

**UNIVERSIDADE JULIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA CAMPUS ARAÇATUBA**

**Expressão da proteína BMP-2 nos enxertos
ósseos autógenos: Análise histométrica e
imunoistoquímica em ratos.**

ARAÇATUBA

2011

Ana Caroline Sanches Garcia

**Expressão da proteína BMP-2 nos enxertos
ósseos autógenos: Análise histométrica e
imunoistoquímica em ratos.**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior

ARAÇATUBA

2011

DEDICATÓRIA

À Irene, minha mãe, por toda dedicação, amor e sacrifícios investidos em mim para que mais essa etapa fosse concluída em minha vida. Obrigada por ter permitido que esse sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucal Maxilo facial, em especial ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, pela orientação.

Ao Professor e amigo Marcos Heidi Guskuma, por todo apoio, atenção e paciência ao longo do trabalho.

Ao amigo Fabiano Heidi Guskuma, pelas tantas horas de laboratório.

Aos queridos, Gilmar e Cleide por todo o trabalho de processamento das lâminas e por repartirem seus conhecimentos.

"Eu quero conhecer os pensamentos de Deus; o resto são detalhes."

Albert Einstein

GARCIA A.C. S, **Expressão da proteína BMP-2 nos enxertos ósseos autógenos: Análise histométrica e imunoistoquímica em ratos. 2011. Trabalho conclusão de curso**, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Resumo

PROPOSIÇÃO: A proposição deste estudo foi avaliar, através da análise pela técnica da imunoistoquímica, o comportamento da expressão da proteína BMP-2 no osso autógeno enxertado em cavidades cirurgicamente criadas em calvária de ratos. **METODOLOGIA:** Dois defeitos ósseos foram realizados em calotas de dez ratos. Os defeitos ósseos criados foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo controle (preenchidos pelo próprio coágulo) e Grupo enxerto (preenchidos com osso autógeno em bloco removido do defeito contralateral). Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 7 e 30 dias. **RESULTADOS:** O enxerto autógeno em bloco puramente cortical não apresentou BMP-2 disponível; A presença da BMP-2, detectada pela imunoistoquímica, não foi crítica para a regeneração dos defeitos.

Palavras-chave: ENXERTO ÓSSEO, IMUNOISTOQUIMICA, BMP-2.

Garcia A.C.S., **BMP-2 expression in the autogenous bone graft: Histometric and Immunohistochemical analysis in rats.** Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Abstract

PROPOSITION: The purpose of this study was to evaluate, through analysis by immunohistochemistry, the expression of BMP-2 in the autogenous bone graft in surgically created cavities in rat calvaria. **MATERIALS AND METHODS:** Two bone defects were performed on each side of the rat calvaria in ten rats. Created bone defects were divided in two experimental groups: control (CT) (filled by the clot) and graft (GR) (filled with bone block removed from the contralateral defect). The animals were sacrificed at 7 and 30 days. **RESULTS:** The GR Group presented absence of positive markers for the BMP-2 at 7 days and very discrete immunostainings at 30 days. **CONCLUSION:** The autogenous bone block purely cortical showed no BMP-2 available, fact that was not critical to the defects regeneration. The biocompatibility and osteoconductive properties provided by the blocks were the critical factors.

Key-words: Bone transplantation. Bone morphogenetic protein-2. Immunohistochemistry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Intensidade das imunomarcações das proteínas estudadas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema do procedimento cirúrgico. Defeitos cirúrgicos localizados bilateralmente nos ossos parietais com os respectivos tratamentos recebidos nos Grupos experimentais.

Figura 2 Delimitação da AT (linha tracejada), respeitando os critérios estabelecidos através do Programa Imagelab 2000[®]. No interior da AT observa-se o osso neoformado (setas). HE (original 2,5x).

Figura 3 AON nos Grupos experimentais ($P < 0,05$) Teste de análise de variância e de Tukey *post hoc*.

Figura 4 Expressão da proteína BMP2 aos 7 dias nos 2 Grupos experimentais. (Original 160 X).

Figura 5 Expressão da proteína BMP2 aos 30 dias nos 2 Grupos experimentais. (Original 160 X)

Figura 6 (HE. Original 2,5 X) Análise histométrica dos defeitos do Grupo CONT aos 7 e 30 dias.

Figura 7 (HE. Original 2,5 X) Análise histométrica dos defeitos do Grupo ENX aos 7 e 30 dias.

LISTA DE ABREVIATURAS

BMP2 - Bone Morphogenetic Protein – 2

Grupo CONT – Grupo Controle

Grupo ENX – Grupo Enxerto

AT – área total

AON – área de osso neoformado

Sumário

1.INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	10
4. RESULTADOS	14
5 DISCUSSÃO.....	15
6 CONCLUSÃO	18
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

Introdução

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado, composto de 33% de matriz orgânica (principalmente colágeno tipo I) e 67% de matriz inorgânica (cristais de hidroxiapatita) (Whitson 1998). A formação, o desenvolvimento e a manutenção do tecido ósseo são processos complexos altamente regulados (Nijweide ET al. 1986). Proteínas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, estão ativamente envolvidos nestes processos e exercem atividade direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica (Ducy ET al. 2000).

A BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein - 2) é uma das proteínas envolvidas nesse processo que promove a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, aumentando a formação e o reparo ósseo (Gerhart ET al. 1993; Cook ET al. 1994; Ripamonti ET al. 1996; Reddi 1998; Wozney e Rosen 1998; Heckman ET al. 1999).

O osso autógeno é considerado o biomaterial padrão ouro para a reconstrução dos defeitos ósseos. As propriedades osteoindutoras e osteocondutoras, a biocompatibilidade e a segurança com relação à transmissão de doenças, são características que conferem um alto índice de sucesso a este biomaterial (Triplett e Schow 1996, Hirsch e Ericsson 1991, Lundgren ET al. 1996, Raghoobar ET al. 1993, Wood e Moore 1988).

A proposição deste estudo foi avaliar, através da análise pela técnica da imunohistoquímica, a expressão da BMP-2 no osso autógeno enxertado em cavidades cirurgicamente criadas em calvária de ratos.

Materiais e métodos

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Para o presente estudo foram utilizados 5 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), por período, com idade de 3 a 4 meses e peso corporal de 200 a 300 g. Para o procedimento cirúrgico, os animais receberam anestesia geral pela combinação de Ketamina e Xilazina, via intramuscular. Realizou-se uma incisão linear no sentido ântero-posterior em região mediana da calvária e o descolamento do dermoperiosteio. Dois defeitos ósseos de 5 mm de diâmetro e espessura total foram realizados com trefina em cada animal bilateralmente na região parietal.

Os defeitos ósseos criados foram divididos em dois grupos experimentais: (Fig. 1)

⇒ **Grupo CONTROLE** (CONT) (n=5)

– Os defeitos ósseos deste grupo foram preenchidos pelo próprio coágulo.

⇒ **Grupo ENXERTO** (ENX) (n=5)

– Os defeitos ósseos deste grupo foram preenchidos com osso autógeno em bloco removido do defeito contralateral.

Após o preenchimento dos defeitos, os tecidos foram reposicionados e suturados por planos, obtendo completa cobertura dos defeitos. Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 7 e 30 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico. As calotas foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10%

durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em seqüência de alcoóis e diafanizadas. As calotas foram cortadas ao meio no sentido longitudinal, separando os defeitos ósseos. Os defeitos foram cortados ao meio no sentido látero-lateral e as peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente. As peças receberam cortes de 6 µm de espessura e foram montadas em lâminas

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Para a análise imunoistoquímica, realizou-se a inibição da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, a recuperação antigênica com tampão citrato a 60 °C por 20 minutos, e o bloqueio das reações inespecíficas com leite desnatado e albumina bovina durante as incubações dos anticorpos.

Foram utilizados os anticorpos primários contra BMP2 (Santa Cruz Biotechnology), anticorpo secundário biotinilado (Pierce Biotechnology), o amplificador Streptavidina Biotina (Dako), e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno, que confere uma cor marrom-acastanhada às marcações. Ao término das reações, realizou-se a contra-coloração dos cortes com Hematoxilina de Harris. Foram realizados controles negativos (pela omissão dos anticorpos primários) para evitar a análise de falsos positivos.

Para a realização da análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento 160X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software). Três imagens foram obtidas de cada lâmina para análise: As duas bordas e o centro do defeito. Para efeito comparativo da intensidade das imunomarcações entre os grupos experimentais, foi criado um escore onde as

imunomarcações foram classificadas em uma escala de 5 graus, que variavam de ausentes a intensas (Tabela 1).

ANÁLISE HISTOMÉTRICA

As lâminas destinadas à análise quantitativa foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Para a realização da análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento de 2,5x acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager -IM50 Demo Software). Com o auxílio do programa ImageLab 2000, versão 2.4, foi calculada a extensão da área de formação óssea nos defeitos. Para tal, foram utilizados os seguintes critérios: (Fig. 2)

- Considerando que a Área Total (AT) do defeito na região analisada deve corresponder à área ocupada pelo osso da calvária na mesma região antes da confecção do defeito, a AT foi determinada da seguinte forma: Estabeleceu-se a altura do defeito, tendo como parâmetro a espessura do osso da calota nas bordas do defeito, e as bordas do defeito foram ligadas por duas linhas (superficial e profunda do defeito) separadas pela altura do defeito, seguindo a sua curvatura anatômica e delimitando a AT. O recurso “planilha de cálculos” do programa foi utilizado, obtendo o valor da AT em pixels. Os valores obtidos de cada lâmina foram somados e divididos de modo a obter uma média, que foi estabelecida como padrão para todos os defeitos, considerando que a espessura da calota era semelhante em todos os animais incluídos na amostra.

- As regiões correspondentes às áreas de osso neoformado (AON) foram delimitadas e as áreas calculadas separadamente em pixels. Para a obtenção do valor em porcentagem, consideramos a AT como 100% e usando uma regra de três, calculamos a porcentagem de AON para cada grupo. Foram obtidos 5 (cinco) valores de porcentagem para cada grupo e a média destes determinou o valor final de AON em cada período analisado. Os valores foram submetidos aos Testes de Análise de Variância (Anova) e de Tukey *post hoc* para verificação de significância nas diferenças entre os grupos.

- No Grupo ENX, o osso correspondente ao enxerto foi considerado como AON, já que aos 30 dias observou-se a incorporação do mesmo.

Resultados

7 dias

Neste período de observação, o Grupo CONT obteve 12,48% de AON (Fig. 3) e apresentou-se com marcações moderadas para a BMP-2 (Fig. 4A), igualmente espalhadas pelo defeito, observadas principalmente em osteoblastos. O Grupo ENX obteve 46,44% de AON (Fig. 3) e ausência de marcações positivas para a BMP-2 (Fig. 4B) em toda a extensão do defeito.

30 dias

Aos 30 dias, o Grupo ENX obteve 58,86% de AON (Fig. 3) e apresentou imunomarcações muito discretas para a BMP-2 (Fig. 5B). O Grupo CONT obteve 18,12% de AON (Fig. 3) e apresentou intensa expressão da proteína (Fig. 5A), representando as áreas de formação da matriz óssea.

Discussão

As BMPs foram originalmente identificadas por Urist (1965) como componentes orgânicos da matriz óssea capazes de induzir formação óssea ectópica. Pertencem à superfamília das TGF- β (Transforming Growth Factor beta) sintetizadas por osteoblastos (Gazzerro ET al. 1998; Pereira ET al. 2000) e compreendem o maior subgrupo com 15 genes (BMP-1 a BMP-15), críticos para a embriogênese e a formação óssea (Schmitt ET al. 1999; Yoon e Boden 2002). As BMP-2 são as mais estudadas entre as BMPs. Elas são encontradas nos osteoblastos, na matriz óssea e nos fibroblastos e agem ligando-se a receptores específicos da membrana das células mesenquimais indiferenciadas, ativando complexas reações intracelulares em cascata que culminam com uma sobre-regulação da expressão dos genes osteoblásticos (Nishimura ET al. 2002; Derynck e Zhang 2003) causando a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos (Yamaguchi ET al. 2000) e conseqüentemente a formação óssea (King e Cochran, 2002).

A aplicação da BMP-2 E BMP-7 tem sido relatada para estimular a cicatrização óssea em muitos casos clínicos.(Friedlaender et al. 2001; Govender et al. 2002; Hsu & Wang 2008; Rengachary 2002; Vaibhav et al. 2007). Uma limitação do uso de BMPs exógena em humanos comparada ao uso em animais, é que são necessárias doses maiores de BMPs acelerar a consolidação óssea Essas grandes doses são caras e podem desencadear o aparecimento de efeitos secundários desconhecidos, como a reabsorção óssea (Giannoudis et al. 2007; Okamoto et al. 2006) e ossificação heterotrópica (Axelrad et al. 2008; Wysocki & Cohen 2007).

Estudos (Haque et al 2008;.. Haque et al 2006;.. Lammens et al 2009) demonstraram a importância de BMPs endógenos na formação do osso durante a “distração osteogênica.”. Modelos geneticamente modificados que apresentam deficiência da Bmp-2 apresentam déficits na formação óssea.. No entanto, faltam dados sobre a expressão da proteína nos enxertos ósseos. Nesta pesquisa, os resultados histométricos parecem contraditórios com os resultados da imunoistoquímica. Apesar

da presença significativa da BMP-2 no Grupo CONT (Fig. 4A e 5A), não houve uma quantidade de osso formado suficiente para o fechamento dos defeitos (Fig. 3 e 6). No Grupo ENX, mesmo na ausência de BMP-2 aos 7 dias (Fig. 4B) e com a pouca quantidade aos 30 dias (Fig. 5B), houve fechamento total dos defeitos (Fig. 3 e 7). Para entender tal situação torna-se necessário analisar as bases da anatomia, fisiologia e bioquímica do tecido ósseo.

Os blocos de enxerto colocados nos defeitos são de característica puramente cortical e maduros, onde predominam osteócitos e matriz altamente mineralizada, o que pode explicar a ausência da BMP-2 disponível no interior do bloco de enxerto em ambos os períodos de observação (Fig. 4B e 5B). A presença da proteína foi detectada no Grupo ENX, ainda que de forma discreta, somente aos 30 dias (Fig. 5B) no interior dos canais de Havers e Volkmann do osso neoformado, com características de um processo adiantado de ossificação. Acredita-se que neste período a fase de ação da BMP-2 já tenha cessado e por isso a proteína apareceu discretamente. De acordo com Noël et al. (2004), um período de 6 dias foi necessário para formar o tecido ósseo em ratos, o que pode explicar a ausência da proteína aos 7 dias (Fig. 4B). Colaborando com esses achados, Alam et al (2007) demonstraram a expressão da BMP-2 nos enxertos ósseos autógenos em mandíbulas de coelhos, especialmente no tecido conjuntivo dos espaços entre o enxerto e o leito receptor e na medula óssea nos limites das regiões de osteogênese. Não podemos descartar a possibilidade de a presença do osso autógeno no interior do defeito ter, de alguma forma, alterado as sinalizações das reações em cascata do processo de formação óssea, culminando com uma diminuição na produção da proteína.

Saito ET al. (2000) informou que o perióstio tinha capacidade de osteoindução e que a melhor osteogênese ocorreu com o perióstio vascularizado. A principal fonte de BMP-2 em ambos os grupos foi aparentemente o perióstio da parte mais profunda do defeito. No Grupo ENX não foi observada neoformação óssea na parte superior do bloco possivelmente devido ao contato com o dermoperióstio (Fig. 7). Na base do bloco e nas bordas dos defeitos a camada de coágulo formada serviu como matriz para a chegada da BMP-2. No Grupo CONT a característica de neoformação óssea principalmente nas bordas dos defeitos (Fig. 6) induz afirmar que os estímulos

osseointutores provêm do osso daquelas regiões. No entanto, acreditamos que essa característica de neoformação óssea ocorre devido ao colapso do dermoperiosteio na parte profunda e central do defeito pela falta de uma estrutura osteocondutora, causando espaços para a formação de uma matriz de coágulo e produção de BMP-2 pelo periosteio somente nas bordas dos defeitos.

O processo de regeneração dos enxertos ósseos foi estudado e denominado por Burchardt (1983) de “creeping substitution”. De acordo com esse processo, o osso enxertado é incorporado ao defeito e progressivamente substituído por osso neoformado. No Grupo ENX, o contato direto e extenso do bloco enxertado com o osso neoformado (Fig. 5B e 7B) ilustra bem este processo de incorporação. Os blocos de osso autógeno estudados pareceram atuar como um biomaterial osteocondutor biocompatível com propriedades osseointutoras não significativas. Acreditamos que blocos de enxerto com características medulares possam obter resultados diferentes na análise imunohistoquímica, com maior presença de BMP2 principalmente nas regiões da medula óssea. Com os resultados deste trabalho podemos dizer que, para ser eficaz, um biomaterial deve ser biocompatível e osteocondutor. A propriedade osteointutora parece não ser crítica para estes biomateriais.

Conclusões

A metodologia empregada permite concluir que:

- A expressão da BMP-2 não pode ser considerada isoladamente na avaliação da regeneração dos defeitos ósseos, visto que a presença da proteína não resultou necessariamente no fechamento dos defeitos.
- O enxerto autógeno em bloco puramente cortical não apresentou BMP-2 disponível.
- O perióstio parece ser a fonte principal de BMP-2, nestes tipos de defeitos ósseos.
- A presença da BMP-2, detectada pela imunistoquímica, não foi crítica para a regeneração dos defeitos.
- A biocompatibilidade e a propriedade osteocondutora apresentadas pelos blocos de osso autógeno foram os fatores determinantes para a regeneração dos defeitos.

Lista de Tabela

Tabela 1 Intensidade das imunomarcações proteínas estudadas

ESCORES:

Ausente = + / Muito discreta = ++ / Discreta: = +++

Moderada = ++++ / Pouco intensa = +++++ / Intensa = ++++++

PROTEÍNA	GRUPO	7 DIAS	30 DIAS
BMP2	CONT	++++	+++++
	ENX	+	++

LISTA DE FIGURAS

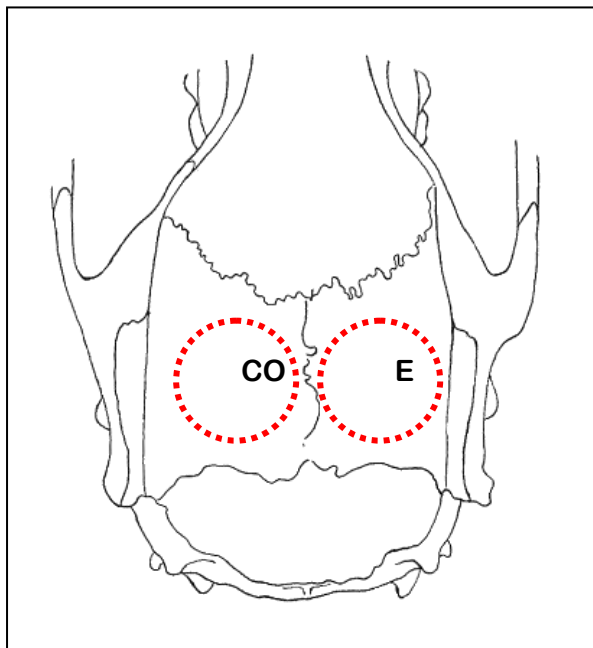


Fig 1: Esquema do procedimento cirúrgico. Defeitos cirúrgicos localizados bilateralmente nos ossos parietais com os respectivos tratamentos recebidos

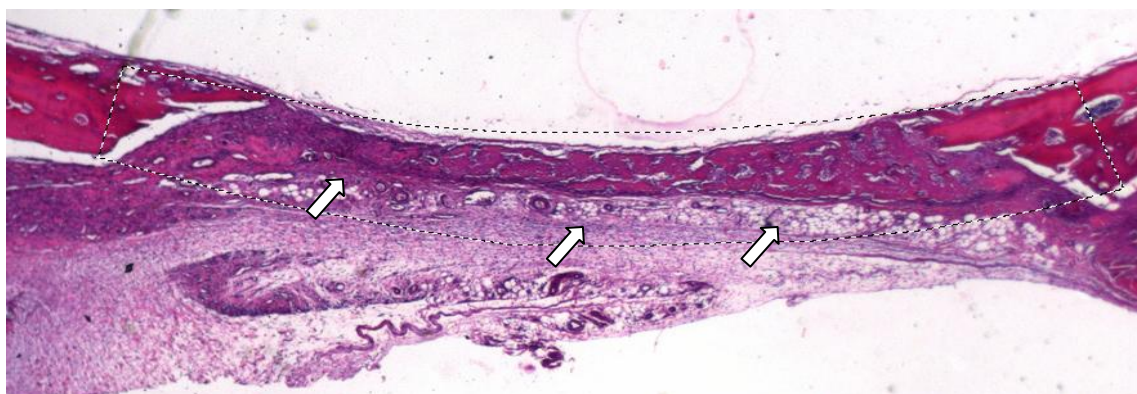
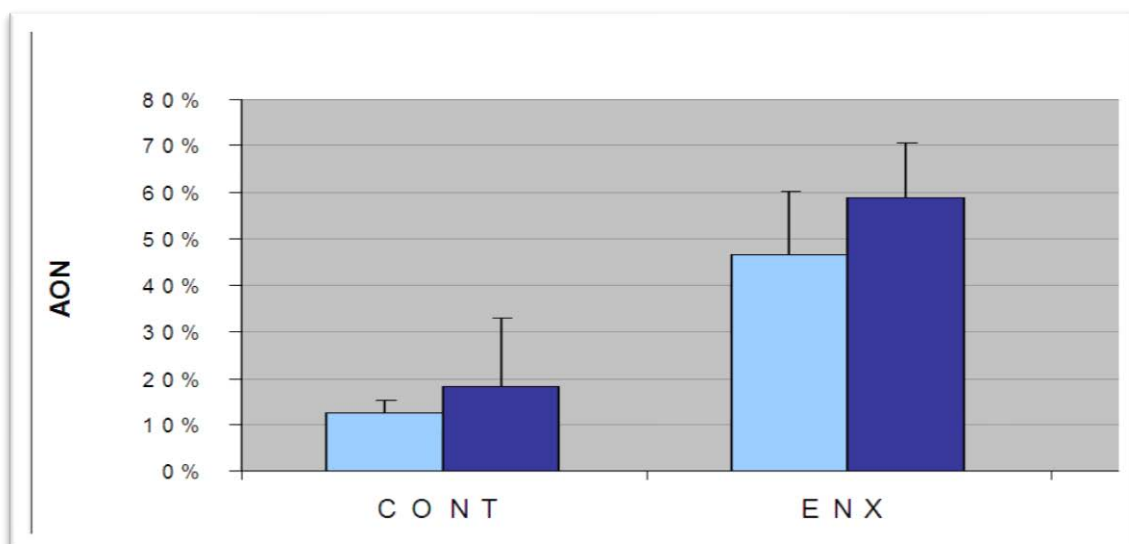


Fig 2: Delimitação da AT (linha tracejada), respeitando os critérios estabelecidos, através do Programa Imagelab 2000®. No interior da AT observa-se o osso neoformado (setas). HE (original 2,5x)



7 dias 30 dias

Fig 3: AON nos Grupos experimentais ($P < 0,05$) Teste de análise de variância e de Tukey *post hoc*.

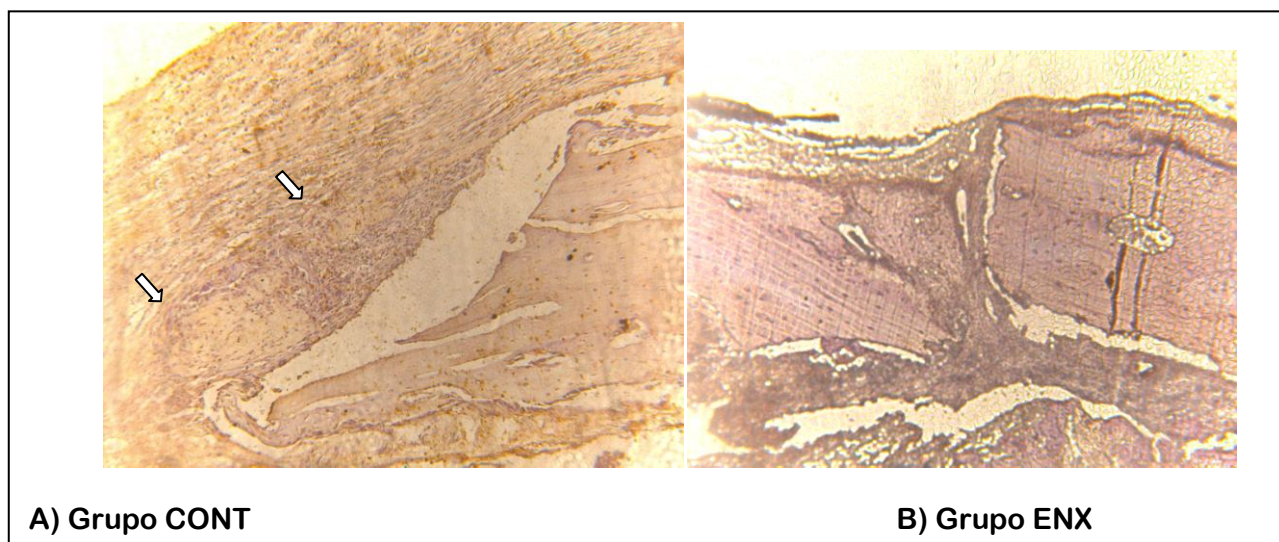


Fig 4 Expressão da proteína BMP2 aos 7 dias nos 2 Grupos experimentais.(Original 160 X)

- A) As discretas marcações em marrom refletem a pequena quantidade de osteoblastos e matriz osteóide neste período, em uma das bordas do defeito (setas claras)
- B) Ausência total de imunomarcações na interface do enxerto com uma das bordas do defeito.

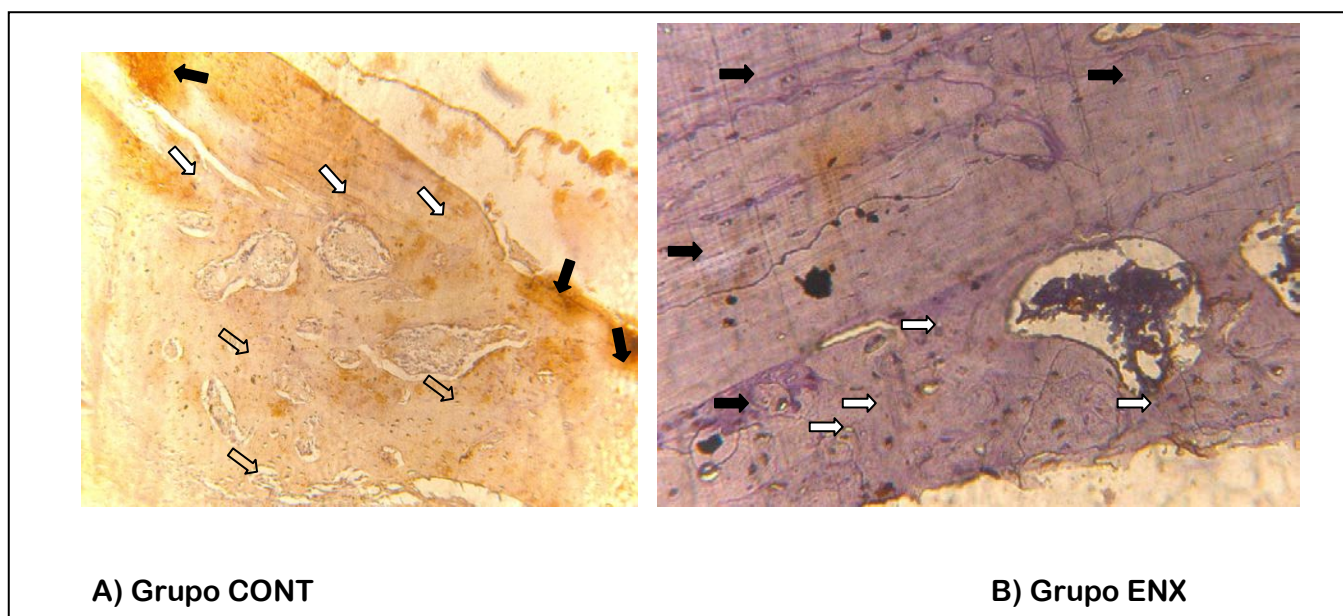
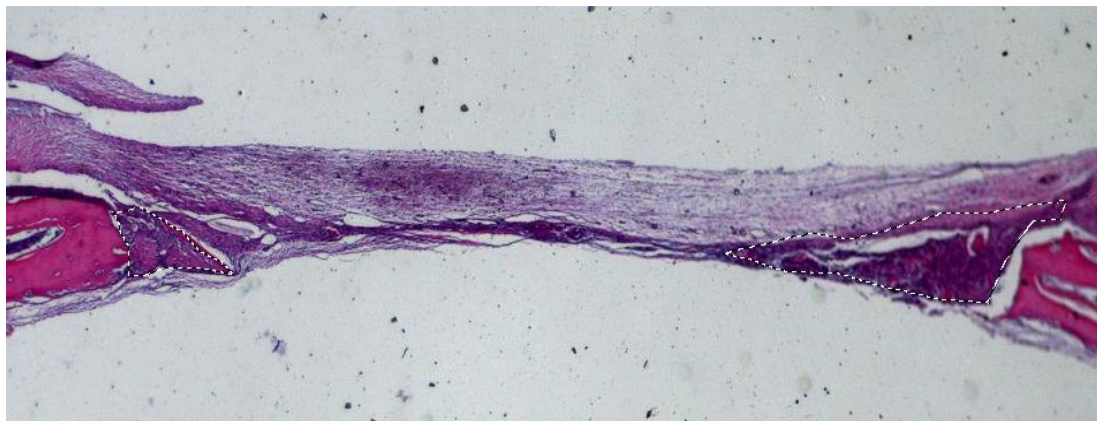


Fig 5 Expressão da proteína BMP2 aos 30 dias nos 2 Grupos

experimentais.(Original 160 X)A) As setas claras mostram o limite da borda do defeito. As setas escuras mostram as regiões de marrom mais escuro que são consideradas marcações inespecíficas. A grande área mais abaixo mostra a intensa marcação revelando a presença de osteoblastos e matriz osteóide (setas vazadas).

B) A região do centro do defeito neste grupo mostra a ausência de imunomarcações no bloco de enxerto (setas



A) Grup

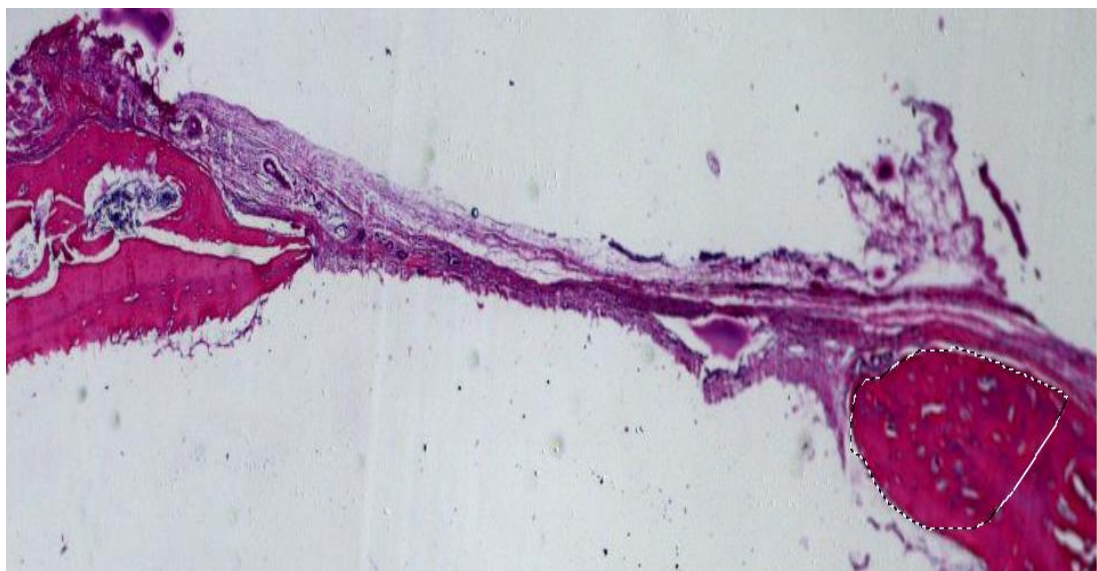
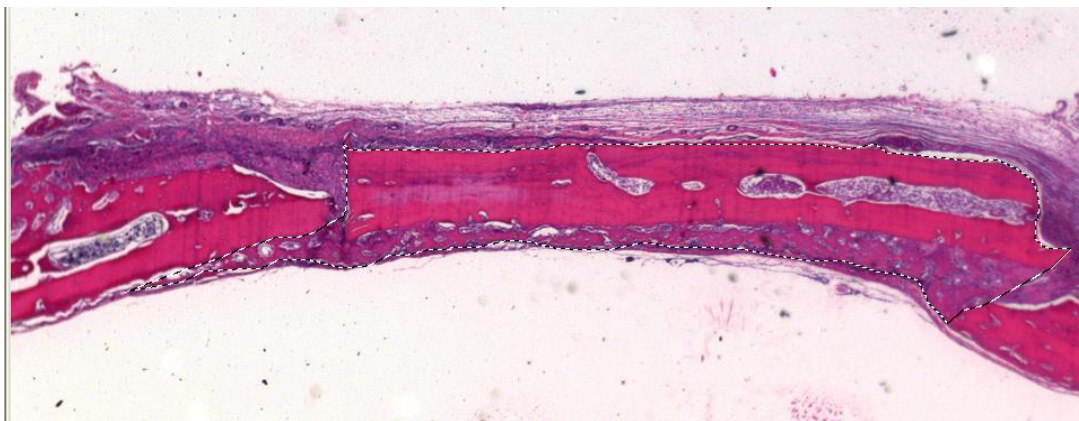
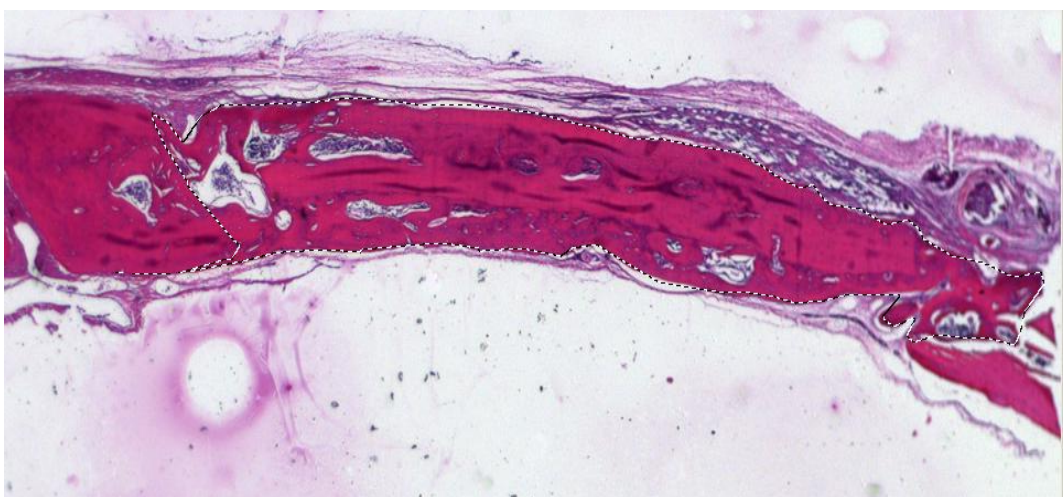


Fig 6 (HE. Original 2,5 X) Análise histométrica dos defeitos do Grupo CONT aos 7 e 30 dias. Observa-se a característica de neoformação óssea principalmente nas bordas do defeito em ambos os períodos (área tracejada).



A) Grupo ENX 7 dias



Grupo ENX 30 dias

Fig 7 (HE. Original 2,5 X) Análise histométrica dos defeitos do Grupo ENX aos 7 e 30 dias. Observa-se a incorporação do bloco e o fechamento total do defeito em ambos os períodos.

Referências Bibliográficas

1. Alam, S. et.al. Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as an onlay bone graft in rabbit mandibles (**Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2007;103:16-26)
2. Axelrad, T. et al. Heterotopic ossification after the use of commercially available recombinant human bone morphogenetic proteins in four patients. **J Bone Joint Surg Br.** 2008;90:1617–1622.
3. Burchardt , H. The biology of bone graft repair. **Clin Orthop Rel Res** 1983;174:28-42.
4. Cook, S.D. et al. The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. **J Bone Joint Surg Am** 1994;6A:827-838.
5. Dernck, R.; Zhang Y.E. Smad-dependent an Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature** 2003;425:577-584.
6. Ducy, P.; Schinke, T.; Karsenty, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science** 2000; 289:1501-1504.
7. Friedlaender, G. et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. **J Bone Joint Surg Am.** 2001;83:S151–S158.
8. Gazzero, E.; Gngi, V.; Canalis, E. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. **J Clin Invest** 1998;102:2106-2114.
9. Gerhart ,T.N. et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. **Clin Orthop** 1993;293:317-326.
10. Giannoudis, P.; Kanakaris, N.; Einhorn, T. Interaction of bone morphogenetic proteins with cells of the osteoclast lineage: review of the existing evidence. **Osteoporos Int.** 2007;18:1565–1581.

11. Govender, S. et al. BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma (BESTT) Study Group. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. **J Bone Joint Surg Am.** 2002;84:2123–2134.
12. Haque, T. et al. Characterizing the BMP pathway in a wild type mouse model of distraction osteogenesis. **Bone.** 2008;42:1144–1153.
13. Haque, T. et al. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein-signaling Smads during long-bone distraction osteogenesis. **J Histochem Cytochem.** 2006;54:407–415.
14. Heckman, J.D. et al. Bone morphogenetic protein but not transforming growth factor- β enhances bone formation in canine diaphyseal nonunions implanted with a biodegradable composite polymer. **J Bone J Surgery Am** 1999;81A:1717-1729.
15. Hirsch, J.M.; Ericsson, I. Maxillary sinus augmentation using mandibular bone grafts and simultaneous installation of implants. A surgical technique. **Clin Oral Implants Research** 1991; 2:91-96.
16. Hsu, W.; Wang, J. The use of bone morphogenetic protein in spinal fusion. **Spine J.** 2008;8:419–425.
17. King, G.N.; Cochran D.L. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. **J Periodontol** 2002;73:925-936.
18. Lammens, J.; Liu, Z.; Luyten, F. Bone morphogenetic protein signaling in the murine distraction osteogenesis model. **Acta Orthop Belg.** 2009;75:94–102.
19. Lundgren, S.; Moy, P.; Johansson, C.; Nilsson, H. Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: a histologic and histomorphometric study. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1996; 11:760-766.
20. Nijweide, P.J.; Burger, E.H.; Feyen, J.H.M. Cells of the bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. **Physiological Reviews** 1986;66: 855-886.

21. Nishimura, R.; Hata, K.; Harris, S.E.; Ikeda, F.; Yoneda, T. Core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. **Bone** 2002;31:303-312.
22. Noël, D. et al. Short-Term BMP-2 Expression Is Sufficient for In Vivo Osteochondral Differentiation of Mesenchymal Stem Cells **STEM CELLS** 2004;22:74-85.
23. Okamoto, M.; Murai, J.; Yoshikawa, H.; Tsumaki, N. Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. **J Bone Miner Res.** 2006;21:1022–1033.
24. Pereira, R.C.; Economides, A.N.; Canalis, E. Bone morphogenetic proteins induce gremlin, a protein that limits their activity in osteoblasts. **Endocrinology** 2000;141:4558-4563.
25. Raghoobar, G.M.; et al. Augmentation of the maxillary sinus floor with autogenous bone for the placement of endosseous implants: a preliminary report. **J Oral Maxillofac Surg.** 1993; 51:1198-1203.
26. Reddi, A.H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. **Nat Biotechnol** 1998;16:247-252.
27. Rengachary, S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. **Neurosurg Focus.** 2002;13:e2.
28. Ripamonti, U.; et al. Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7). **Growth Factors** 1996;13:273-289.
29. Saito, M.; et al. The role of beta-tricalcium phosphate in vascularized periosteum. **J Orthop Sci** 2000;5(3):275-82.
30. Schmitt, J.M.; et al. Bone morphogenetic proteins: an update on basic and clinical relevance. **J Orthop Res** 1999;17:269-278.
31. Triplett, R.G.; Schow, S.R. Autologous bone grafts and endosseous implants: Complementary techniques. **J Oral Maxillofac Surg** 1996; 54:486.
32. Urist, M.R. Bone formation by autoinduction. **Science** 1965;150:893-899.

33. Vaibhav, B.; et al.. Bone morphogenic protein and its application in trauma cases: A current concept update. **Injury**. 2007;38:1227–1235.
34. Whitson, S.W. Osso. In: Ten Cate AR Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função. Rio de Janeiro: **Ganabara Koogan** 1998, 5 ed., p. 101-122.
35. Wood, R.M.; Moore, D.L. Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1988; 3:209-214.
36. Wozney, J.M.; Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. **Clin Orthop** 1998;346:26-37.
37. Wysocki, R.; Cohen, M. Ectopic ossification of the triceps muscle after application of bone morphogenetic protein-7 to the distal humerus for recalcitrant nonunion: a case report. **J Hand Surg Am**. 2007;32:647–650.
38. Yamaguchi, A.; Komori, T.; Suda, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and cbfa1. **Endocr Rev** 2000;21:393-411.
39. Yoon, S.T.; Boden, S.D. Osteoinductive molecules in orthopedics: basic science and preclinical studies. **Clin Orthop** 2002; 395: 33-43.