operatório imediato e aos 30 dias de pós-operatório.....	84
Tabela 11	Valores densitométricos do foco de fratura dos membros direitos (tratados) e esquerdos (controles), no pós operatório imediato e aos 60 dias de pós-operatório.....	84
Tabela 12	Valores densitométricos do foco de fratura dos membros direitos (tratados) e esquerdos (controles), no pós operatório imediato e aos 90 dias de pós-operatório.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP = proteína morfogenética óssea

BMPR = receptores de BMP

FGF = fator de crescimento de fibroblasto

GDF = fator de diferenciação/crescimento

hBMP = proteína morfogenética óssea humana

mmAl = milímetros de alumínio

OP = proteína osteogênica

PDGF = fator de crescimento derivado da plaqueta

rhBMP = proteína morfogenética óssea recombinante humana

TGF-2 = fator de crescimento transformante 2

LIMA, A.F.M. Influência das proteínas morfogenéticas ósseas adsorvidas à hidroxiapatita e aglutinantes do colágeno bovino na consolidação da fratura do rádio em coelhos. 2003. 84p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO

O propósito do estudo foi avaliar a influência de única aplicação da combinação de proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) com colágeno liofilizado de origem bovina, no processo de reparação de fraturas instáveis do rádio. Utilizaram-se 15 coelhos, da raça Norfolk, com idade média de cinco meses e peso corpóreo médio de 3,5 kg. Foi induzida fratura transversa na porção média da diáfise de ambos os rádios. No foco de fratura do rádio direito aplicou-se a associação de BMPs adsorvidas à hidroxiapatita e aglutinante de colágeno bovino em grânulos, ao passo que no foco de fratura do rádio esquerdo, considerado controle, nada foi utilizado. Efetuou-se exames radiográficos e densitometria óptica por imagens radiográficas dos focos de fratura ao término do procedimento cirúrgico e aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório. Os exames histológicos, de cada cinco animais, foram realizados aos 30, 60 e 90 dias após a indução da fratura. Na avaliação radiográfica, no 30º dia de pós-cirúrgico, houve melhor restabelecimento cortical das fraturas tratadas com BMPs; no entanto, no 60º e 90º dia de pós-operatório, não foram observadas diferenças entre os membros. Na análise densitométrica não foram detectadas diferenças estatísticas. Pela análise histológica a via de reparação das fratura foi semelhante entre os membros tratados e controles, contudo o conjunto de BMPs acelerou a maturação do calo ósseo apenas aos 30 dias de pós-cirúrgico. Foi possível concluir que o tipo de BMP utilizada interferiu positivamente na evolução da consolidação de fratura.

Palavras-chave: BMP; Biomaterial; Colágeno; Fratura; Coelho; Bovino

LIMA, A.F.M. **Influence of bone morphogenetic proteins adsorbed to the hydroxyapatite and agglutinant of bovine collagen on consolidation of radius fracture in rabbits.**2003. 84p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of an only administration of a combination of bone morphogenetic proteins (BMPs) with lyophilized collagen from bovines in the reparation of unstable fractures of the radius. Fifteen (15) Norfolk rabbits, average age of five months and average weight of 3.5kg, were used. A transversal fracture was induced in the middle portion of the diaphysis of both radius. In the focus of the right radius fracture, the association of BMPs adsorbed to the hydroxyapatite and agglutinant of bovine collagen in granules was applied; whereas in the focus of the left radius fracture, considered control, nothing was used. Radiographic exams and optical densitometry through radiographic images of the fracture focuses were performed immediately and 30, 60 and 90 days post-operatively. The histological exams of each animal were accomplished on the 30th, 60th and 90th days after the induction of the fracture. In the radiographic evaluation, on the 30th day after surgery, there was better cortical re-establishment of the fractures treated with BMPs; however, on the 60th and 90th day after surgery, differences were not observed between the limbs. No statistical differences could not be detected in the densitometric analysis either. In the histological analysis, the reparation process of the fractures was similar between the treated and the control; however the pool of BMPs accelerated the maturation of the bone callus on the 30th day after surgery. Therefore, it is possible to conclude that the type of BMP used in this study interfered positively in the evolution of fracture consolidation.

KEY WORDS: BMP; Biomaterial; Collagen; Fracture; Rabbit; Bovine

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Diferente da maioria dos tecidos que quando danificados se recuperam pela formação de cicatriz, o osso fraturado com sua capacidade regenerativa produz tecido cuja organização estrutural é igual à do original (HULTH, 1989; BOLANDER, 1992). O reparo da fratura pode ser caracterizado por processos distintos, incluindo a resposta imediata à lesão, a formação óssea intramembranosa ou endocondral e a remodelação óssea (BARNES et al., 1999).

Embora grande parte das fraturas consolide, muitas delas podem evoluir para complicações como má consolidação, união retardada e não consolidação (BETTS, 1995; LIEBERMAN et al., 2002). O grau de agressividade do trauma inicial, bem como a qualidade e o tipo de intervenção cirúrgica podem ser uma das causas do processo (EINHORN, 1995). Entretanto fatores adicionais devem ser considerados, como idade, osteopenia, inatividade, nutrição inadequada, alterações metabólicas e terapia com radiação, entre outros (BETTS, 1995).

Diversos métodos têm sido estudados com o intuito de acelerar ou favorecer a consolidação das fraturas, sejam eles mecânicos, biofísicos ou biológicos (EINHORN, 1995).

Entre as intervenções biológicas, tem havido grande interesse no desenvolvimento de substitutos ósseos; uma vez que o uso do enxerto esponjoso autógeno, embora eficiente, apresenta limitações em disponibilidade, aumento dos riscos de contaminação e ainda morbidade do local doador (COCKLIN, 1971; LIEBERMAN et al., 2002). De acordo com HULTH (1989), a descoberta de novos mediadores bioquímicos, que são liberados em fraturas e no suporte de peso e carga

óssea, tem proporcionado a possibilidade de melhor compreensão do sistema biológico envolvido na consolidação da fratura.

O evento central no reparo da fratura é a formação de exsudato que contém, não apenas constituintes em comum com o exsudato de uma ferida, como também migração celular e desenvolvimento de vasos, e ainda proteínas morfogenéticas ósseas e fatores de crescimento que estimulam diferentes células progenitoras. Muitas dessas proteínas são normalmente expressadas no tecido esquelético e outras são liberadas pelas células inflamatórias associadas ao local do trauma (BARNES et al., 1999).

Entre os fatores de crescimento identificados no foco de fratura estão a proteína morfogenética óssea (BMP-2, BMP-3, BMP-4 e BMP-7), o fator de crescimento transformante (TGF- β 1 e TGF- β 2), o fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF) e o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (BARNES et al., 1999; LIEBERMAN et al., 2002).

Marshall R. Urist, em 1965, foi o primeiro pesquisador a reconhecer que havia uma substância no osso capaz de induzir a formação óssea (LIEBERMAN et al., 2002). Ele observou que a implantação de matriz óssea desmineralizada em um local heterotópico levava ao desenvolvimento de um “ossículo” (EINHORN & LEE, 2001). O fenômeno foi denominado “princípio da indução óssea” e a proteína responsável por esse efeito foi intitulada “proteína morfogenética óssea” (LIEBERMAN et al., 2002).

Embora o uso da matriz óssea desmineralizada tenha sido benéfica no tratamento de defeitos ósseos, segundo GROENEVELD & BURGER (2000), descobriu-se que ela tinha capacidade osteocondutiva e não osteoindutiva. Quando as BMPs foram purificadas e reconstituídas com matriz óssea desmineralizada inativa, a indução óssea foi observada em diferentes espécies.

Acredita-se que o papel das BMPs na fratura esteja associado ao fato dessas moléculas serem primariamente ativadoras da diferenciação de células osteoprogenitoras mesenquimais destinadas a tornarem-se osteoblastos e condroblastos (BARNES et al, 1999). A indução osteogênica é influenciada pela fonte e potencial osteo-indutivo da preparação da BMP, pela disponibilidade e capacidade de resposta à indução das células osteoprogenitoras do hospedeiro, e pelo ambiente no local de implantação (FORELL & STRAW, 1993).

Como há variações de resultados de acordo com o processamento e purificação do material, bem como o modelo experimental utilizado, o presente estudo com coelhos teve como objetivo avaliar, por meio de exames clínicos, radiográficos, densitométricos e histológicos, a influência de uma única aplicação da combinação de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) adsorvidas à hidroxiapatita e aglutinante de colágeno, ambos de origem bovina, desenvolvida pela indústria nacional, no processo de reparação de fraturas diafisárias instáveis do rádio.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Consolidação de fraturas

O reparo da fratura, segundo CORNELL & LANE (1992), geralmente ocorre por meio de seis estágios distintos: trauma, indução, inflamação, calo mole, calo duro e remodelação. O impacto ocorre no momento do estresse ao osso e dura até haver completa dissipação de energia. O estágio de indução, caracterizado pela formação do hematoma, proporciona a modulação e indução das células necessárias à consolidação, sendo um estágio curto que termina quando as células inflamatórias começam a surgir. A inflamação começa após o impacto e dura até o aparecimento de cartilagem e osso. No estágio de calo mole, três semanas após a indução, a lacuna da fratura torna-se altamente celular, com aumento da vascularização e diminuição da movimentação dos fragmentos. A formação do novo osso subperiosteal ocorre adjacente à lacuna da fratura quando os condroblastos começam a aparecer, substituindo o estroma fibrovascular por condróide. No estágio de calo duro, o calo cartilaginoso é convertido por ossificação endocondral em osso esponjoso primário ou osso trabecular. O estágio final, ou de remodelação, envolve a substituição do osso trabecular pelo osso lamelar, a reconstrução do canal medular e a restauração do diâmetro ósseo normal, processo esse que pode levar de meses a anos.

HULTH (1989) cita que nos tratamentos conservadores das fraturas geralmente há um calo mais evidente com formação de cartilagem devido à resposta inflamatória mais intensa causada pelo movimento entre os fragmentos. As células mesenquimais da área circundante alcançam as extremidades da fratura, condensando-se e diferenciando-se em cartilagem. Com métodos de fixação rígida, tais como placas e parafusos, o reparo da fratura ocorre sem a produção de calo cartilaginoso (BARNES et al., 1999).

Os estágios da consolidação, conforme BOLANDER (1992), possuem eventos celulares tais como proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia e síntese de matriz extracelular, que estão sujeitos à regulação por fatores sistêmicos e locais, bem como fatores de crescimento. O TGF- β 1 e PDGF são liberados, seguinte a lesão, dentro do hematoma da fratura pelas plaquetas e células inflamatórias. TGF- β 1 e FGF são sintetizados por osteoblastos e condrócitos no processo de consolidação. TGF- β 1 e PDGF influenciam na formação de cartilagem e osso intramembranoso no início da formação do calo. Por sua vez, o papel das BMPs no reparo da fratura é pouco compreendido, a despeito de serem as mais potentes proteínas osteoindutivas (BOSTROM et al., 1995; SAKOU, 1998).

Quanto ao emprego de imunoistoquímica, LIANJIA & YAN (1990) afirmaram haver, no estágio de hematoma, um grande número de células mesenquimais coradas positivamente que migram, agrupam e proliferam na lacuna da fratura. Essas células posteriormente diferenciam-se em osteoblastos (ou condroblastos) durante a fase de formação do calo e mostram alta positividade na fase de remodelação. Segundo os autores, a BMP está presente no citoplasma de células mesenquimais em resposta à fratura.

HULTH (1989) citou que a concentração de BMP no exsudato da fratura pode ser diferente, dependendo do tipo de lesão. Além disso, o trauma do tecido mole pode interferir no efeito da BMP e nos fatores de crescimentos específicos do osso de diferentes maneiras.

De acordo com CRITCHLOW et al. (1995), se fatores de crescimento ou outros agentes são empregados para acelerar a consolidação óssea, eles devem atuar no estágio de proliferação e diferenciação celular, para que o calo se desenvolva mais rapidamente. Se aplicados durante a fase de remodelação, retardam-na, já que osso adicional é acrescentado quando o calo está sendo reabsorvido e diminuindo de tamanho.

2.2 Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e carreadores

Segundo SAKOU (1998), as BMPs constituem uma subfamília única dentro do TGF- β . Mais de 40 BMPs já foram isoladas, entre elas: BMP-2 a BMP-6; BMP-7 (proteína osteogênica OP-1), BMP-8 (proteína osteogênica OP-2) e fatores de diferenciação/crescimento (GDF-5 a GDF-7). No entanto, as várias BMPs não são idênticas em seu potencial osteoindutivo (RILEY et al., 1996).

Pela imunoistoquímica, LIANJIA & YAN (1990), mostraram a distribuição da BMP nas fibras colágenas do osso normal, nas células periosteais e nas células mesenquimais do estroma medular. Pouco pôde ser encontrado nas células ósseas do osso lamelar ou na matriz óssea descalcificada.

Foram isoladas as BMPs de mamíferos recém-nascidos a partir da matriz óssea, células periosteais, células mesenquimais do estroma medular, e também de células do osteossarcoma e condrossarcoma (KIRKER-HEAD, 1995). A extração é difícil, não inteiramente previsível e sempre contém muitos contaminantes; entretanto, com a aplicação da tecnologia recombinante é possível produzir quantidades quase ilimitadas de rhBMP (RILEY et al., 1996).

KIRKER-HEAD (1995) afirmou que as BMPs são fatores diferenciadores cuja principal função é induzir a transformação das células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos e osteoblastos de forma dose-dependente. A habilidade osteoindutora das mesmas já foi demonstrada em uma grande variedade de espécies, com diversos carreadores, incluindo colágeno e polímeros, em sítios heterotópicos e ortotópicos. Geralmente a capacidade osteoindutiva é inversamente proporcional à posição da espécie na escala filogenética. Em ratos de diferentes idades, conforme LINKHART et al. (1996), a extensão da osteoindução pela BMP bovina diminuiu com a idade, sugerindo um declínio no número ou na resposta das células precursoras.

Segundo REDDI (2001), quando as BMPs se combinam a receptores de superfície nas células mesenquimais, um sinal em cascata é ativado. Estes são enviados via proteínas específicas ao núcleo celular, resultando na expressão de genes que levam a síntese de macromoléculas envolvidas na formação de cartilagem e osso. Foram identificados dois receptores tipo I (BMPR-1A e 2B) e um tipo II (LIEBERMAN et al., 2002). Acredita-se que, embora a osteogênese seja iniciada pela BMP, os fatores de crescimento sejam importantes na promoção e manutenção do osso induzido, bem como na remodelação (FORELL & STRAW, 1993).

Os potenciais usos clínicos das BMPs incluem a substituição de enxertos ósseos no tratamento de uniões retardadas, não-uniões, má-consolidações do eixo, artrodeses e procedimentos ortopédicos reconstrutivos, entre outros (RILEY et al., 1996).

De acordo com SAKOU (1998), as funções de BMPs individuais foram avaliadas em muitos estudos *in vitro* usando várias linhagens celulares, tais como células progenitoras multipotenciais, células osteoprogenitoras, osteoblastos, condroblastos e células do osteossarcoma. As BMPs induzem ou inibem a proliferação dependendo dos tipos celulares e condições da cultura. Podem estimular a indução óssea ectópica ou ortotópica. A BMP-2 recombinante humana (rh), a BMP-4, a BMP-5 e a BMP-7 (OP-1) possuem atividade osteogênica e condrogênica, enquanto diferentes BMPs podem ter atividades quantitativas diferentes.

BARNES et al. (1999) citaram que, em estudos iniciais no reparo de fratura, foram utilizadas preparações parcialmente purificadas de BMPs obtidas de matriz óssea desmineralizada com resultados encorajadores. Segundo SAKOU (1998), a BMP-2/-4 e a BMP-7 (OP-1) trabalham cooperativamente e sinergicamente, afetam vários estágios da formação óssea e promovem consolidação da fratura, mas com atividades distintas. A BMP-7 não foi encontrada em condrócitos 14 dias após a

fratura e, desta forma, parece atuar especificamente no estágio inicial da consolidação.

Um carreador de BMPs, conforme (SAKOU, 1998), é requerido para uma formação óssea eficiente, embora a implantação de rhBMPs sem o mesmo também induza à formação óssea. Entre as funções do carreador estão atrasar a rápida dispersão da rhBMP do local do implante e proteger as proteínas recombinantes de lises não específicas (KIRKER-HEAD, 1995). O carreador deve ser biodegradável, ter integridade estrutural e ausência de imunogenicidade (SAKOU, 1998). De acordo com GROENEVELD & BURGER (2000), as propriedades geométricas de um carreador podem influenciar a performance da BMP. Partículas sólidas de hidroxiapatita e discos sólidos de polímero foram desfavoráveis para a indução óssea; porém, discos porosos e blocos de hidroxiapatita foram favoráveis.

LIEBERMAN et al. (2002) referiram que entre os carreadores e sistemas de liberação usados clinicamente e experimentalmente estão o colágeno tipo I, polímeros sintéticos e gel de ácido hialurônico. Outros potenciais carreadores são os chamados substitutos dos enxertos ósseos, que incluem a matriz óssea desmineralizada, o “Bioglass” e as preparações contendo fosfato de cálcio, tais como a hidroxiapatita e a hidroxiapatita coralínea. Segundo KIRKER-HEAD (1995) o colágeno e os polímeros parecem ter o maior potencial para uso clínico. Além disso, citou que para o reparo de fratura seria desejável um carreador com estrutura semelhante ao osso esponjoso.

O carreador de colágeno, conforme GROENEVELD & BURGER (2000), em geral, é preparado pela desmineralização completa de partículas ósseas corticais ou trabeculares bovinas. Em virtude da possibilidade de riscos da transmissão de patógenos por materiais alogênicos ou xenogênicos, vários materiais sintéticos têm sido desenvolvidos incluindo cerâmicas, vidros bioativos e polímeros. Os polímeros compreendem várias formas de ácido alfa-hidroxil, tais como

ácido láctico, ácido glicólico e seus copolímeros.

Segundo LIEBERMAN et al. (2002), embora o colágeno tenha sido usado com sucesso como carreador de BMP em uma variedade de modelos animais, são necessárias grandes doses de BMP para produzir efeito osteogênico em casos clínicos humanos de fusão espinhal e na aplicação periodontal. Desta forma, têm sido suscitadas algumas hipóteses de que o colágeno interfere com a farmacocinética da liberação do BMP e de alguma maneira limita a resultante resposta osteogênica.

Apesar da hidroxiapatita, hidroxiapatita coralínea e fosfato tricálcico serem osteoindutivos, eles apresentam desvantagens relacionadas às características de manipulação, ao limitado potencial para remodelação e a efeitos não esclarecidos com relação à resistência óssea (LIEBERMAN et al., 2002). A combinação de BMPs com cerâmica não reabsorvível, conforme (GROENEVELD & BURGER, 2000), não resulta em indução óssea, provavelmente pela não reabsorção da hidroxiapatita e sua interferência com a liberação da BMP. Contudo, quando as BMPs são combinadas com cerâmica reabsorvível, há indução óssea.

2.3 Experimentos e casos clínicos com BMP

Ao implantarem BMP bovina em defeitos cranianos de 0,8cm de diâmetro em ratos adultos, TAKAGI & URIST (1981) verificaram que a cicatrização ocorreu não apenas pelo crescimento ósseo da margem do defeito, mas também pela proliferação de células do tipo mesenquimal perivascular da dura-máter. O reparo induzido pela BMP foi dose dependente e a quantidade de osso neoformado foi proporcional à dose da BMP implantada.

NILSSON et al. (1986) compararam a BMP bovina parcialmente purificada, a albumina serosa bovina e o auto-enxerto

corticoesponjoso em defeitos segmentares, com potencial de não-união, na diáfise ulnar de cães. Nos membros em que se implantou 100mg de BMP, o defeito tornou-se, dentro de quatro semanas, preenchido por um calo composto de fibrocartilagem, cartilagem e osso trabecular. A cartilagem foi reabsorvida e substituída por osso em quatro a oito semanas e a união do defeito ocorreu com 12 semanas. Os defeitos em que se aplicou enxerto uniram-se no mesmo período, com a diferença de que o volume do novo osso foi maior na regeneração induzida pela BMP. Naqueles em que se utilizou a albumina serosa bovina, houve o desenvolvimento de pseudoartrose. A hipótese dos autores foi que a BMP induziu a diferenciação das células do tecido conectivo perivascular em condroblastos e células osteoprogenitoras, aumentando o processo de regeneração óssea a partir de células vizinhas presentes no endóstio e perióstio.

Uma combinação de proteína morfogenética humana (h-BMP) e fixação interna foram empregados por JOHNSON et al. (1988), para o tratamento de não-uniões da diáfise femoral em humanos. A consolidação foi obtida em 11 de 12 pacientes. A BMP implantada foi preparada na forma de um agregado de h-BMP e proteínas não colagenosas insolúveis em água, sendo considerada um aditivo aos princípios adequados da fixação de fraturas.

WANG et al. (1990) após purificarem e caracterizarem a rhBMP-2, verificaram que uma única dose implantada em ratos induziu a uma formação óssea dose-dependente. Em altas doses o desenvolvimento ósseo pôde ser observado em cinco dias.

Ao implantarem 11 microgramas de rhBMP-2 com carreador de matriz óssea desmineralizada em defeitos segmentares de fêmur de ratos, YASKO et al. (1992) obtiveram evidências radiográficas, histológicas e mecânicas da união óssea. Não consolidações ocorreram no grupo controle e no que recebeu uma dose baixa de rhBMP-2.

ONO et al. (1992) implantaram esferas de cerâmica de hidroxiapatita sintética sob o perióstio do crânio de coelhos para avaliar a progressão da formação óssea e os efeitos da BMP. Os resultados da densidade mineral óssea no local das esferas revelaram um aumento mais marcado no grupo da BMP do que no controle. A histopatologia revelou formação óssea marginal entre as esferas de cerâmica e o crânio nos grupos controle e colágeno; ao passo que no grupo BMP, a formação óssea ativa foi encontrada não apenas na interface em contato com o crânio, mas também circundando a esfera de cerâmica inteira.

KATOH et al. (1993) combinaram a BMP extraída de osso longo bovino com cerâmica óssea verdadeira (TBC) para produzir um substituto ósseo que possuísse estrutura esponjosa e fosse osteocondutivo e osteoindutivo. A quantidade de formação óssea foi significativamente maior pelo emprego da combinação do que com o TBC sozinho, sugerindo que o TBC, como um carreador para a BMP, proporciona um ambiente favorável à formação óssea.

A eficácia da cerâmica de hidroxiapatita como um carreador de BMP foi investigado por ONO et al. (1995). Após o tratamento com rhBMP2, esferas de hidroxiapatita foram inseridas abaixo do perióstio do crânio de coelhos. Com três semanas após a aplicação, ocorreu extensa formação óssea ao redor das esferas no grupo tratado somente com rhBMP e no grupo com rhBMP associado ao colágeno tipo I. Subseqüentemente, a osteogênese dentro das esferas foi progressiva. Entretanto, o grupo colágeno-rhBMP exibiu indução óssea significativamente maior.

Estudando os efeitos das BMPs 2, 4 e 6 na diferenciação das células osteoprogenitoras de ratos, HUGHES et al. (1995) demonstraram que as BMPs estimularam a diferenciação dos osteoblastos, independente de qualquer efeito condrogênico. Citaram que a BMP-6 pode ser ativa, particularmente no estágio inicial das células

osteoprogenitoras, sendo um alvo importante durante a indução da neoformação do tecido ósseo.

Por meio da utilização de anticorpos monoclonais contra BMP2 e BMP4, BOSTROM et al. (1995) analisaram semiquantitativamente a porcentagem de vários tipos de células em fraturas de ratos. Durante os estágios precoces de consolidação da fratura, apenas um número mínimo de células primitivas foram coradas positivamente no calo. Com o progresso da ossificação endocondral, a presença das BMPs 2 e 4 aumentou dramaticamente, especialmente nas células mesenquimais primitivas e condrócitos. Com a maturação do componente cartilaginoso do calo, ocorreu uma diminuição concomitante no número de células primitivas. Quando os osteoblastos iniciaram a deposição óssea na matriz condróide, a coloração foi fortemente positiva. A intensidade diminuiu na substituição por osso lamelar. Fatos similares ocorreram nas áreas de ossificação intramembranosa. Os dados obtidos sugeriram que as BMPs 2 e 4 são importantes reguladores da diferenciação celular durante o reparo da fratura.

BOSTROM et al. (1996) avaliaram radiograficamente defeitos críticos (2cm) em diáfise de uma de coelhos, nos quais foram implantadas uma combinação de ácido glicólico polilático associado a coágulos sanguíneos autólogos e cinco diferentes concentrações de rhBMP-2. Obtiveram união total desses defeitos após oito semanas nos animais tratados com doses mais altas de rhBMP-2, reforçando a hipótese de haver uma resposta dose-dependente na cicatrização dos defeitos. Histologicamente ocorreu formação óssea normal com abundante osteóide. O estudo demonstrou que rhBMP-2 é capaz de induzir a regeneração óssea quando combinada a carreadores não-colagenosos.

Por meio de um modelo experimental de fraturas mandibulares, em coelhos, imobilizadas com fio de aço, SI et al. (1997) estudaram a expressão da BMP-2 e TGF- β 1 mRNA em diferentes estágios da consolidação. Os resultados mostraram que células

mesenquimais diferenciando-se em osteoblastos e condroblastos, tiveram níveis maiores de BMP-2 mRNA no estágio de formação óssea intramembranosa e condrogênese. O nível de TGF- β 1 mRNA foi maior nos condrócitos e osteoblastos ativos durante a condrogênese e a ossificação endocondral, respectivamente. As observações indicaram que tanto a BMP quanto a TGF- β 1 estão envolvidas na regulação da consolidação de fraturas.

ONISHI et al. (1998) estudaram, por meio de imunistoquímica, a localização da BMP-2/-4, BMP-7 e receptor BMP tipo II (BMPR-II), durante a consolidação de fraturas em ratos. No estágio precoce do reparo da fratura, a expressão da BMP-2/-4 e BMP-7 foi induzida no periósteo espessado próximo às extremidades das fraturas e coincidiu com uma expressão aumentada de BMPR-II. No dia 7, BMP-2/-4 e BMP-7 foram aumentadas em vários tipos de condrócitos e em células como fibroblastos. No dia 14, BMP-7 desapareceu em condrócitos proliferantes e maduros, enquanto BMP-2/-4 continuou em vários tipos de condrócitos até o estágio tardio. A BMP-2/-4 e BMP-7 estiveram presentes em vários níveis no osso trabecular recém formado. A BMPR-II foi ativamente expressada na ossificação intramembranosa e endocondral. Segundo os autores, os achados sugeriram que as BMPs atuam por meio de seus receptores.

Fraturas tibiais bilaterais foram produzidas e estabilizadas usando fixação externa por WELCH et al. (1998) em 16 cabras esqueleticamente maduras. Em cada animal, uma fratura tibial recebeu rhBMP-2 com esponja de colágeno absorvível (ACS) ou apenas tampão com ACS, a fratura contralateral servindo como controle. Para tanto, 01cm de periósteo foi excisado circunferencialmente ao redor das extremidades fraturadas. Os implantes foram colocados sobre a região anteromedial do foco da fratura ou envolvendo-o circunferencialmente. As radiografias mostraram um aumento do calo em três semanas na tibia tratada com rhBMP-2/ACS. Com seis semanas, as fraturas envolvidas

circunferencialmente com rhBMP-2/ACS tinham escores superiores de cicatrização radiográfica. A rhBMP-2 resultou em volume de calo significativo; entretanto, ocorreu apenas moderado aumento em resistência e rigidez. A aplicação do produto de forma circunferencial ou sobre a região anteromedial não foi um fator crítico. Desta forma, os autores sugerem que o uso de rhBMP-2/ACS pode ser um método efetivo no tratamento primário de fraturas e uma alternativa ao enxerto esponjoso autólogo.

LIEBERMAN et al. (1998) desenvolveram um modelo de terapia gene-regional, de maneira que as células estromais da medula óssea infectadas por um adenovírus expressando rhBMP-2 cDNA secretavam BMP-2 biologicamente ativa. Quando implantadas no quadríceps de camundongos imunodeficientes, induziram formação óssea heterotópica; além disso, repararam defeitos segmentares grandes em ratos. Os estudos demonstraram que a terapia gene-regional com contínua liberação de fatores osteocondutivos pode ser uma possibilidade futura para o tratamento de não-uniões e outros problemas associados com a perda óssea.

A BMP foi combinada, por KUBOKI et al. (1998), com três diferentes formas de hidroxapatita, isto é, partículas sólidas, partículas porosas e tabletes. A formação óssea somente foi observada quando utilizaram partículas porosas e tabletes, indicando que a estrutura lisa inibe a formação vascular e a proliferação de células mesenquimais.

JEPPSSON et al. (1999) observaram que, em modelos de consolidação óssea espontânea em coelhos com câmara de colheita, uma dose baixa de BMP-2 reduziu o crescimento tecidual e tendeu a diminuir a formação óssea. A BMP-7 mostrou o mesmo efeito e a BMP-2 com um carreador de hidroxapatita inibiu a formação óssea. Quando foi permitido contato com tecido extra-esquelético não foi verificado efeito da BMP-2. O limite entre o implante de BMP-2 e osso pré-existente não pareceu como uma parede de cisto. Por sua vez, a mesma BMP-2 com

carreador similar ao colágeno, quando aplicada em modelos de câmaras ósseas inseridas agudamente em ratos, aumentou regularmente a formação óssea. Os autores concluíram que a inibição ocorrida no modelo utilizado em coelhos não foi devida à sobredose, ao tipo específico de BMP ou carreador, ou à diferenciação prematura do calo. As células mesenquimais indiferenciadas podem ter sofrido apoptose em resposta a BMPs; além disso, o estudo sugeriu que um estímulo mecânico ou traumático foi necessário para que as BMPs induzissem a formação óssea.

Os efeitos da rhBMP-2, administradas em partículas biológicas de proteção, colágeno gel, ou por injeção, foram investigados por BAX et al. (1999) na consolidação de fraturas instáveis e estáveis de tíbias de coelhos. As partículas biológicas de proteção preveniram a migração de células que produzem o calo e o colágeno gel foi reabsorvido rapidamente. O desenvolvimento do calo de fraturas instáveis mecanicamente foi similar ao controle em 14 dias. Desta forma, tanto as partículas como o colágeno gel, foram inadequados como carreadores. Quando a rhBMP-2 foi injetada, o calo de fraturas mecanicamente instáveis desenvolveu-se mais rapidamente, de forma que a união cortical ocorreu com 21 dias, comparado com 29 dias das fraturas controles. Os efeitos na consolidação de fraturas sob condições mecânicas estáveis foram mínimos. Os autores citam que os fatores mecânicos influenciam o tamanho do calo e, embora a BMP-2 acelere a taxa de desenvolvimento do calo e união cortical, ela não afeta a quantidade de osso e cartilagem produzidos.

HECKMAN et al. (1999) induziram não-uniões na diáfise radial de cães, tratadas com copolímero de ácido poliglicólico-ácido polilático combinado com várias doses de BMP canina purificada ou TGF- β 1 recombinante humana ou ainda ambas. A formação óssea aumentou quando BMP espécie-específica foi usada com um carreador biodegradável. A TGF- β 1 na dose de 10 nanogramas não induziu similar

grau de formação óssea nem potencializou o efeito da BMP.

A rhBMP2 foi implantada no subcutâneo de ratos por JIN et al. (2000) com três diferentes tipos de hidroxiapatita. A formação óssea direta ocorreu quando se utilizou a hidroxiapatita em partículas porosas e em blocos porosos, porém ocorreu ossificação endocondral quando empregada em formato de favo de mel (HONEYCOMB), indicando que a formação óssea induzida pela BMP é altamente dependente da geometria do carreador.

NAKAGAWA et al. (2001) investigaram a imunolocalização da BMP-2 endógena durante o processo de formação do osso ectópico pela rhBMP-2 em músculo de ratos. Os resultados sugeriram que os condrócitos e osteócitos induzidos pela rhBMP-2 produziram BMP-2 endógena. Parte da BMP-2 endógena que se acumulou na matriz condróide foi absorvida pelos condrocitos e participou na diferenciação osteoblástica de células mesenquimais imaturas. Segundo os autores, o estudo indicou que a BMP-2 endógena é parte importante na cascata de desenvolvimento ósseo durante a osteoindução ectópica.

Para avaliar a potencialidade da rhBMP-2 em acelerar a consolidação de fraturas, BOUXSEIN et al. (2001) efetuaram osteotomias (0,5 a 1mm) bilaterais na porção medial da ulna de coelhos. Os membros foram divididos em grupos que receberam esponja de colágeno absorvível contendo rhBMP-2, esponja de colágeno absorvível com tampão e um não tratado. Nos dois primeiros grupos as tiras de colágeno foram aplicadas ao redor do foco de fratura. Os membros foram mantidos imobilizados por quatro dias. Houve necessidade de eutanásia antecipada de três coelhos, dois no grupo de três semanas e um no grupo de seis semanas, em decorrência de fratura radial. Por meio de cintigrafia, observaram que três horas após o procedimento em torno de 73% da dose administrada de rhBMP-2 foi inicialmente retida no foco de fratura. Em uma semana havia 37% da dose inicial e após duas semanas 8%. No período de duas semanas, a área do calo mineralizado, avaliada por

tomografia computadorizada quantitativa, foi similar em todos os grupos, mas com três e quatro semanas estava 20 a 60% maior no grupo tratado com BMP. As propriedades mecânicas do calo ósseo foram similares em todos os grupos com duas semanas, mas com três a quatro semanas foram 80% maiores no grupo que recebeu BMP. Com seis semanas as propriedades mecânicas foram similares em todos os grupos e se assemelhavam às da ulna intacta. Pelo exame histológico, verificaram padrões diferentes nas superfícies palmar e dorsal da ulna, provavelmente associados ao acesso cirúrgico e colocação dos implantes. Na superfície palmar, com quatro semanas, o espaço da osteotomia e o calo da ulna tratada com rhBMP-2 estavam totalmente ossificados. Nos outros dois grupos o calo permanecia pequeno e foi composto de osso e cartilagem. Na superfície dorsal, a formação do calo, em todos os grupos, procedeu também pela ossificação endocondral, mas sempre de forma mais avançada nos que receberam BMP. Os autores concluíram que os animais tratados com BMP apresentaram uma velocidade de cicatrização óssea 33% maior.

Após a aplicação de aloenxerto intercalado no fêmur de ratos, LEE et al. (2002) efetuaram osteotomia transversa na porção média do enxerto. Em 20 ratos foi aplicado BMP-2 no local de osteotomia, 20 serviram como controles independentes e 20 receberam apenas carreador. A avaliação radiográfica mostrou união óssea na oitava semana somente nos tratados com BMP. Os demais apresentavam apenas fibrose. Os dados sugeriram que o reparo da fratura no osso enxertado pode estar associado a um regulador biológico.

VÖGELIN et al. (2002) pré-fabricaram, em ratos, um enxerto ósseo vascularizado formado por retalho periosteal vascularizado (periósteo, músculo e fáscia) contendo células osteoprogenitoras, matriz estrutural e rhBMP-2. Nova formação óssea aumentou, radiográfica e histologicamente, apenas nos retalhos periosteais contendo matriz de ácido poliglicólico (carreador) e rhBMP-2, quando comparados com

vários outros produtos. De acordo com os autores, no futuro a técnica pode ser usada para reconstruir defeitos ósseos segmentares ou para o tratamento de não-uniões.

Utilizando um modelo de fusão espinhal em ovelhas, SABDHU et al. (2002) demonstraram que a rhBMP-2 levou a fusão radiológica mais precoce e com rigidez mais consistente quando comparada ao uso do auto-enxerto corticoesponjoso. Também histologicamente, a taxa de fusão foi três vezes maior, além da redução significativa do tecido fibroso ao redor do implante de titânio.

DEN BOER et al. (2002) investigaram em 40 ovelhas a habilidade da rhOP-1 em acelerar a consolidação de fraturas tibiais produzidas por método fechado. As fraturas foram estabilizadas com fixador externo e tratadas, via fluoroscopia, da seguinte maneira: (1) sem injeção; (2) injeção de 01mg de rhOP-1 dissolvida em tampão aquoso; (3) injeção de matriz colágena e (4) injeção de 01mg de rhOP-1 associada com matriz colágena. Com duas semanas de pós-operatório, o diâmetro do calo avaliado por exame radiográfico, o volume do calo determinado pela tomografia e o conteúdo mineral no foco de fratura aferido por absormetria estavam significativamente aumentados nos grupos onde havia sido injetada a rhOP-1, quando comparados com o grupo sem injeção. A maturação acelerada do calo ósseo, ponte óssea e maior rigidez à inclinação e torção foram mais evidentes no grupo rhOP-1 dissolvido em tampão aquoso, em relação às fraturas não-injetadas. Por sua vez, a rhOP-1, associada a matriz colágena, não resultou em melhora das propriedades biomecânicas nem na formação de ponte óssea. Após quatro semanas, não houve diferença entre os grupos, com exceção do grande volume de calo ósseo observado no grupo rhOP-1 associada ao colágeno. O padrão histológico foi semelhante em todos os grupos 2 semanas após a cirurgia. As fraturas tratadas somente com matriz colágena e rhPO-1 associada ao colágeno tinham menos lados com ponte óssea, além de remanescentes de partículas do colágeno e células

multinucleares adjacentes a essas partículas, indicando uma reabsorção mediada por células. Um estágio avançado de consolidação foi notado igualmente em todos os grupos quatro semanas após a cirurgia e poucas partículas remanescentes foram observadas naqueles onde foi utilizado colágeno. Os autores concluíram que uma única administração local de rhOP-1 pôde acelerar a consolidação de fraturas; no entanto, o carreador não pareceu ser necessário.

2.4 Densitometria óssea

LOUZADA et al. (1989) empregaram a densitometria óptica em radiografias (equivalência em mmAl) para avaliar quantitativamente a reparação de perfurações ósseas induzidas no terço distal de ambas as ulnas de coelhos, tratadas ou não com ultra-som pulsado. Os autores concluíram que o método foi eficiente na avaliação quantitativa da reparação óssea; no entanto, não foram notadas diferenças significativas entre os membros controles e os tratados. As informações obtidas pela microfotodensitometria foram equivalentes às observadas pela análise histológica.

Perfurações ósseas foram efetuadas por GUERRA (2002) nas extremidades proximais e distais de fraturas transversas induzidas experimentalmente no terço distal do rádio de cães com o intuito de estimular a formação de calo ósseo. Os animais foram avaliados por densidade mineral óssea por imagens radiográficas, exames radiográficos, tomográficos e histológicos. Os estudos densitométricos realizados aos 15 (M1), 30 (M2), 45 (M3), e 60 dias (M4) mostraram valores maiores nos animais tratados (M1=2,84; M2=3,08; M3=2,98 e M4=2,91) do que nos controles (M1=2,57; M2=2,61; M3=2,83 e M4=2,49). Radiograficamente somente aos 15 e 30 dias ocorreu um processo de reparação óssea mais intenso no grupo tratado. Fato semelhante foi

detectado pela tomografia. Pela análise histológica, aos 15 e 30 dias observou-se hiperplasia de condrócitos e início de ossificação endocondral no grupo tratado, bem como tecido conjuntivo e início de hiperplasia de condrócitos no grupo controle. Aos 45 e 60 dias, o grupo tratado estava em estágio mais avançado que o controle.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e ambiente de experimentação

A comissão de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp Botucatu aprovou o desenvolvimento desse trabalho (Anexo 1).

Foram utilizados 15 coelhos, da raça Norfolk variedade Botucatu, machos, com idade entre cinco e seis meses, peso corpóreo médio inicial de 3,5kg, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu. Os animais foram divididos por sorteio e numerados de 1 a 15, e alocados em gaiolas individuais 60x60x60cm, suspensas do solo, com água e ração comercial¹ *ad libitum*.

3.2 Técnica anestésica

Os animais foram tranqüilizados com uma mistura de acepromazina² (0,1mg/kg) e butorfanol³ (0,1mg/kg) aplicados por via intravenosa e, quinze minutos após, anestesiados com a combinação de tiletamina-zolazepan⁴ na dose de 20mg/kg, por via intranasal.

¹NUTRICOELHO - Purina - Rod. Campinas/Paulinha, Km 123 - Paulinha, SP.

²ACEPRAN 0,2% - Univet S. A. - Rua Clímaco Barbosa, 700 - São Paulo, SP.

³TORBUGESIC - Fort Dodge Ltda. - Rua Luiz Fernando Rodrigues, 1701 - Campinas, SP.

⁴TELAZOL - Fort Dodge Ltda. - Rua Luiz Fernando Rodrigues, 1701 - Campinas, SP.

3.3 Procedimento cirúrgico

Após a tricotomia dos membros anteriores, direito (tratado) e esquerdo (controle), os coelhos foram, inicialmente, posicionados em decúbito lateral esquerdo. A anti-sepsia da área cirúrgica foi efetuada com álcool iodado e a porção do membro distal à articulação carpometacárpica isolada por meio de atadura de crepom. Posteriormente foram dispostos os panos de campo operatório.

O rádio esquerdo foi abordado por meio de acesso craniomedial. A pele e tecido subcutâneo foram incisados acima do processo estilóide medial do rádio e prosseguiu até a metade proximal do rádio. A veia cefálica foi protegida durante a incisão e posteriormente afastada. Após incisão da fáscia profunda, efetuou-se a retração dos músculos extensor carporadial e flexor radial do carpo, bem como artéria e veia radiais, visualizando-se a diáfise do rádio. Foi produzida uma fratura transversa na porção média da diáfise do rádio, por meio de serra giratória (amplitude do defeito de 2mm). Não foram realizadas manobras para remover o perióstio ao redor do local de osteotomia. O tecido subcutâneo foi aproximado por uma sutura contínua simples e a pele em pontos isolados simples, ambos com fio de náilon 3-0.

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e o membro anterior direito submetido ao mesmo procedimento utilizado no membro esquerdo. A exceção foi à aplicação, no foco de fratura, da associação de BMPs adsorvidas à hidroxiapatita⁵ e aglutinante de colágeno bovino em grânulos⁶. Utilizou-se a proporção de uma parte de BMPs para 10 partes de colágeno, segundo recomendações do fabricante, que foram acrescidas de 0,05ml de solução fisiológica 0,9% até adquirirem consistência pastosa. Nessa forma, o produto foi aplicado ao redor das extremidades fraturas.

⁵GEN-PRO - Baumer S.A. - Divisão Biomateriais - Av. Pref. Antonio Tavares Leite, 181 - Parque da Empresa, 13800-000 - Mogi Mirim, SP.

⁶GEN-COL - Baumer S.A. - Divisão Biomateriais - Av. Pref. Antonio Tavares Leite, 181 - Parque da Empresa, 13800-000 - Mogi Mirim, SP.

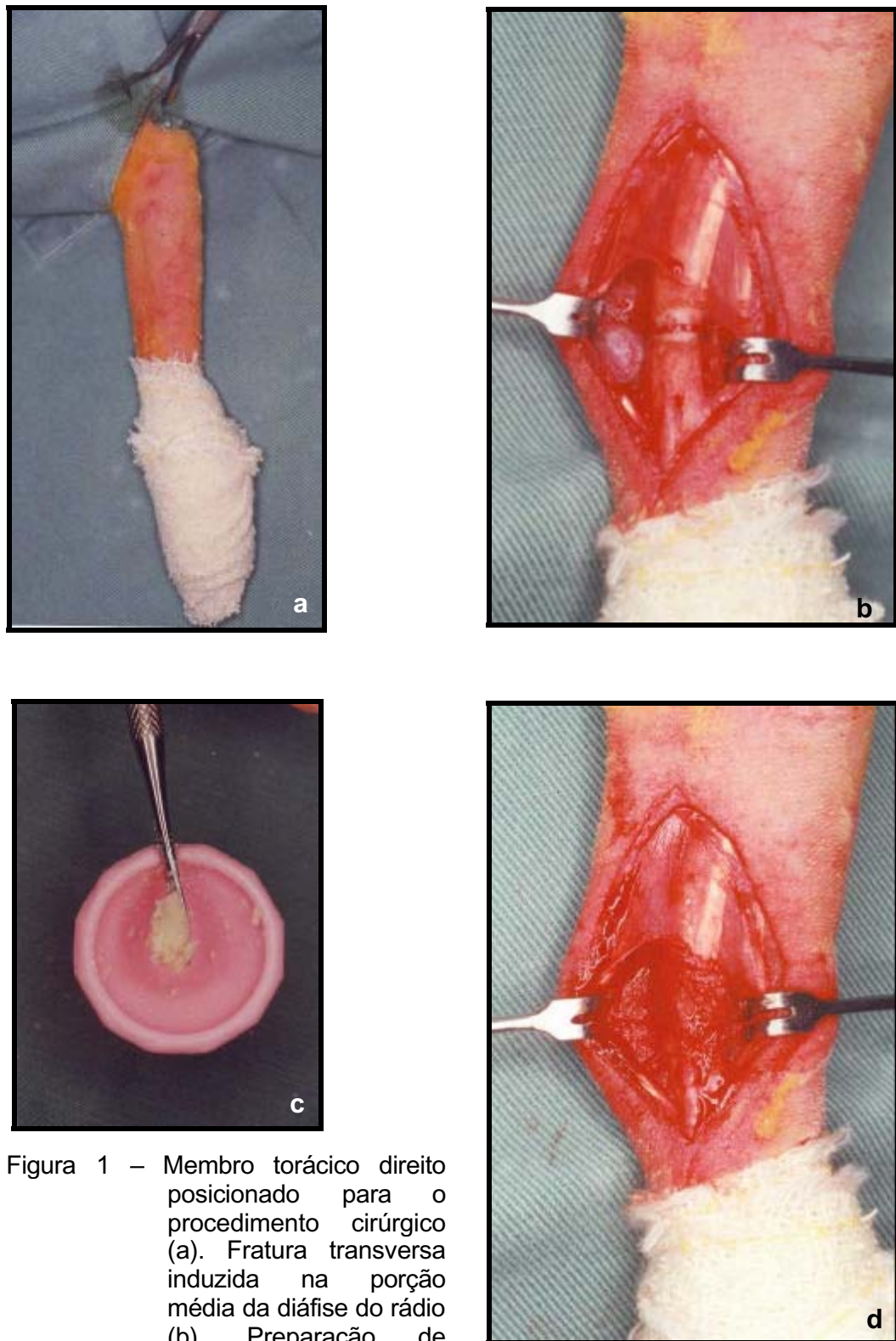


Figura 1 – Membro torácico direito posicionado para o procedimento cirúrgico (a). Fratura transversa induzida na porção média da diáfise do rádio (b). Preparação de BMPs adsorvidas à hidroxiapatita e grânulos de colágeno (c). Aplicação da mistura ao redor das extremidades fraturas (d).

3.4 Condutas pós-operatórias

Foram aplicadas duas doses de enrofloxacina⁷ (5mg/kg por via subcutânea), sendo a primeira no momento da indução anestésica e a segunda 24 horas após o ato cirúrgico. Buprenorfina⁸ foi administrada na dose de 0,02mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas, durante cinco dias. As feridas foram limpas diariamente com solução fisiológica e iodopovidona. Os pontos cutâneos foram removidos com 10 dias de pós-operatório.

3.5 Avaliação clínica

Constou de observações quanto o aspecto da ferida cirúrgica, presença ou não de edema nos membros, apoio ao solo, ingestão de ração e água, defecação e micção.

3.6 Exames radiográficos

Com os animais contidos, os membros foram radiografados, em posições craniocaudal e mediolateral, ao término do procedimento cirúrgico e aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório. O filme utilizado foi Kodak, base verde, 18x24, sendo à distância foco filme de 90cm. A revelação foi por processadora automática Macrotec⁹.

A fratura induzida experimentalmente foi avaliada, especialmente na posição craniocaudal, quanto a radiodensidade na linha de osteotomia (radiotransparente, radiodensa ou ausente), localização do calo ósseo periosteal (unicamente medial, unicamente lateral, ou medial e

⁷BAYTRIL 5% - Bayer S.A. - Rua Domingos Jorge, 1000 - São Paulo, SP.

⁸TENGESIC - Schering-Plough S.A. - Estrada dos Bandeirantes, 3091 - Rio de Janeiro, RJ.

⁹MACROTEC - Ind. e Com. de Equipamentos Ltda.

lateral), presença de ponte óssea (unicamente medial, unicamente lateral, ou medial e lateral), restabelecimento das corticais (unicamente medial, unicamente lateral, medial e lateral, ou ausente), restabelecimento do canal medular (presente ou ausente) e remodelamento do calo ósseo (presente ou ausente). O volume de calo ósseo foi classificado em pequeno, moderado e exuberante. As avaliações foram realizadas por dois examinadores independentes.

3.7 Exames densitométricos

Realizaram-se estudos de densitometria óptica por imagens radiográficas em posição craniocaudal nos focos de fratura dos membros direito e esquerdo, no pós-operatório imediato e na época do sacrifício, ou seja, aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório.

A determinação da densidade mineral óssea, em milímetros de alumínio (mmAl), foi obtida por meio de um programa computacional (software¹⁰) desenvolvido para medir a densidade óptica em filmes de raios-X. A leitura foi realizada de acordo com recomendações de LEAL (2002). Foram realizadas três aferições na borda da extremidade proximal da fratura e três na borda da extremidade distal, determinando-se um valor médio para cada extremidade. Os valores médios foram somados e divididos por dois, obtendo-se o total da densidade mineral óssea no foco de fratura

A análise estatística para a comparação do efeito do tempo após implantação da BMP aos 30, 60 e 90 dias nos membros esquerdo (controle) e direito (tratado), foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Willis e entre membros em cada momento pelo teste de Wilcoxon, ambos ao nível de 5% de significância (ZAR, 1996).

¹⁰ATHENA - SAI - Sistema de Inteligência Avançada Com. Imp. Exp. Ltda - São José dos Campos, SP.

3.8 Técnica de exame histológico

Para a realização do exame histológico, foi realizada a eutanásia de cinco coelhos aos 30, 60 e 90 dias, empregando-se pentobarbital sódico¹¹, na dose de 30mg/kg por via venosa, seguido de cloreto de potássio¹² na dose de 1ml/3kg de peso vivo.

Foi colhida a porção diafisária média do rádio e ulna, de ambos os membros, incluindo o foco de fratura e 1cm a partir do mesmo. As peças foram fixadas, durante sete dias, em formol tamponado 10% e pH7. Posteriormente foram desmineralizadas em solução de EDTA (solução contendo 4,13% de Tritriplex III *Merk*® e 0,44% de Hidróxido de sódio) a temperatura de 2 a 8° C, por um período aproximado de 60 dias, com trocas semanais da solução desmineralizadora. Após a desmineralização, as peças sofreram os seguintes procedimentos:

- a. lavagem em água destilada por 24 horas;
- b. banho em etanol a 70% até o dia seguinte;
- c. banho de uma hora em etanol a 80%;
- d. banho de uma hora em etanol a 90%;
- e. banho de etanol a 95%;
- f. dois banhos de uma hora em etanol a 100%;
- g. banho de etanol a 100% durante 24 horas;
- h. banho de 30 minutos com xilol;
- i. banho de uma hora em xilol;
- j. banho em Histosec (parafina + resina) por uma hora;
- k. banho em Histosec por oito horas;
- l. inclusão em Histosec;
- m. cortes semi-seriados de 5µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica de Hematoxilina-eosina (LUNA, 1968).

¹¹HYPNOL 3% - Cristália - Rod.Itapira - Lindóia, km 14 - Itapira, SP.

¹²CLORETO DE POTÁSSIO - Darrow Laboratórios S.A. - Rua Marquês de Olinda, 69 - Rio de Janeiro, RJ.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação clínico-cirúrgica

O método utilizado para a secção óssea foi de fácil realização e não induziu fratura no osso adjacente. Os animais apresentaram normorexia e normodipsia 48 horas após o procedimento cirúrgico. No restante do período de manutenção o apetite se manteve inalterado, bem como a defecação e micção. O apoio dos membros torácicos ocorreu nas primeiras 24 horas de pós-operatório e, posteriormente, nenhuma complicação referente à locomoção foi observada. As feridas cirúrgicas cicatrizaram adequadamente.

4.2 Exames radiográficos

No pós-operatório imediato, em todos os animais, verificou-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo. Os resultados percentuais das análises radiográficas na posição craniocaudal, aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório, dos focos de fratura dos raios direito e esquerdo, com relação a radiodensidade na linha de osteotomia, localização do calo ósseo periosteal, presença de ponte óssea, restabelecimento das corticais, restabelecimento do canal medular e remodelamento do calo ósseo, encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Nos diferentes momentos de avaliação, o calo periosteal foi predominante na cortical lateral em relação à medial. O volume do calo foi maior aos 30 do que aos 60 dias, variando de moderado a pequeno, e semelhante entre os membros. No apêndice estão descritas as análises dos coelhos individualmente (Tabelas de 4 até 9).

Tabela 1 – Resultados percentuais da análise radiográfica em posição craniocaudal, dos focos das fraturas induzidas experimentalmente no rádio direito (tratado) de coelhos, aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório.

	30° dia pós-operatório (n=15)	60° dia pós-operatório (n=10)	90° dia pós-operatório (n=5)
Linha de osteotomia	80% radiodensa 20% ausente	100% ausente	100% ausente
Localização calo ósseo periosteal (cortical)	53,33% lateral e medial 46,67% lateral	70% lateral 30% ausente	20% lateral 80% ausente
Ponte óssea	33,33% lateral e medial 66,67% lateral	70% lateral 30% ausente	20% lateral 80% ausente
Restabelecimento corticais	6,67% lateral e medial 33,33% lateral 60% ausente	100% contínuas nas corticais lateral e medial	100% contínuas nas corticais lateral e medial
Restabelecimento canal medular	6,67% presente 93,33% ausente	100% presente	100% presente
Remodelamento calo ósseo	100% ausente	100% presente	100% presente

Tabela 2 – Resultados percentuais da análise radiográfica em posição craniocaudal, dos focos das fraturas induzidas experimentalmente no rádio esquerdo (controle) de coelhos, aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório.

	30° dia pós-operatório (n=15)	60° dia pós-operatório (n=10)	90° dia pós-operatório (n=5)
Linha de osteotomia	86,66% radiodensa 13,34% ausente	30% radiodensa 70% ausente	100% ausente
Localização calo ósseo periosteal (cortical)	53,33% lateral e medial 46,67% lateral	20% lateral e medial 40% lateral 40% ausente	20% lateral 80% ausente
Ponte óssea	40% lateral e medial 60% medial	20% lateral e medial 40% lateral 40% ausente	20% lateral 80% ausente
Restabelecimento corticais	20% lateral 80% ausente	100% contínuas nas cortical lateral e medial	100% contínuas na cortical lateral e medial
Restabelecimento canal medular	100% ausente	20% ausente 80% presente	100% presente
Remodelamento calo ósseo	93,33% ausente 6,67% presente	100% presente	100% presente

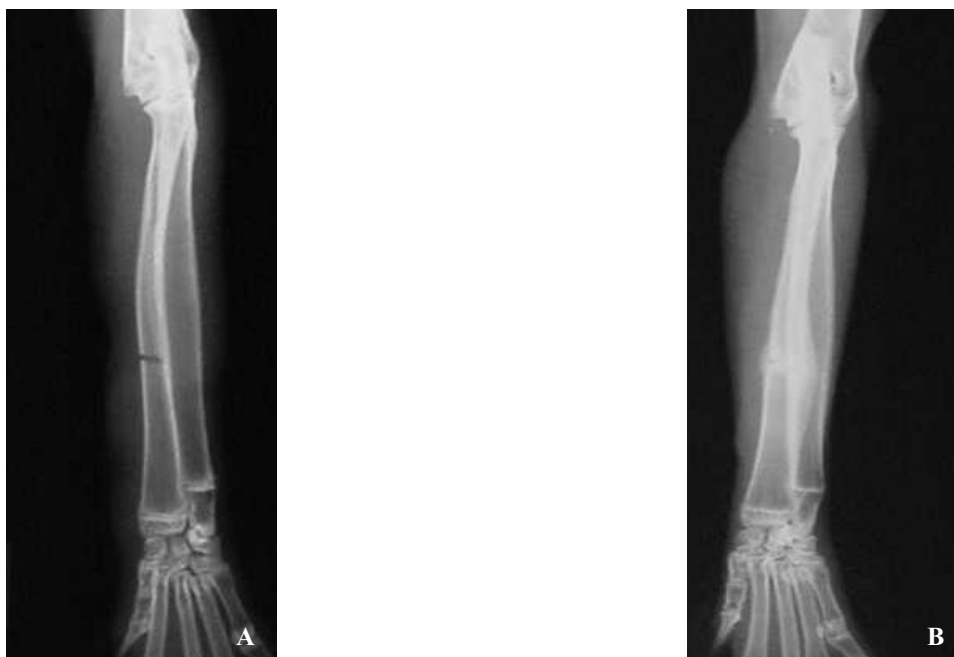


Figura 2 – Aspecto radiográfico dos membros torácicos direitos do animal nº 3 (tratado). No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 30 dias de pós-cirúrgico, constata-se linha de osteotomia radiodensa, calo ósseo periosteal na cortical lateral e medial e ponte óssea na cortical lateral e medial, restabelecimento da cortical lateral e medial e ausência de restabelecimento do canal medular (b).

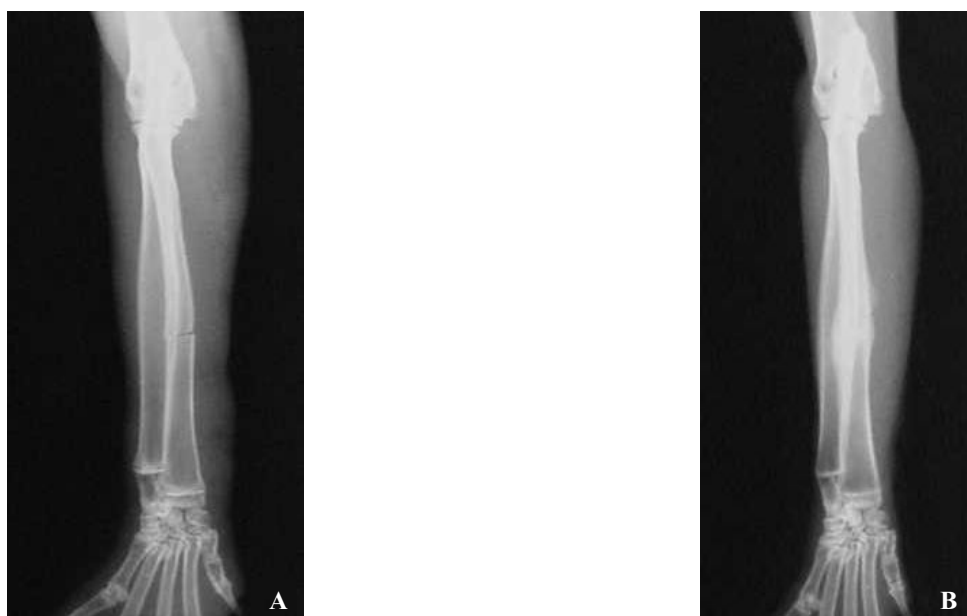


Figura 3 – Aspecto radiográfico dos membros torácicos esquerdos do animal nº 3 (controle). No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 30 dias de pós-cirúrgico, constata-se linha de osteotomia radiodensa, calo ósseo periosteal na cortical lateral e medial, ponte óssea na cortical lateral e medial, restabelecimento da cortical lateral e ausência do restabelecimento do canal medular (b).

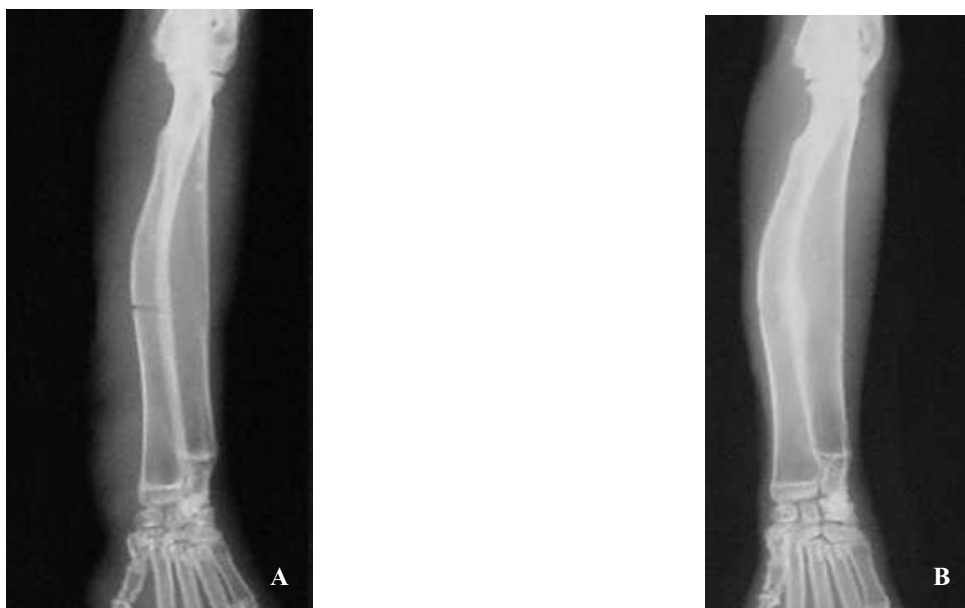


Figura 4 – Aspecto radiográfico dos membros torácicos direitos do animal nº 10 (tratado). No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 60 dias de pós-cirúrgico, constata-se linha de osteotomia ausente, calo ósseo periosteal (em remodelamento) e ponte óssea na cortical lateral, restabelecimento das corticais lateral e medial, restabelecimento do canal medular (b).



Figura 5 - Aspecto radiográfico dos membros torácicos esquerdos do animal nº 10 (controle). No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 60 dias de pós-cirúrgico, constata-se linha de osteotomia ausente, calo ósseo periosteal (em remodelamento) e ponte óssea na cortical lateral, restabelecimento das corticais lateral e medial, restabelecimento do canal medular (b).



Figura 6 – Aspecto radiográfico dos membros torácicos direitos do animal nº 12 (tratado). No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 90 dias de pós-cirúrgico constata-se linha de osteotomia ausente, calo ósseo periosteal ausente, restabelecimento das corticais lateral e medial e do canal medular (b).



Figura 7 – Aspecto radiográfico dos membros torácicos esquerdos do animal nº 12 (controle). No pós-operatório imediato nota-se osteotomia completa e regular, sem fragmentação e sem desvio do eixo ósseo (a). Aos 90 dias de pós-cirúrgico constata-se linha de osteotomia ausente, calo ósseo periosteal ausente, restabelecimento das corticais lateral e medial e do canal medular (b).

4.3 Exames densitométricos

Pela análise estatística não se verificou diferença significativa nos exames densitométricos quer entre momentos ou entre membros ($p>0,05$); entretanto, observou-se aos 30 dias que o valor da mediana do membros tratados correspondeu a 98,5% do valor dos membros controles. A Tabela 3 apresenta os valores medianos, de cinco repetições da variação da densitometria óptica por imagens radiográficas, segundo momentos (30, 60 e 90 dias de pós-operatório) e membros. Os valores densitométricos dos focos de fraturas dos membros direito e esquerdo de cada animal, nos diferentes momentos de avaliação, encontram-se no apêndice, expressos nas Tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 3 – Valores medianos de cinco repetições da variação da densitometria óptica por imagens radiográficas, segundo momentos (30, 60 e 90 dias de pós-operatório) e membros.

MEMBROS		
Momentos	Esquerdo (controle)	Direito (tratado)
30 dias	0,65 aA*	1,29 aA
60 dias	0,75 aA	0,54 aA
90 dias	0,33 aA	0,48 aA

* Letras minúsculas: comparam momentos em cada membro

* Letras maiúsculas: comparam membros em cada momento

Letras iguais indicam diferença não significativa ($p>0,05$)

4.4 Avaliação histológica

4.4.1 Período de 30 dias

Todos os membros torácicos, controles e tratados, exibiram na área de fratura reabsorção da cortical óssea e intensa neoformação de tecido ósseo primário entrelaçado (arranjo trabecular), orientado perpendicularmente ao eixo cortical e ocupando o canal medular, decorrente da grande atividade de células osteoblásticas, oriundas do perióstio e endóstio, e de células pré-diferenciadas pela liberação local de fatores de crescimento e diferenciação (Figuras 8 e 9).

As bordas ósseas da fratura apresentaram-se unidas por calo ósseo que envolvia totalmente os cotos, indicando estabilização do defeito (Figuras 8b e 9b). Na região periosteal, da face óssea voltada para a epiderme, o calo ósseo mostrou-se totalmente formado por tecido ósseo entrelaçado cujas trabéculas já exibiam inúmeras áreas de reabsorção por osteoclastos, indicando a ocorrência de remodelação (Figuras 8a e 9c). Já, o calo ósseo, na face voltada para a ulna, mostrou-se mais volumoso e preenchido por grandes áreas de tecido cartilaginoso, parcialmente ou totalmente reabsorvido e substituído por tecido ósseo entrelaçado (Figuras 8c e 9a). Embora o quadro histológico entre os calos ósseos fosse semelhante, os membros controles apresentaram calos ósseos mais volumosos e menos maduros, ou seja, com maior área de cartilagem hialina e trabéculas mais finas no osso entrelaçado neoformado, em relação aos membros tratados com a BMP, onde o calo ósseo apresentava trabéculas mais espessas e um trabeculado ósseo mais amadurecido. (Figura 10).

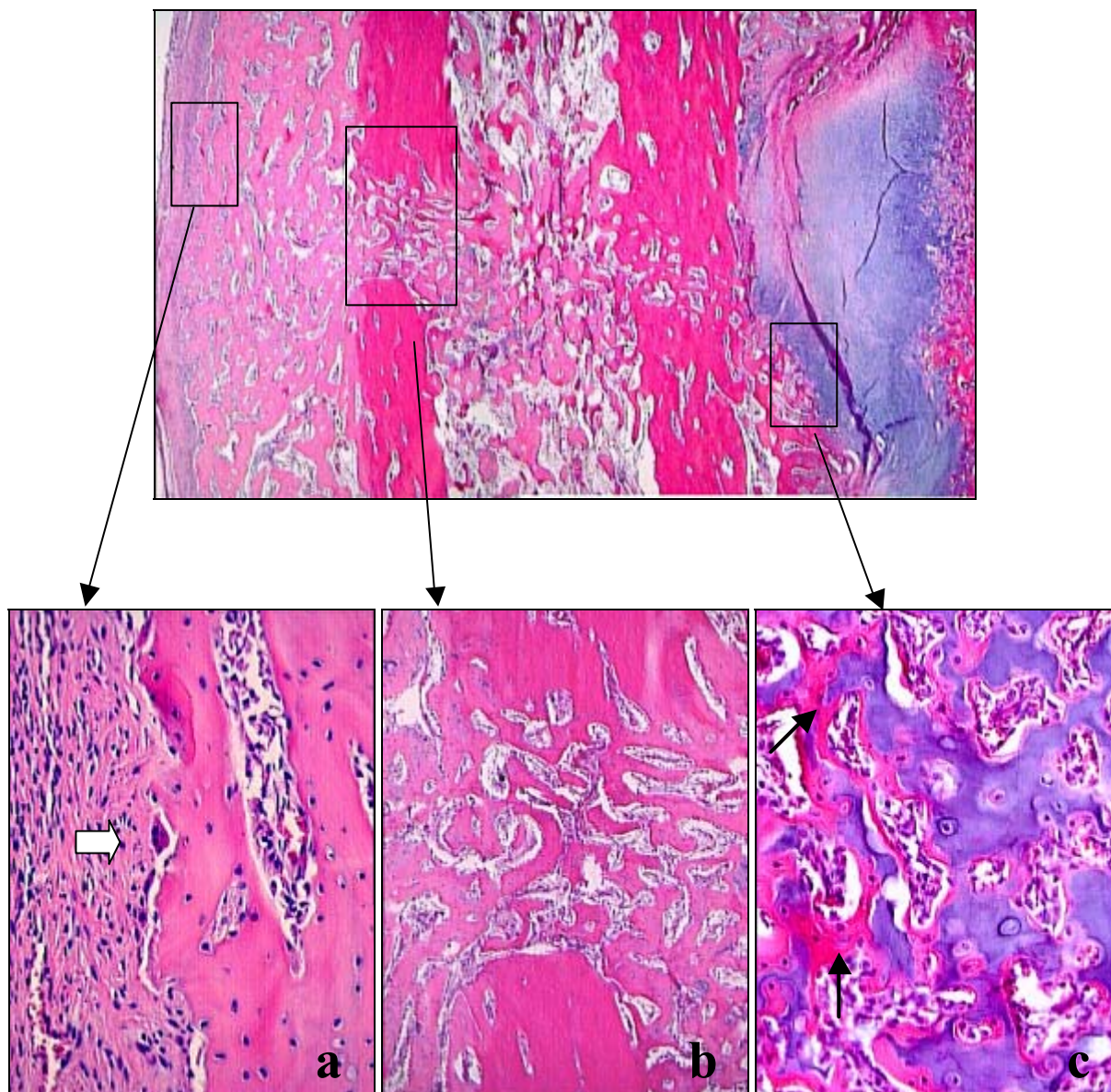


Figura 8 - Representante dos membros controles no período de 30 dias. Observar presença de calo ósseo circundando os cotos da fratura (aspecto geral) e a união da cortical óssea por tecido ósseo primário (b). Na região mais externa do calo ósseo (a) reabsorção da superfície óssea por osteoclastos (seta larga) e na sua face ulnar (c) grande quantidade de tecido cartilaginoso (asterisco) sendo substituído por tecido ósseo (setas).

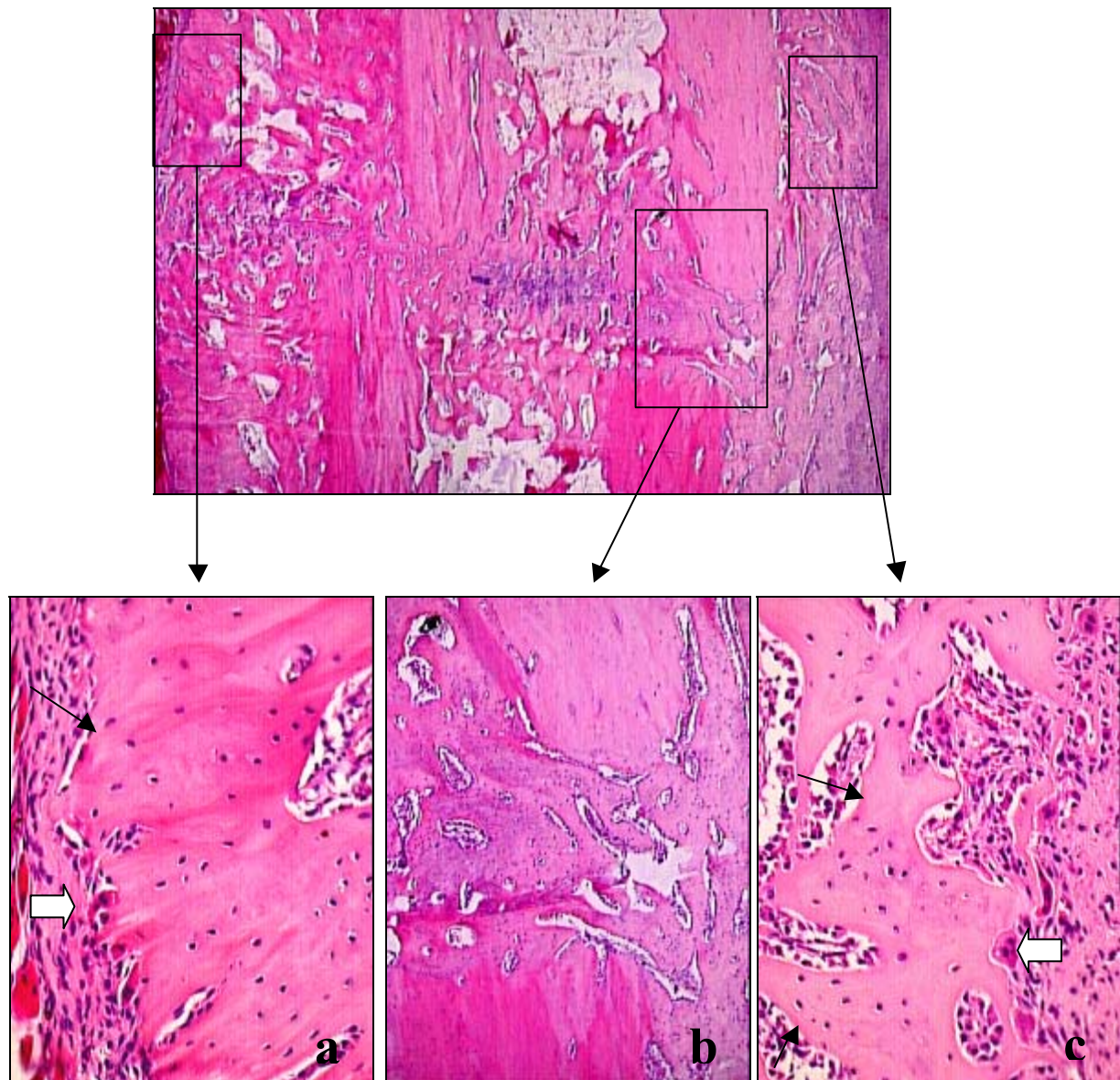


Figura 9 - Representante dos membros tratados no período de 30 dias. Observar presença de calo ósseo circundando os cotos da fratura (aspecto geral) e a união da cortical óssea por tecido ósseo de arranjo mais compacto e maduro em relação ao membro controle (b). Tanto a região do calo ósseo voltado para a epiderme (c) quanto ao localizado na região interóssea do antebraço (a) apresenta tecido ósseo (setas) em reabsorção por osteoclastos (setas largas).

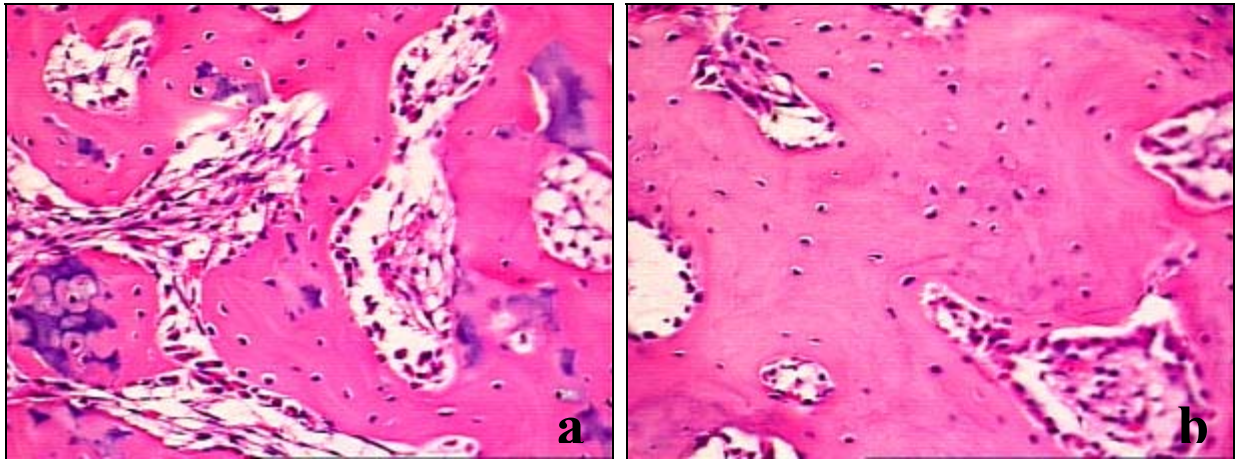


Figura 10 - Tecido ósseo neoformado no período de 30 dias. Observar no membro controle (a) tecido ósseo mais imaturo, com trabéculas ósseas finas em relação ao tratado (b).

4.4.2 Período de 60 dias

Neste período, todos os defeitos dos membros controles e tratados apresentaram restabelecimento do canal medular e remodelação parcial da cortical óssea voltada para a epiderme, que exibiu morfologia funcional já próxima da original (Figuras 11). Já, a cortical óssea voltada para a ulna mostrou-se mais espessa e, em muitos casos, fusionada com a cortical da ulna, formando um único bloco de tecido ósseo entrelaçado em processo de remodelação (Figuras 11).

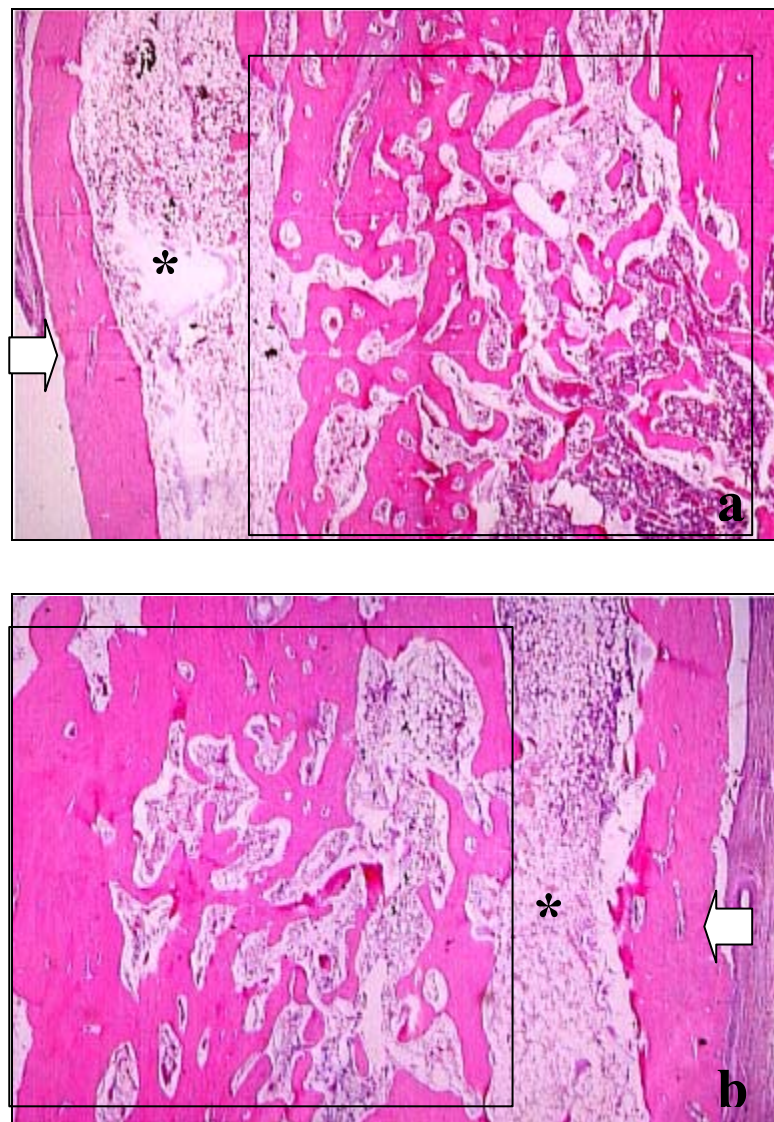


Figura 11 - Período experimental de 60 dias. Observar em ambos os membros, controle (a) e tratado (b), o restabelecimento do canal medular (asterisco), a região da cortical óssea (seta larga) voltada para a epiderme com características semelhantes ao original e o fusionamento do radio e ulna, com formação de um bloco ósseo de arranjo trabeculado em remodelação (área retangular).

4.4.3 Período de 90 dias

Neste período três defeitos de cada membro controle e tratado apresentaram redução do calo ósseo e, em alguns casos, o restabelecimento morfofuncional da estrutura óssea e dos tecidos moles adjacentes (Figura 12). Nos demais defeitos, o quadro histológico apresentava-se semelhante ao do período de 60 dias.

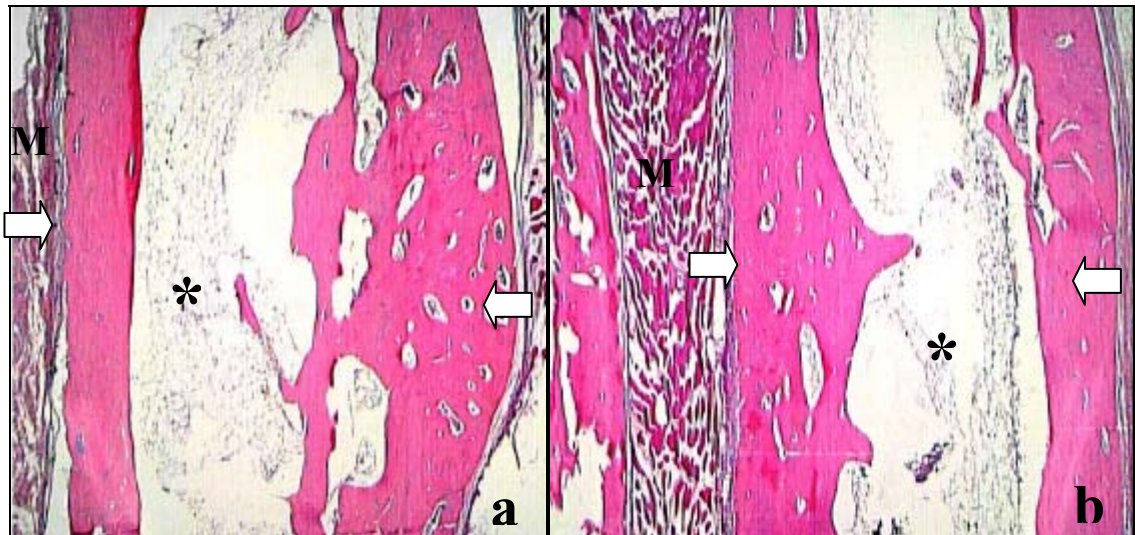


Figura 12 - Período de 90 dias. Observar a redução do calo ósseo e a reparação morfofuncional da cortical óssea (setas), do canal medular (asteriscos) e dos tecidos moles (M) adjacentes.

Em resumo, o processo em ambos os membros, tratados e controles, seguiram o processo de reparação de uma fratura simples, sem complicações mecânicas ou patológicas.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Embora existam vários modelos de falhas ósseas críticas para o teste de biomateriais em animais (NILSSON et al., 1986; YASKO et al., 1992; BOSTROM et al., 1996; DEN BOER et al., 2002), optou-se pelo modelo de cicatrização espontânea em fraturas instáveis, visto que clinicamente algumas fraturas são mais propensas à consolidação retardada ou não-união e poderiam ser beneficiadas por um estímulo extra (BETTS, 1995; LIEBERMAN et al., 2002). Uma técnica semelhante foi utilizada por BOUXSEIN et al. (2001); entretanto, os autores efetuaram osteotomias bilaterais na porção média da ulna de coelhos e imobilizaram o membro por quatro dias. Vale ressaltar que nenhum animal do experimento apresentou fratura do osso adjacente, ao passo que BOUXSEIN et al. (2001) procederam eutanásias antecipadas de três coelhos em decorrência de fratura radial.

O apoio dos membros nas primeiras 24 horas do pós-operatório, aliado ao restabelecimento da normorexia e normodipsia 48 horas após a cirurgia, sugeriram uma adequada analgesia produzida pelo uso da buprenorfina.

Apesar dos estágios de consolidação estarem sujeitos à regulação de diferentes fatores (BOLANDER, 1992), a BMP foi utilizada em dose única e logo após a osteotomia; já que, segundo CRITCHLOW et al. (1995), os agentes indutores da consolidação óssea, para serem efetivos, devem ser utilizados no primeiro estágio da proliferação e diferenciação celular e não na fase de remodelação, na qual interferem negativamente. No experimento, optou-se pela aplicação do conjunto de BMPs ao redor do foco de fratura, no intuito de atingir todas as superfícies das extremidades fraturadas e linhas de fraturas. WELCH et al. (1998) afirmaram que o emprego da rhBMP-2 no foco de fratura de forma

circunferencial ou sobre a região anteromedial não influenciou a formação de calo periosteal; contudo, os autores utilizaram-na associada à esponja de colágeno.

A densitometria óptica por imagens radiográficas permitiu, como citado por LOUZADA et al. (1989) e GUERRA (2002), avaliar quantitativamente a reparação óssea. Pela análise estatística não foi possível detectar diferenças nos exames densitométricos, provavelmente devido ao número da amostra. Contudo, observou-se aos 30 dias que o valor da mediana dos membros tratados correspondeu a quase o dobro do valor dos membros controle (98,5%), sugerindo um efeito positivo da BMP nessa fase. Por sua vez, BOUXSEIN et al. (2001) verificaram, pela tomografia computadorizada, que três e quatro semanas após a indução de osteotomias na ulna de coelhos, o conteúdo mineral do calo foi 20 a 60% maior no grupo tratado com rhBMP-2 em relação ao controle e ao tratado apenas com esponja de colágeno.

Embora o controle radiográfico tenha sido efetuado nas posições lateral e craniocaudal, a avaliação comparativa entre os membros foi realizada especialmente pela imagem craniocaudal em decorrência da melhor visibilidade. Mesmo utilizando um modelo de fratura instável, a presença de calo periosteal de volume pequeno a moderado, associado à ausência de desvio do eixo ósseo, foram indicativos do efeito estabilizador promovido pela ulna. Como referido por HULTH (1989), a produção de calo ósseo está associada ao grau de movimento das extremidades ósseas fraturadas, sendo esse ausente com método de fixação rígida (BARNES et al., 1999).

Os exames radiográficos aos 30 dias de pós-operatório mostraram, em ambos os membros, que a consolidação da fratura estava em estágio avançado, com maior tendência para o restabelecimento de corticais nos membros tratados com BMP (6,67% cortical lateral e medial e 33,3% cortical lateral) em relação aos membros controles (20% cortical lateral). Nesse mesmo período, a avaliação histológica em todos os

membros mostrou neoformação de tecido ósseo primário com arranjo trabecular, o que segundo CORNELL & LANE (1992), representa o estágio de calo duro dentro do processo de reparo da fratura. Além disso, os membros controles apresentavam calo ósseo mais volumoso e menos maduro com maior área de cartilagem hialina e trabéculas mais finas no osso entrelaçado neoformado em relação aos tratados. Por sua vez, BAX et al. (1999) verificaram, em modelo de consolidação de fraturas em coelhos, que a rhBMP-2 acelerou a união cortical e a taxa de desenvolvimento do calo, mas não a quantidade de osso e cartilagem produzidos.

A presença de calo periosteal predominante na cortical lateral em relação a medial, observado tanto pelos exames radiográficos como histológicos, deveu-se à maior preservação do periósteo nesse local, visto que a abordagem cirúrgica foi craniomedial. Fato similar foi notado por BOUXSEIN et al. (2001) que, em osteotomias bilaterais da porção medial da ulna de coelhos, observaram histologicamente padrões diferentes nas superfícies palmar e dorsal da ulna, que foram associados ao acesso cirúrgico e colocação dos implantes.

Aos 60 dias de pós-cirúrgico, pela análise radiográfica, as corticais estavam restabelecidas nos membros tratados e controles; no entanto, a ausência de linha de osteotomia, presença de calo ósseo periosteal e ponte óssea foram aparentemente mais evidentes, onde a BMP foi utilizada. Isso diferiu da avaliação histológica, que não evidenciou diferenças entre os membros, porém mostrava restabelecimento do canal medular e remodelação parcial da cortical óssea, indicando processo evolutivo semelhante ao radiográfico. A sinostose rádio-ulnar observada neste período pode ser um complicador, particularmente em animais em crescimento, uma vez que pode levar a disparidade de crescimento e deformidade óssea (CHAMBERS, 1993).

No período de 90 dias pós-operatório, observou-se de forma similar em ambos os membros a redução do calo ósseo e

restabelecimento morfofuncional da estrutura óssea, tanto pela avaliação radiográfica como histológica, correspondendo, como citado por CORNELL & LANE (1992), ao estágio final da consolidação de fraturas.

Analisando o processo evolutivo como um todo, pode-se afirmar que o produto utilizado não atuou negativamente nas diferentes fases evolutivas. Entretanto, o efeito indutor na formação óssea, observado somente aos 30 dias, aparentemente não foi tão intenso como o evidenciado em outras pesquisas (TAKAGI & URIST, 1981; NILSSON et al., 1986; WANG et al., 1990; KATOH et al., 1993; BOSTROM et al., 1996; LIEBERMAN et al., 1998; HECKMAN et al., 1999; LEE et al., 2002; VÖGELIN et al., 2002; DEN BOER et al., 2002; LIEBERMAN et al., 2002). Algumas hipóteses serão discutidas no sentido de esclarecer a questão.

O estudo da produção óssea é mais facilmente avaliado em defeitos (TAKAGI & URIST, 1981; NILSSON et al., 1986; YASKO et al., 1992; BOSTROM et al., 1996) do que em modelos de fraturas com potencial para consolidação (WELCH et al., 1998; BAX et al., 1999; BOUXSEIN et al., 2001; DEN BOER et al., 2002), como o adotado no experimento.

Existem vários métodos e fontes de isolamento das BMPs (KIRKER-HEAD, 1995); sendo que com a tecnologia recombinante, elas podem ser produzidas em quantidades ilimitadas (RILEY et al., 1996). A BMP utilizada no experimento foi extraída de osso cortical de feto bovino; sendo, portanto de produção limitada e menos purificada. Para produção de 1 micrograma de BMP utiliza-se 10 quilogramas de osso bovino. Embora já tenham sido isoladas mais de 40 BMPs (SAKOU, 1998), entre as que possuem atividade osteogênica e condrogênica estão a BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 (SAKOU, 1998; WANG et al., 1990; YASKO et al., 1992; HUGHES et al., 1995; BOSTROM et al., 1995; SI et al., 1997; LIEBERMAN et al., 1998; ONISHI et al., 1998; JEPPSSON et al., 1999; NAKAGAWA et al., 2001; LEE et al., 2002; VÖGELIN et al., 2002; SABDHU et al., 2002). Uma vez que o biomaterial empregado consistiu de

um conjunto de BMPs, a quantidade e qualidade óssea produzida pode ter sido inferior a verificada em outros trabalhos experimentais, que a utilizaram de forma pura.

Mesmo utilizando as indicações do fabricante, não foi possível determinar com exatidão a quantidade de BMP aplicada. Esse fato pode ter contribuído para os resultados, já que a função da BMP de induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos e osteoblastos é dose-dependente e a quantidade de osso neoformado proporcional à dose implantada (TAKAGI & URIST, 1981; WANG et al., 1990; YASKO et al., 1992; KIRKER-HEAD, 1995; BOSTROM et al., 1996; HECKMAN et al., 1999).

Existem vários tipos de carreadores, sejam eles sintéticos ou não, que são utilizados com intuito de retardar a dispersão da BMP e protegê-la de lises, propiciando assim a formação óssea (KIRKER-HEAD, 1995; SAKOU, 1998; GROENEVELD & BURGER, 2000; LIEBERMAN et al., 2002). O carreador utilizado no experimento foi a hidroxiapatita, adsorvida pelo fabricante ao conjunto de BMPs na proporção de 1:20 (BMP-HA). O produto se inclui entre os chamados substitutos do enxerto ósseo (LIEBERMAN et al., 2002) e tem sido utilizado com bons resultados (ONO et al., 1992, KATOH et al., 1993; ONO et al., 1995), embora segundo KIRKER-HEAD (1995), o colágeno e os polímeros estejam entre os carreadores de maior potencial para uso clínico. Como a hidroxiapatita empregada está associada a BMP na forma de pó, pode ter havido interferência negativa, uma vez que as propriedades geométricas de um carreador podem influenciar a performance da BMP (GROENEVELD & BURGER, 2000; JIN et al., 2000). Segundo KUBOKI et al. (1998), as partículas sólidas de hidroxiapatita inibem a formação óssea, ao passo que as partículas porosas ou tabletes porosos a estimulam.

O colágeno aplicado no experimento foi em grânulos, preparado por desmineralização de partículas ósseas de cortical bovina,

como citado por GROENEVELD & BURGER (2000), ou por tendões bovinos.

Quando utilizado como carreador em modelos animais, o colágeno tem sido considerado adequado (WELCH et al., 1998; BAX et al., 1999; BOUXSEIN et al, 2001; DEN BOER et al., 2002), porém em casos clínicos humanos tem suscitado algumas dúvidas, como a interferência na farmacocinética da liberação do BMP e uma limitada resposta osteogênica (LIEBERMAN et al., 2002). No experimento, a função do mesmo foi como aglutinante e não como carreador. Nessa situação o colágeno tem efeito positivo, fato comprovado por ONO et al. (1995) que, ao utilizarem rhBMP, colágeno e carreador de hidroxiapatita abaixo do periósteo do crânio de coelhos, observaram melhor osteogênese do que quando utilizado somente rhBMP e carreador de hidroxiapatita.

JEPPSSON et al. (1999) sugeriram que um estímulo mecânico ou traumático faz-se necessário para as BMPs induzirem formação óssea e, segundo HULTH (1989), mesmo a concentração da BMP que ocorre naturalmente no exsudato de uma fratura, é dependente do tipo de lesão. Desta forma, os resultados obtidos no experimento podem ter sido influenciados pelo grau de estabilidade da fratura induzida.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado este trabalho e baseando-se nos resultados obtidos, conclui-se que:

- 1 Comparado ao controle, o conjunto de BMPs de origem bovina adsorvidas à hidroxiapatita promoveu melhor restabelecimento da cortical óssea na avaliação radiográfica somente aos 30 dias de pós-cirúrgico;
- 2 Pela análise histológica não ocorreram diferenças no processo de reparação da fratura entre os membros tratados e controles, porém o grupo tratado apresentou calo ósseo mais maduro aos 30 dias de pós-cirúrgico;
- 3 Não se observaram diferenças estatísticas na análise da densitometria óptica por imagens radiográficas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

BARNES, G.L.; KOSTENUK, P.J.; GERSTENFELD, L.C.; EINHORN, T.A. Growth factor regulation of fracture repair. *J. Bone Miner. Res.*, New York, v.14, n.11, p.1805-1815, 1999.

BAX, B.E.; WOZNEY, J.M.; ASHHURST, D.E. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calci. Tissue Int.*, New York, v.65, p.83-89, 1999.

BETTS, C.W. Malunion, delayed union, and nonunion. In: OLMSTEAD, M.L. *Small Animal Orthopedics*. St. Louis: Mosby, 1995. chap. 12, p.277-291.

BOLANDER, M.E. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Duluth, v. 200, p. 165-170, 1992.

BOSTROM, M.P.G.; LANE, J.M.; BERBERIAN, W.S.; MISSRI, A.A.E.; TOMIN, E.; WEILAND, A.; DOTY, S.B.; GLASER, D.; ROSEN, V.M. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J. Orthop. Res.*, New York, v.13, n.3, p.357-367, 1995.

BOSTROM, M.; LANE, J.M.; TOMIN, E.; BROWNE, M.; BERBERIAN, W.; TUREK, T.; SMITH, J.; WOZNEY, J.; SCHILDHAUER, T. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, n.327, p.272-282, 1996.

BOSTROM, M.; CAMACHO, N. Potential role of morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, v.355, supl., p.274-282, 1998.

BOUXSEIN, M.L.; TUREK, T.J.; BLAKE, C.A.; D'AUGUSTA, D.; STEVENS, M.; SEEHERMAN, H.J.; WOZNEY, J.M. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J. Bone Joint Surg. Am.*, Boston, v.83, n.8, p.1219-1230, 2001.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: informação e documentação - Referências - Elaboração*. Rio de Janeiro, 2000. 22p.
BIOSIS. *Serial sources for the BIOSIS preview database*. Philadelphia, 1996. 468p.

CHAMBERS, J.N. Developmental and congenital problems of the antebrachium and adjacent joints. In: BOJRAB, M.J.; SMEAK, D.D.; BLOOMBERG, M.S. *Disease mechanisms in small animal surgery*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. chap.117, p.834-840.

COCKLIN, J. Autologus bone grafting complications at the donor site. *J. Bone Joint Surg. Br.*, London, v. 53, p.153, 1971.

CORNELL, C.N.; LANE, J.M. Newest factors in fracture healing. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, n.277, p.297-311, 1992.

CRITCHLOW, M.A.; BLAND, Y.S.; ASHHURST, D.E. The effect of exogenous transforming growth factor- β 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone*, Tarrytown, v.16, n.5, p.521-527, 1995.

DEN BOER, F.C.; BRAMER, J.A.M.; BLOKHUIS, T.J.; VAN SOEST, E.J.; JENNER, J.M.G.T.; PATKA, P.; BAKKER, F.C.; BURGER, E.H.; HAARMAN, H.J.T.M. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on the healing of a freshly closed diaphyseal fracture. *Bone*, Tarrytown, v.31, n.1, p.158-164, 2002.

EINHORN, T.A. Enhancement of fracture-healing. *J. Bone Joint Surg. Am.*, Boston, v.77, n.6, p.940-956, 1995.

EINHORN, T.A.; LEE, C.A. Bone regeneration: new findings and potencial clinical applications. *J. Am. Academy Orthop. Surg.*, Rosemont, v.9, n.3, p.157-165, 2001.

FORELL, E.B.; STRAW, R.C. Bone morphogenetic proteins and bone derived growth factors. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, Stuttgart, n.6, p.166-171, 1993.

GROENEVELD, E.H.J.; BURGER, E.H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur. J. Endocrinol.*, Oslo, n.142, p.9-21, 2000.

GUERRA, P.C. *Utilização de perfurações na consolidação de fraturas do terço distal do rádio de cães: avaliação radiográfica, tomográfica e histológica*. 2002, 80p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

HECKMAN, J.D.; EHLE, W.; BROOKS, B.P.; AUFDEMORTE, T.B.; LOHMANN, C.H.; MORGAN, T.; BOYAN, B.D. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor- β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. *J. Bone Joint Surg. Am.*, Boston, v.81, p.1717-1729, 1999.

HUGHES, F.J.; COLLYER, J.; STANFIELD, M.; GOODMAN, S.A. The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells *in vitro*. *Endocrinology*, Baltimore, v.136, n.6, p.2671-2677, 1995.

HULTH, A. Current concepts of fracture healing. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, n.249, p. 265-284, 1989.

JEPPSSON, C.; BOSTRÖM, M.; ASPENBERG, P. Intraosseous BMP implants in rabbits. *Acta Orthop. Scand.*, Oslo, v.70, n.1, p.77-83, 1999.

JIN, Q-M.; TAKITA, H.; KOHGO, T.; ATSUMI, K.; ITOH, H.; KUBOKI, Y. Effects of geometry of hydroxyapatite as cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v.51, n.3, p.491-499, 2000.

JOHNSON, E.E.; URIST, M.R.; FINERMAN, G.A.M. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, n.230, p.257-265, 1988.

KATOH, T.; SATO, K.; KAWAMURA, M.; IWATA, H.; MIURA, T. Osteogenesis in sintered bone combined with bovine bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, n.287, p.266-275, 1993.

KIRKER-HEAD, C.A. Recombinant bone morphogenetic protein: novel substances for enhancing bone healing. *Vet. Surg.*, Philadelphia, v.24, p.408-419, 1995.

KUBOKI, Y.; TAKITA, H.; KOBAYASHI, D.; TSURUGA, E.; INOUE, M.; MURATA, M.; NAGAI, N.; DOHI, Y.; OHGUSHI, H. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.*, New York, v.39, n.2, p.190-199, 1998.

LEAL, A.C.R. *Determinação dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio em cães por meio da técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas: correlação entre o peso, sexo e idade*. 2002, 51p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LEE, F.Y-I.; STORER, S.; HAZAN, E.J.; GEBHARDT, M.C.; MANKIN, H.J. Repair of bone allograft fracture using bone morphogenetic protein-2. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, n.397, p. 119-126, 2002.

LIANJIA, Y.; YAN, J. Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. *Clin. Orthop.*, Philadelphia, n.257, p.249-256, 1990.

LIEBERMAN, J.R.; LE, L.Q.; WU, L.; FINERMAN, G.A.M.; BERK, A.; WITTE, O.N.; STEVENSON, S. Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. *J. Orthop. Res.*, New York, v.16, n.3, p.330-339, 1998.

LIEBERMAN, J.R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T.A. The role of growth factors in the repair of bone. *J. Bone. Joint Surg. Am*, Boston, v.84, n.6, p. 1032-1044, 2002.

LINKHART, T.A.; MOHAN, S.; BAYLINK, D.J. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF β and BMP. *Bone*, Tarrytown, v.19, n.1, p.1s-12s, 1996.

LOUZADA, M.J.Q.; PAULIN, J.B.P.; XAVIER, C.A.M.; VALERI, V. Microdensitometria em radiografias de perfurações ósseas. *Rev. Bras. Ortop.*, São Paulo, v.24, n.5, p.165-168, 1989.

LUNA, L.G. *Manual of histological staining methods of armed force institute of pathology*. Washington: Mc Graw, 1968, 258p.

NAKAGAWA, T.; SUGIYAMA, T.; KAMEI, T.; MURATA, T.; TAGAWA, T. An immuno-light and electron-microscopic study of the expression of bone morphogenetic protein-2 during the process of ectopic bone formation in the rat. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v.46, p.403-411, 2001.

NILSSON, O.S.; URIST, M.R.; DAWSON, E.G.; SCHMALZRIED, T.P.; FINERMAN, G.A.M. Bone repair induced by bone morphogenetic protein in ulnar defects in dogs. *J. Bone Joint Surg. Br.*, London, v.68, n.4, p.635-642, 1986.

ONISHI, T.; ISHIDOU, Y.; NAGAMINE, T.; YONE, K.; IMAMURA, T.; KATO, M.; SAMPATH, T.K.; DUKE, P.T.; SAKOU, T. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone*, Tarrytown, v.22, n.6, p.605-612, 1998.

ONO, I.; OHURA, T.; MURATA, M.; YAMAGUCHI, H.; OHNUMA, Y.; KUBOKI, Y. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. *Plast. Reconstr. Surg.*, Baltimore, v.9, n.5, p.870-879, 1992.

ONO, I.; GUNJI, H.; KANEKO, F.; SAITO, T.; KUBOKI, Y. Efficacy of hydroxyapatite ceramic as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein. *J. Craniofac. Surg.*, Boston, v.6, n.3, p.238-244, 1995.

REDDI, A.H. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications *J. Bone Joint Surg. Am.*, Boston, v.83, p.s1-s6, 2001.

RILEY, E.H.; LANE, J.M.; URIST, M.R.; LYONS, K.M.; LIEBERMAN, J.R. Bone morphogenetic protein-2. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, Philadelphia, n.324, p.39-46, 1996.

SAKOU, T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone*, Tarrytown, v.22, n.6, p.591-603, 1998.

SANDHU, H.S.; TOTH, J.M.; DIWAN, A.D.; SEIM, H.B.; KANIM, L.E.A.; KABO, J.M.; TURNER, A.S. Histologic evaluation of the efficacy of rhBMP-2 compared with autograft bone in sheep spinal anterior interbody fusion. *Spine*, Philadelphia, v.27, n.6, p.567-575, 2002.

SI, X.; JIN, Y.; YANG, L.; TIPOE, G.L.; WHITE, F.H. Expression of BMP-2 and TGF- β 1 mRNA during healing of the rabbit mandible. *Eur. J. Oral Sci.*, Cambridge, n.105, p.325-330, 1997.

TAKAGI, K.; URIST, M.R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein in repair of skull defects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Duluth, v.173, p.194-199, 1983.

VÖGELIN, E.; JONES, N.F.; LIEBERMAN, J.R.; BAKER, J.M.; TSINGOTJIDOU, A.S.; BREKKE, J.H. Prefabrication of bone by use of a vascularized periosteal flap and bone morphogenetic protein. *Plast. Reconstr. Surg.*, Baltimore, v.109, n.1, p.190-198, 2002.

WANG, E.A.; ROSEN, V.; D'ALESSANDRO, J.S.; BAUDY, M.; CORDES, P.; HARADA, T.; ISRAEL, D.I.; HEWICK, R.M.; KERNS, K.M.; LaPAN, P.; LUXEMBERG, D.P.; McQUAID, D.; MOUTSATSOS, I.K.; NOVE, J.; WOZNEY, J.M. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v.87, p.2220-2224, 1990.

WELCH, R.D.; JONES, A.L.; BUCHOLZ, R.W.; REINERT, C.M.; TJIA, J.S.; PIERCE, W.A.; WOZNEY, J.M.; LI, X.J. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J. Bone Miner. Res.*, New York, v.13, n.9, p. 1483-1490, 1998.

YASKO, A.W.; LANE, J.M.; FELLINGER, E.J.; ROSE, V.; WOZNEY, J.M.; WANG, E.A. The healing of segmental defects, induced by recombinant human morphogenetic protein (rhBMP-2). *J. Bone Joint Surg. Am.*, Boston, v.74, n.5, p.659-670, 1992.

ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO 1 - Certificado da Câmara de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 29/2003-CEEA).

 fmvz-unesp FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CAMPUS DE BOTUCATU <i>CÂMARA DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</i>	<i>Certificado</i>	Certificamos que o Protocolo nº 29/2003-CEEA, intitulado "Influência das proteínas morfogenéticas ósseas adsorvidas à Hidroxiapatita e aglutinantes do colágeno bovino na consolidação da fratura do rádio em coelhos", sob a responsabilidade do pós-graduando ALFREDO FEIO DA MAIA LIMA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 5 de maio de 2003.  Prof. Adj. Stélio Pacca Loureiro Luna Presidente da CEEA
---	--------------------	--

APÊNDICE

9 APÊNDICE

Tabela 4 – Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos raios direitos (tratados) aos 30 dias de pós-operatório.

Coelhos (n°)	Linha de osteotomia	Calo ósseo periosteal (cortical)	Ponte óssea	Restabelecimento cortical	Restabelecimento canal medular	Remodelamento calo ósseo
1	radiodensa	lateral e medial	lateral	ausente	ausente	ausente
2	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente
3	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	lateral e medial	ausente	ausente
4	ausente	lateral e medial	lateral e medial	lateral e medial	presente	ausente
5	ausente	lateral	lateral	lateral	ausente	ausente
6	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente
7	radiodensa	lateral e medial	lateral	ausente	ausente	ausente
8	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	ausente	ausente	ausente
9	radiodensa	lateral e medial	lateral	ausente	ausente	ausente
10	ausente	lateral e medial	lateral e medial	lateral	ausente	ausente
11	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente
12	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente
13	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente
14	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	lateral	ausente	ausente
15	radiodensa	lateral	lateral	lateral	ausente	ausente

Tabela 5 – Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos raios esquerdos (controles) aos 30 dias de pós-operatório.

Coelhos (nº)	Linha de osteotomia	Calo ósseo periosteal (cortical)	Ponte óssea	Restabelecimento cortical	Restabelecimento canal medular	Remodelamento calo ósseo
1	radiodensa	lateral e medial	lateral	ausente	ausente	ausente
2	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente
3	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	lateral	ausente	ausente
4	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	ausente	ausente	ausente
5	ausente	lateral	lateral	lateral	ausente	ausente
6	radiodensa	lateral e medial	lateral	ausente	ausente	ausente
7	ausente	lateral	lateral	lateral	ausente	presente
8	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	ausente	ausente	ausente
9	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente
10	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	ausente	ausente	ausente
11	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente
12	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	ausente	ausente	ausente
13	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente
14	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	ausente	ausente	ausente
15	radiodensa	lateral	lateral	ausente	ausente	ausente

Tabela 6 – Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos raios direitos (tratados) aos 60 dias de pós-operatório.

Coelhos (n°)	Linha de osteotomia	Calo ósseo periosteal (cortical)	Ponte óssea	Restabelecimento cortical	Restabelecimento canal medular	Remodelamento calo ósseo
6	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
7	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
8	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
9	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
10	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
11	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
12	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
13	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
14	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
15	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente

Tabela 7 – Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos raios esquerdos (controles) aos 60 dias de pós-operatório.

Coelhos (n°)	Linha de osteotomia	Calo ósseo periosteal (cortical)	Ponte óssea	Restabele- cimento cortical	Restabele- cimento canal medular	Remodela- mento calo ósseo
6	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
7	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
8	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	lateral e medial	ausente	presente
9	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
10	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
11	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
12	ausente	ausente	ausente	lateral	presente	presente
13	radiodensa	lateral e medial	lateral e medial	medial e lateral	ausente	presente
14	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
15	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente

Tabela 8 – Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos raios direitos (tratados) aos 90 dias de pós-operatório.

Coelhos (n°)	Linha de osteotomia	Calo ósseo periosteal (cortical)	Ponte óssea	Restabelecimento cortical	Restabelecimento canal medular	Remodelamento calo ósseo
11	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente
12	ausente	ausente	ausente	ausente	presente	presente
13	ausente	ausente	ausente	medial e lateral	presente	presente
14	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
15	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente

Tabela 9 – Análise radiográfica, em posição craniocaudal, da fratura induzida nos raios esquerdos (controles) aos 90 dias de pós-operatório.

Coelhos (n°)	Linha de osteotomia	Calo ósseo periosteal (cortical)	Ponte óssea	Restabelecimento cortical	Restabelecimento canal medular	Remodelamento calo ósseo
11	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
12	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
13	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
14	ausente	ausente	ausente	lateral e medial	presente	presente
15	ausente	lateral	lateral	lateral e medial	presente	presente

Tabela 10 – Valores densitométricos do foco de fratura dos membros direitos (tratados) e esquerdos (controles), no pós-operatório imediato e aos 30 dias de pós-operatório.

Coelhos (n°)	Pós-operatório imediato		30 dias de pós-operatório	
	Rádio direito	Rádio esquerdo	Rádio direito	Rádio esquerdo
1	3.4	1.15	4.12	1,38
2	1.36	0.98	2.65	2.03
3	0.95	0.84	4.24	1.49
4	0.94	0.96	2.30	1.90
5	2.72	3.44	1.78	1.89

Tabela 11 – Valores densitométricos do foco de fratura dos membros direitos (tratados) e esquerdos (controles), no pós-operatório imediato e aos 60 dias de pós-operatório.

Coelhos (n°)	Pós-operatório imediato		60 dias de pós-operatório	
	Rádio direito	Rádio esquerdo	Rádio direito	Rádio esquerdo
6	2.00	1.31	2.20	2.10
7	1.22	1.18	1.76	1.95
8	2.01	1.57	2.65	2.32
9	1.34	1.38	2.13	1.71
10	1.14	1.43	0.96	1.75

Tabela 12 – Valores densitométricos do foco de fratura dos membros direitos (tratados) e esquerdos (controles), no pós-operatório imediato e aos 90 dias de pós-operatório.

Coelhos (n°)	Pós-operatório imediato		90 dias de pós-operatório	
	Rádio direito	Rádio esquerdo	Rádio direito	Rádio esquerdo
11	1.98	1.31	1.98	1.52
12	1.96	1.33	2.46	1.64
13	2.00	1.30	2.48	2.05
14	1.98	1.31	2.48	2.36
15	0.99	1.34	0.83	0.99