

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (2004) 41: 416-422
ISSN printed: 1413-9596
ISSN on-line: 1678-4456

Aspectos radiográficos e densitométricos na consolidação de fraturas tratadas por proteínas morfogenéticas ósseas em rádio de coelhos

Radiographic and densitometric aspects of the fracture healing treated with bone morphogenetic proteins in rabbit radius

Alfredo Feio da Maia LIMA¹;
Sheila Canevese RAHAL¹;
Reinaldo dos Santos VOLPI²;
Maria Jaqueline MAMPRIM³;
Luiz Carlos VULCANO³;
Mariana do Amaral CORREIA¹

1- Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Botucatu - SP
2- Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina da Unesp, Botucatu - SP
3- Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, Botucatu - SP

Resumo

Avaliou-se, por meio de exames radiográficos e densitométricos, a influência de um biomaterial desenvolvido pela indústria brasileira, no processo de reparação de fraturas diafisárias instáveis do rádio. Foram utilizados 15 coelhos Norfolk, machos, idade entre cinco e seis meses e peso corpóreo médio de 3,5kg. Induziu-se fratura transversa na porção média da diáfise de ambos os rádios direito, por meio de serra giratória. Ao redor das extremidades fraturadas do rádio direito (tratado) aplicou-se BMPs adsorvidas à hidroxiapatita e aglutinante de colágeno em grânulos, ambos de origem bovina. O rádio esquerdo não recebeu tratamento, sendo considerado controle. Realizaram-se estudos radiográficos e de densitometria óptica por imagens radiográficas no pós-operatório imediato e aos 30, 60 e 90 dias de pós-operatório. Somente no 30º dia de pós-operatório ocorreu maior porcentagem de restabelecimento cortical na fratura tratada com biomaterial. Pela análise estatística não se verificou diferença nos exames densitométricos quer entre momentos ou entre membros. Foi possível concluir que apenas no exame radiográfico ao 30 dias de pós-operatório detectou-se efeito positivo do biomaterial.

Palavras-chave:

Coelhos.
Biomaterial.
Fratura.
BMP.

Correspondência para:

ALFREDO FEIO DA MAIA LIMA
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade Estadual Paulista
Distrito de Rubião Júnior, s/n
18618-000 – Botucatu – São Paulo
alflima@hotmail.com

Recebido para publicação: 17/06/2003
Aprovado para publicação: 17/09/2003

Introdução

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são fatores diferenciadores, cuja principal função é induzir a transformação das células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos e osteoblastos de forma dose-dependente.¹ Os potenciais usos clínicos dessas proteínas incluem a substituição de enxertos ósseos no tratamento de uniões retardadas, não-uniões, má-consolidações,

artrodeses e procedimentos ortopédicos reconstitutivos, entre outros.²

Já foram isoladas mais de 40 BMPs³; no entanto, elas não são idênticas em relação a capacidade osteoindutiva.² A BMP-2 recombinante humana (rh), a BMP-4, a BMP-5 e a BMP-7 (OP-1) possuem atividade osteogênica e condrogênica.³ 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 habilidade osteoindutora das BMPs já foi demonstrada em uma grande variedade de espécies, com diversos carreadores, incluindo colágeno e polímeros, em sítios heterotópicos e ortotópicos. Entre as funções do carreador estão o atraso a rápida dispersão da BMP do local do implante e proteção contra lises não específicas.¹ As propriedades geométricas de um carreador podem influenciar a performance da BMP.⁴ Partículas sólidas de hidroxiapatita e discos sólidos de polímero foram desfavoráveis para a indução óssea; porém, discos porosos e blocos de hidroxiapatita foram favoráveis.

Os efeitos da rhBMP-2, administradas em partículas bioerodíveis, colágeno gel, ou por injeção, foram investigados na consolidação de fraturas instáveis e estáveis de tíbias de coelhos.⁵ As partículas bioerodíveis preveniram a migração de células que produzem o calo e o colágeno gel foi reabsorvido rapidamente. Quando a rhBMP-2 foi injetada, o calo de fraturas mecanicamente instáveis desenvolveu-se mais rapidamente. Os autores concluíram 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.

Para avaliar a potencialidade da rhBMP-2 em acelerar a consolidação de fraturas, foram efetuadas osteotomias (0,5 a 1mm) bilaterais na porção medial da ulna de coelhos.⁶ 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. 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. Pelo exame histológico, verificaram padrões diferentes nas superfícies palmar e dorsal da

ulna, provavelmente associados ao acesso cirúrgico e colocação dos implantes. Os autores concluíram que os animais tratados com BMP apresentaram uma velocidade de cicatrização óssea 33% maior

O presente estudo teve como objetivo avaliar, por meio de exames radiográficos e densitométricos, a influência de um biomaterial desenvolvido pela indústria nacional, no processo de reparação de fraturas diafisárias instáveis do rádio.

Materiais e Métodos

O desenvolvimento deste trabalho teve aprovação da comissão de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp Botucatu.

Utilizaram-se 15 coelhos Norfolk, machos, idade entre cinco e seis meses, peso corpóreo médio de 3,5kg, divididos por sorteio e numerados de 1 a 15. Os animais foram alocados em gaiolas individuais 60x60x60cm, suspensas do solo, onde receberam água e ração comercial *ad libitum*.

A tranquilização foi com mistura de acepromazina [TORBUGESIC - Fort Dodge Ltda. - Rua Luiz Fernando Rodrigues, 1701 - Campinas, SP] (0,1mg/kg) e butorfanol [ACEPRAN 0,2% - Univet S. A. - Rua Clímaco Barbosa, 700 - São Paulo, SP] (0,1mg/kg), aplicada por via intravenosa. Após 15 minutos, realizou-se anestesia com a combinação de tiletamina-zolazepan (TELAZOL - Fort Dodge Ltda. - Rua Luiz Fernando Rodrigues, 1701 - Campinas, SP) na dose de 20mg/kg, por via intranasal.

Os coelhos foram posicionados em decúbito lateral esquerdo, com os dois membros torácicos, direito (tratado) e esquerdo (controle), já submetidos à tricotomia. Após anti-sepsia da área cirúrgica com álcool iodado, 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, protegendo-se a veia cefálica. A fásia

profunda foi incisada e os músculos extensor carporadial e flexor radial do carpo retraídos, bem como artéria e veia radiais, visualizando-se a diáfise do rádio. Induziu-se 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 periosteio 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 torácico direito submetido ao mesmo procedimento utilizado no membro esquerdo. Entretanto, o foco de fratura recebeu BMPs adsorvidas à hidroxiapatita (GEN-PRO - Baumer S.A. - Divisão Biomateriais - Av. Prof. Antonio Tavares Leite, 181 - Parque da Empresa, 13800-000 - Mogi Mirim, SP) e aglutinante de colágeno em grânulos (GEN-COL - Baumer S.A. - Divisão Biomateriais - Av. Prof. Antonio Tavares Leite, 181 - Parque da Empresa, 13800-000 - Mogi Mirim, SP), ambos de origem bovina. 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.

Foram administradas enrofloxacin (5mg/kg por via subcutânea), no momento da indução anestésica e 24 horas após o ato cirúrgico, e buprenorfina (0,02mg/kg por via subcutânea) a cada 12 horas, durante cinco dias. Efetuou-se limpeza diária das feridas com solução anti-séptica e os pontos cutâneos foram removidos no 10º dia de pós-operatório.

A avaliação clínica constou de observações quanto o aspecto da ferida cirúrgica e apoio do membro ao solo. Exames radiográficos foram realizados, 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 Macrotec. 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 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.

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 (software) [ATHENA - SAI - Sistema de Inteligência Avançada Com. Imp. Exp. Ltda - São José dos Campos, SP] desenvolvido para medir a densidade óptica em filmes de raios-X. A leitura foi realizada de acordo com recomendações de Leal.⁷ 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-Wallis e entre membros em cada momento pelo teste de Wilcoxon, ambos ao nível de 5% de significância.⁸

Resultados

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 sem complicações.

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 dos focos de fratura dos rádios direito e esquerdo, na posição craniocaudal, aos 30,

60 e 90 dias de pós-operatório, 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.

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.

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. Botucatu, 2003.

	30º dia pós-operatório (n=15)	60º dia pós-operatório (n=10)	90º 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. Botucatu, 2003.

	30º dia pós-operatório (n=15)	60º dia pós-operatório (n=10)	90º 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

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. Botucatu, 2003

Momentos	MEMBROS	
	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 ($p > 0,05$)

Discussão

Embora existam vários modelos de falhas ósseas críticas para o teste de biomateriais em animais^{9,10}, optou-se pelo modelo de cicatrização espontânea em fraturas instáveis, visto que clinicamente algumas fraturas são mais propensas à consolidação atrasada ou não-união e poderiam ser beneficiadas por um estímulo extra^{11,12}. Uma técnica semelhante foi utilizada⁶; 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.⁶ procederam eutanásias antecipadas de três coelhos em decorrência de fratura radial.

A avaliação radiográfica comparativa entre os membros foi realizada, em especial, pela imagem craniocaudal em decorrência da melhor visibilidade nesse posicionamento. 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 Hulth¹³, a produção de calo ósseo está associada ao grau de movimento das extremidades ósseas fraturadas, sendo esse ausente com método de fixação rígida.¹⁴

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). Em modelo de consolidação de fraturas em coelhos, Bax et al.⁵ verificaram que a rhBMP-2 acelerou a união cortical e a taxa de desenvolvimento do calo, mas não a quantidade de osso e cartilagem produzidos. Vale salientar que a predominância de calo periosteal na cortical lateral pode estar relacionada à ação do produto ou ao acesso cirúrgico. Da mesma forma, foi associada a abordagem cirúrgica e aplicação de esponja de colágeno absorvível contendo rhBMP-2, para justificar padrões histológicos diferentes nas superfícies palmar e dorsal da ulna, em modelo de osteotomias bilaterais da porção medial da ulna de coelhos.⁶

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 em discreta porcentagem mais evidentes, onde a BMP foi utilizada. 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, correspondendo ao estágio final da consolidação de fraturas.¹⁵

A densitometria óptica por imagens radiográficas permitiu avaliar quantitativamente a reparação óssea.^{16,17} 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.⁶ 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.

Em um contexto geral, o processo evolutivo foi semelhante entre os membros. Somente aos 30 dias o efeito da BMP foi mais evidente, porém sem a mesma potência citada por outros autores^{10,12,18}, o que requerer algumas considerações.

O estudo da produção óssea é mais facilmente avaliado em defeitos^{8,10} do que em modelos de fraturas com potencial para consolidação^{5,6}, como o adotado no experimento. Entre as BMPs que possuem atividade osteogênica e condrogênica estão a BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-

7^{3,9,18,19}; entretanto, a utilizada consistiu em um pool extraída de osso cortical bovino. Desta forma, não possui a pureza e especificidade das que são produzidas pela tecnologia recombinante.²

Como o carreador utilizado no experimento foi a hidroxiapatita adsorvida ao conjunto de BMPs na proporção de 1:20 (BMP-HA), ambos na forma de pó, pode ter ocorrido interferência negativa, desde que as propriedades geométricas de um carreador influenciam a performance da BMP.^{4,20} Partículas sólidas de hidroxiapatita inibem a formação óssea e as partículas porosas ou tabletes porosos a estimulam.²¹

Conclusões

Foi possível concluir que pela densitometria óptica radiográfica não há diferença entre os membros tratados ou não com biomaterial, somente pelo exame radiográfico ao 30 dias de pós-operatório, com maior porcentagem de restabelecimento cortical.

Agradecimentos

Baumer S.A. pelo fornecimento do biomaterial.

Abstract

The aim of this study was to evaluate by radiographic and densitometric examinations the influence of a biomaterial developed by the Brazilian industry in the reparation process of unstable diaphyseal fracture of the radius. Fifteen Norfolk rabbits, males, age between five and six months, and average body weight of 3.5 kg were used. A transversal fracture was induced in the middle portion of the radial diaphysis of both forelimbs using a circular saw. The association of BMPs adsorbed to the hydroxiapatite and agglutinant of collagen in granules, both of bovine origin, were used around the fracture extremities of the right radius (treated). The left radius did not receive any treatment, and it was considered as control. Radiographic evaluation and optic densitometry by radiographic examinations were realized at immediate postoperative, and at 30, 60 and 90 days postoperative. Only at 30 days postoperative occurred higher percentage of cortical reestablishment of the fracture treated with biomaterial. By statistical analysis was not observed any difference in densitometric examinations in the different evaluation moments or between forelimbs. It was possible to

Key-words:

Rabbits.
Biomaterial.
Fracture.
BMP.

conclude that only radiographic examination on day-30 postoperative was observed positive effect of the biomaterial.

Referências

1. KIRKER-HEAD, C. A. Recombinant bone morphogenetic protein: novel substances for enhancing bone healing. **Vet. Surg.**, v. 24, p. 408-419, 1995.
2. RILEY, E. H. et al. Bone morphogenetic protein-2. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, n. 324, p. 39-46, 1996.
3. SAKOU, T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. **Bone**, v. 22, n. 6, p. 591-603, 1998.
4. GROENEVELD, E. H. J.; BURGER, E. H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. **Eur. J. Endocrinol.**, n. 142, p. 9-21, 2000.
5. 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.**, v. 65, p. 83-89, 1999.
6. BOUXSEIN, M. L. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 83, n. 8, p. 1219-1230, 2001.
7. 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, 51 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
8. ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis.** New Jersey: Prentice Hall, 1996. 718 p.
9. YASKO, A. W. et al. The healing of segmental defects, induced by recombinant human morphogenetic protein (rhBMP-2). **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 74, n. 5, p. 659-670, 1992.
10. BOSTROM, M. et al. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. **Clin. Orthop.**, n. 327, p. 272-282, 1996.
11. BETTS, C. W. Malunion, delayed union, and nonunion. In: OLMSTEAD, M. L. **Small Animal Orthopedics.** St. Louis: Mosby, 1995. chap. 12, p. 277-291.
12. LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. **J. Bone. Joint Surg. Am.**, v. 84, n. 6, p. 1032-1044, 2002.
13. HULTH, A. Current concepts of fracture healing. **Clin. Orthop.**, n. 249, p. 265-284, 1989.
14. BARNES, G. L. et al. Growth factor regulation of fracture repair. **J. Bone Miner. Res.**, v. 14, n. 11, p. 1805-1815, 1999.
15. CORNELL, C. N.; LANE, J. M. Newest factors in fracture healing. **Clin. Orthop.**, n. 277, p. 297-311, 1992.
16. LOUZADA, M. J. Q. et al. Microdensitometria em radiografias de perfurações ósseas. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 24, n. 5, p. 165-168, 1989.
17. GUERRA, P. C. **Utilização de perfurações na consolidação de fraturas do terço distal do rádio de cães: avaliação radiográfica, tomográfica e histológica.** 2002, 80 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
18. LIEBERMAN, J. R. et al. Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. **J. Orthop. Res.**, v. 16, n. 3, p. 330-339, 1998.
19. HUGHES, F. J. et al. The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells *in vitro*. **Endocrinology**, v. 136, n. 6, p. 2671-2677, 1995.
20. JIN, Q-M. et al. Effects of geometry of hydroxyapatite as cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 51, n. 3, p. 491-499, 2000.
21. KUBOKI, Y. et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 39, n. 2, p. 190-199, 1998.
22. ONO, I. et al. Efficacy of hydroxyapatite ceramic as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein. **J. Craniofac. Surg.**, v. 6, n. 3, p. 238-244, 1995.