

Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos

[*Mixture of bone morphogenetic protein, hydroxyapatite, inorganic bone and collagen interposed by pericardium barrier membrane in the filling of the segmental bone defect in rabbits*]

R.B. Ciani¹, S.C. Rahal^{1*}, R.S. Volpi², R. Taga³, J.M. Granjeiro³, T.M. Cestari³, M.J. Mamprim¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP
Rubião Júnior s/n

18618-000 - Botucatu, SP

²Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

³Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

RESUMO

Avaliou-se o uso de biomaterial de origem bovina na regeneração de defeitos ósseos segmentares empregando-se 12 coelhos, fêmeas, da raça Norfolk, com idade de seis meses e pesos entre 3 e 4,5kg. Realizou-se falha segmentar bilateral de um centímetro de comprimento na diáfise do rádio, com inclusão do periosteio. No membro direito, o defeito foi delimitado por membrana de pericárdio liofilizada, contendo em seu interior mistura de proteínas morfogenéticas ósseas adsorvidas a hidroxiapatita, colágeno liofilizado e osso inorgânico. No membro esquerdo, o defeito não recebeu tratamento. Radiografias foram obtidas ao término do procedimento cirúrgico e aos sete, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de pós-operatório. Após eutanásia de seis coelhos aos 60 dias e seis aos 150 dias de pós-cirúrgico, os resultados radiográficos e histológicos mostraram que a regeneração óssea foi inibida nos defeitos segmentares tratados com o biomaterial.

Palavras-chave: biomaterial, membrana de barreira, defeito segmentar, coelho, xenoenxerto

ABSTRACT

Biomaterials of bovine origin in regenerating segmental bone defects were evaluated. Twelve six-month old Norfolk rabbits, weighting 3 to 4.5kg were used. A 1cm long segmental defect was created in the radial diaphysis, including the periosteum, of both forelimbs. In the right forelimb, the defect was filled using a mixture of bone morphogenic proteins adsorbed to hydroxyapatite, agglutinant of lyophilized collagen in granules and anorganic cortical bone in granules delimited by a pericardial membrane. In the left forelimb, the defect did not receive treatment and served as a control. Radiographies were taken immediately after surgery and at seven, 30, 60, 90, 120 and 150 days post-operatively. Six rabbits were euthanized at 60 days and the other six at 150 days post-surgery for histological evaluation. Radiographic and histological results revealed that bone regeneration was inhibited in the segmental defects receiving biomaterials.

Keywords: rabbit, biomaterial, barrier membrane, segmental defect, xenograft

Recebido em 30 de janeiro de 2004

Aceito em 20 de julho de 2005

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: sheilacr@fmvz.unesp.br

INTRODUÇÃO

O osso, quando lesado, tem a capacidade de regenerar e retornar à estrutura tecidual original, sem a formação de tecido cicatricial (Hollinger et al., 1997; Remedios, 1999). Apesar desse potencial, a regeneração necessita de auxílio em várias ocasiões, como nas uniões retardadas, nas não-uniões, em fraturas múltiplas ou cominutivas, nas osteotomias, artrodeses e no preenchimento de cavidades ou defeitos segmentares extensos (Cook e Rueger, 1996).

Para manter ou auxiliar a capacidade regenerativa inerente, de forma relativamente inalterada, utilizam-se substitutos ósseos (Hollinger et al., 1997) osteoindutores e osteocondutores. Uma das vantagens desses substitutos ósseos é não produzir trauma adicional ao paciente, o que ocorre na coleta de enxerto autógeno. O material osteoindutor estimula as células indiferenciadas da ferida a converterem-se fenotipicamente em células osteoprogenitoras, os osteoblastos, responsáveis pela neoformação óssea (Keating e McQueen, 2001). Os osteocondutores não têm capacidade de induzir a citodiferenciação de osteoblastos, mas preenchem a falha, orientando as novas células originadas por proliferação de células osteoprogenitoras das bordas do defeito a promoverem a neoformação de tecido ósseo (Cook e Rueger, 1996; Keating e McQueen, 2001). O estudo de material osteoindutor iniciou-se com os experimentos de Marshall R. Urist na década de 60. Em 1965, foi publicado seu primeiro trabalho subsidiando a teoria da indução óssea (Urist, 1965).

Visto que os estudos experimentais que utilizaram produtos xenogênicos desenvolvidos pela indústria nacional são ainda limitados, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de biomaterial de origem bovina promover a regeneração de defeitos ósseos segmentares induzidos no rádio de coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 12 coelhos*, fêmeas, da raça Norfolk, com idade de seis meses e peso entre 3 e 4,5kg, numerados e alojados em gaiolas

individuais 60×60×60cm, suspensas do solo, com água e ração comercial à vontade.

Para a realização das cirurgias, a tranquilização dos coelhos foi feita com associação de acepromazina (0,5mg/kg/IM) e buprenorfina (0,02mg/kg/IM) seguida, após 15 minutos, de anestesia com a associação de tiletamina-zolazepan (20mg/kg/IM).

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, com os membros torácicos direito (tratado) e esquerdo (controle) preparados para a cirurgia asséptica. Inicialmente a pele foi incisada na porção craniomedial do antebraço esquerdo da porção proximal da diáfise do rádio até a altura da veia cefálica. Os músculos foram afastados, e foi criado defeito segmentar de 1cm na diáfise do rádio, com inclusão do periosteio, 4cm a partir da articulação rádio-cárpica. As fâscias, o tecido subcutâneo e a pele foram suturados com fio de náilon 4-0. No membro direito, o acesso cirúrgico e a indução do defeito segmentar foram feitos da mesma forma que no membro esquerdo. A membrana interóssea foi liberada 3mm proximal e distal a partir das extremidades do defeito. Nesses espaços, encaixou-se a membrana biológica de pericárdio bovino liofilizada¹, nas dimensões de 2cm de largura por 2cm de comprimento, previamente hidratada com solução fisiológica. Os biomateriais – proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) adsorvidas à hidroxiapatita², aglutinante de colágeno liofilizado em grânulos³ e osso inorgânico macrogranular⁴ - foram homogeneizados e hidratados com sangue. O defeito ósseo criado e delimitado pela membrana de pericárdio foi preenchido com essa mistura. As extremidades livres da membrana foram sobrepostas e suturadas ao periosteio com fio de náilon 6-0 em pontos simples isolados.

No período de tranquilização e quatro dias após a cirurgia, foram aplicados, via subcutânea, enrofloxacina (5mg/kg) e flunixinina meglumina (1mg/kg) a cada 24 horas, e buprenorfina (0,02mg/kg) a cada 12 horas. Os pontos cutâneos foram removidos no 10º dia de pós-operatório.

¹Membrana de pericárdio bovino - Faculdade de Odontologia – USP, Departamento de Bioquímica - Bauru, SP.

^{2, 3, 4} GEN-PRO, GEN-COL E GEN-OX, respectivamente. Baumer SA - Divisão Biomateriais - Av. Prof. Antonio Tavares Leite, 181 - Parque da Empresa, 13800-000 - Mogi Mirim, SP.

*Trabalho aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

A avaliação clínica constou de observações quanto ao aspecto da ferida cirúrgica e apoio do membro ao solo. Os antebraços direito e esquerdo foram radiografados, em posições craniocaudal e mediolateral, aos sete, 30 e 60 dias de pós-operatório nos animais de número 1 a 6, e aos sete, 30, 60, 90, 120 e 150 dias nos de número 7 a 12. Avaliaram-se o defeito ósseo quanto ao desvio ou não das extremidades ósseas seccionadas, o início e a localização da formação óssea, a presença ou absorção do biomaterial e a ponte óssea que unia os fragmentos.

Após a eutanásia de seis coelhos aos 60 dias e seis aos 150 dias do pós-cirúrgico, fez-se a análise histológica. Segmentos ósseos colhidos do rádio e ulna direito e esquerdo foram fixados em formol a 10% em tampão fosfato pH 7 durante uma semana e desmineralizados em solução de Morse, por três meses, com controle radiográfico. Após a total desmineralização, as peças foram incluídas em parafina mais resina sintética, segundo rotina do laboratório de histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP. Cortes longitudinais com 5µm de espessura corados pela hematoxilina-eosina foram usados nas avaliações.

RESULTADOS

A partir do retorno anestésico, observou-se apoio dos membros torácicos ao solo, porém a movimentação foi mais evidente após 48 horas. As feridas cirúrgicas cicatrizaram adequadamente.

Pelo exame radiográfico dos membros-controle, observou-se que o eixo ósseo manteve-se sem alterações nos diferentes momentos de observação em todos os animais. Detectou-se, aos 30 dias de pós-operatório, início de formação óssea em forma de cone a partir das extremidades proximal e/ou distal e do periosteio da face ulnar. Aos 60 dias (Fig. 1A), notou-se ponte óssea unindo as extremidades ósseas seccionadas em quatro animais; entretanto, o osso neoformado apresentava baixa radiopacidade e ocupava em torno de 80% da falha, com maior preenchimento na face ulnar. Nos demais, havia formação óssea, porém com lacuna radiolúcida central. Nos seis animais avaliados aos 90, 120 e 150 dias de pós-operatório, verificou-se em quatro início de remodelação do osso neoformado, que se apresentava com o mesmo volume observado aos 60 dias de pós-operatório, mas com radiodensidade inferior ao do osso contíguo. Em dois coelhos não

ocorreu formação de ponte óssea, havendo presença de linha radiolúcida.

Nos membros tratados foi detectado, aos sete dias de pós-operatório, desvio cranial do eixo ósseo em apenas um animal. Com 30 dias, notou-se radiolúcida entre o produto e as margens do defeito em 10 animais. Não houve formação óssea em nenhuma falha, apenas esclerose de bordas e reação periosteal ao redor das extremidades seccionadas. Ocorreu redução da área ocupada pelo biomaterial, em especial na porção cranial da lacuna. Aos 60 dias de pós-operatório (Fig. 2A), havia nítido limite do defeito, com pequeno crescimento ósseo na borda proximal apenas em dois coelhos. O espaço do defeito apresentava-se preenchido por área de radiopacidade com padrão granular formando massa única ou duas a três massas menores separadas por faixas radiolúcidas. Nos seis animais avaliados aos 90 e 120 dias de pós-cirúrgico, o aspecto foi semelhante aos de 60 dias, com o produto mantendo-se em sua maioria radiopaco no centro e radiotransparente nas bordas. Aos 150 dias de pós-operatório, notou-se início de formação óssea da borda proximal em um coelho e das bordas proximal e distal em outro. Entre os cones, notou-se presença de área menos radiopaca exibindo padrão granular. Nos demais animais, não foi detectada formação óssea pelas extremidades seccionadas, estando o espaço do defeito preenchido por material radiopaco, em geral, mais radiodenso na metade externa e menos denso na metade interna voltada para a ulna.

O quadro histológico dos membros-controle aos 60 dias (Fig. 1B) de pós-operatório foi similar para todos os animais. Ocorreu intensa neoformação óssea a partir das bordas proximal e distal do defeito. O cone de crescimento era predominantemente constituído por fina cortical óssea em remodelação, algumas trabéculas ósseas internas e significativa quantidade de medula óssea vermelha; eventualmente a cortical encontrava-se mais estruturada e espessa. Aos 150 dias de pós-operatório, detectou-se em quatro defeitos crescimento ósseo nas bordas proximal e distal, com predominância da proximal, mas sem ocorrência de fusão. Nos demais havia fusão na região central do defeito, com presença de massa irregular e compacta de osso voltada para a ulna, às vezes fusionada à mesma, e um osso predominantemente entrelaçado na sua metade externa, constituído de osso primário.



Figura 1. Imagem radiográfica em posição lateral (a) e corte histológico longitudinal (b) de defeito controle 150 dias pós-cirurgia (animal 12). Observe em (a) região central com menor radiopacidade (seta). Note em (b) formação de tecido ósseo irregular (setas largas) a partir da borda do defeito (cabeça de seta). Houve fusão dos dois crescimentos ósseos na região central do defeito com osso predominantemente entrelaçado na sua metade externa, constituído de osso primário (seta).

Nos membros tratados aos 60 dias de pós-operatório (Fig. 2B), a análise dos cortes histológicos evidenciou pequena formação de tecido ósseo nas bordas proximal e distal dos defeitos, que, às vezes, estava associada a áreas de reabsorção. Esse osso neoformado exibia, ainda, o padrão entrelaçado ou trabecular em remodelação. Os espaços dos defeitos estavam preenchidos pelas partículas do biomaterial, formando dois a três conjuntos menores, cada um envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denso e exibindo no seu interior o mesmo tecido ao redor de cada partícula, ou formando conjunto único maior envolto por cápsula fibrosa associado ou não à intensa reação inflamatória. Nos casos de formação de massa maior de partículas de biomaterial, devido ao tamanho e à presença de cápsula, observou-se seu desprendimento total ou parcial dos defeitos durante a coleta e/ou o processamento histológico. Na superfície da ulna relacionada com o defeito, era visível a remodelação óssea, com neoformação de tecido ósseo em excesso. Em nenhum membro foi observada a presença da membrana. No entanto, foi possível observar a presença de pequenos corpos altamente basófilos no local onde ela estava situada, sugerindo serem fragmentos de membrana em processo final de reabsorção. O exame histológico aos 150 dias de pós-operatório mostrou crescimento ósseo na extremidade proximal, constituído por mistura irregular de tecido ósseo compacto, trabecular e medula óssea, e sem um espaço medular bem definido próximo a cortical da ulna. Essa massa irregular de tecido ósseo da borda proximal estava fusionada a um menor crescimento da borda distal, constituído por finas corticais ósseas delimitando espaços medulares preenchidos por tecido mielóide. Na zona de fusão óssea, havia presença de uma concavidade rasa, exibindo grânulos de biomaterial envolto conjuntamente e individualmente por tecido conjuntivo fibroso. As partículas de biomaterial em reabsorção estavam envoltas por células mononucleadas e raras células gigantes multinucleadas. Quando uma quantidade maior de partículas permaneceu no interior do defeito, esta foi seqüestrada e isolada por cápsula fibrosa, impedindo o crescimento ósseo no local. Devido à permanência do biomaterial no espaço do defeito, o crescimento ósseo ficou restrito às bordas, especialmente na proximal ou entre o biomaterial e a superfície da cortical da ulna.

DISCUSSÃO

Exceto a membrana de pericárdio, os biomateriais utilizados no preenchimento da falha óssea estão comercialmente disponíveis desde 1992, sendo

indicados pelo fabricante como uma alternativa para o enxerto ósseo autólogo (Genius, 2001). Dessa forma, a ausência de formação óssea nos defeitos tratados necessita de discussão criteriosa de cada um dos componentes utilizados.

Empregou-se a membrana como barreira biológica nos membros tratados por ser um novo conceito no reparo de falhas segmentares (Zellin e Lind, 1997; Teixeira e Urist, 1998). A eficácia do uso de membrana está relacionada à capacidade de atuação como barreira física, prevenindo a invasão do espaço do defeito por tecido mole circunjacente (Lekovic et al., 2001). Em geral, as membranas de colágeno durante o preparo necessitam de tratamento por agente que promova o aparecimento de ligações cruzadas entre o colágeno, aumentando a resistência à degradação enzimática (Cirelli et al., 1997; Maizato et al., 2003). A membrana usada no experimento foi liofilizada e esterilizada com raio gama, contudo não houve tratamento para a produção de ligações cruzadas. Embora esses agentes sejam muitas vezes citotóxicos (Maizato et al., 2003), a não utilização pode favorecer a rápida reabsorção do material, como notado por James et al. (1991), ao utilizarem o pericárdio bovino sem ligação cruzada no reparo da parede abdominal de coelhos.

Apesar de não estar definido o tempo adequado e necessário de permanência de uma membrana para promoção da regeneração óssea guiada em falhas ósseas segmentares, a partir da análise radiográfica do membro-controle, acredita-se que no modelo utilizado não deva ser inferior a 30 dias, período em que foi observado no controle, início de formação óssea em forma de cone a partir das extremidades seccionadas. É preciso lembrar que, aos 60 dias de pós-operatório no membro tratado de alguns animais, havia presença de pequenos corpos altamente basófilos, sugerindo fragmentos de membrana em processo final de reabsorção. Outros experimentos usando a mesma membrana mostraram um padrão de reabsorção gradativa, já verificada com sete dias de pós-operatório, sendo máxima aos 30 e finalizando aos 60 dias (Gasque et al., 2002). Um fato a se considerar é que, embora o tipo de membrana utilizado possa não ter contribuído para a formação óssea, ela isoladamente não seria suficiente para promover inibição da regeneração óssea, detectada inicialmente por radiolucência entre o produto e a margem do defeito, esclerose de borda e reação periosteal ao redor das extremidades seccionadas, no exame radiográfico aos 30 dias de pós-operatório.



Figura 2. Imagem radiográfica em posição lateral (a) e corte histológico longitudinal (b) de defeito tratado com biomateriais e recoberto com membrana de pericárdio aos 150 dias de pós-operatório (animal nº11). Em (a) observe áreas radiodensas na borda do defeito (seta) e na superfície da face ulnar (seta). Em (b) observe formação de tecido ósseo (setas largas) na região da cortical voltada para a ulna e inúmeras partículas de matriz (asterisco) envoltas por tecido conjuntivo (seta).

Entre os biomateriais aplicados no preenchimento do defeito, estavam o *pool* de BMPs associadas à hidroxiapatita (carreador), o osso cortical inorgânico em grânulos e o aglutinante de colágeno liofilizado em grânulos, todos de origem bovina, uma vez que a Constituição Brasileira proíbe a comercialização de material de procedência humana (Taga e Mulatinho, 1998).

As BMPs produzidas pela técnica da recombinação genética são específicas e altamente puras (Riley et al., 1996) em relação à utilizada no experimento, que se trata de um *pool* extraído a partir do osso bovino (Taga e Mulatinho, 1998). Esse fato pode influenciar no estímulo da formação óssea, pois sabe-se que algumas BMPs são mais osteogênicas do que outras e que diferentes combinações podem ser necessárias, de acordo com o local anatômico e o tipo de defeito a ser tratado (Cook e Rueger, 1996; Riley et al., 1996; Lane, 2001). Além disso, como o volume e a taxa de formação óssea são dependentes da quantidade e do tipo de BMP aplicada (Cook e Rueger, 1996; Zegzula et al., 1997), o *pool* de BMPs utilizado no experimento pode apresentar diferenças qualitativas.

Esse mesmo *pool* de BMPs já foi testado em alguns experimentos, com resultados variáveis. Lima (2002), ao utilizá-lo adsorvido à hidroxiapatita e ao aglutinante de colágeno em fraturas induzidas no rádio de coelhos, observou efeito positivo na maturação do calo somente aos 30 dias de pós-operatório. Costa e Filho et al. (2001), ao empregarem os mesmos componentes citados, mais o osso bovino inorgânico em cilindros de titânio implantados na tíbia de coelhos, obtiveram menor formação óssea comparado aos cilindros preenchidos com osso bovino inorgânico e hidroxiapatita. Apesar de esses últimos autores terem atribuído o efeito inibitório ao *pool*, deve-se levar em consideração que, ainda assim, houve produção óssea, diferente do ocorrido no atual experimento.

Diversos estudos experimentais salientaram a importância do uso de um carreador com a finalidade de reter a BMP por tempo suficiente para a indução óssea e de protegê-la contra lises não específicas (Lind, 1998). Existem diferentes tipos de carreadores, com diferentes tipos de resposta (Zegzula et al., 1997; Suh et al., 2002), sendo ainda necessário esclarecer problemas

como combinação, biodisponibilidade, difusibilidade e espécie (Lane, 2001). O carreador incorporado ao produto utilizado trata-se da hidroxiapatita reabsorvível microgranular que, segundo Granjeiro et al. (1992), permite reabsorção pelo mecanismo de fagocitose e possui alto grau de pureza.

Vários tipos de compostos de hidroxiapatita, reabsorvíveis ou não, têm sido testados como carreadores com resultados satisfatórios (Suh et al., 2002; Den Boer et al., 2003). O mesmo carreador empregado no experimento foi utilizado em associação à BMP (Lima, 2002), ao osso bovino inorgânico (Costa Filho et al., 2001), ou à matriz óssea orgânica (Braz et al., 2003), aparentemente sem interferência com a produção de osso. Dessa forma, esses resultados sugerem que, entre os diversos componentes da mistura empregada, a hidroxiapatita não foi responsável pelo bloqueio da formação óssea.

O último componente usado foi o osso inorgânico bovino. A matriz orgânica óssea compõe-se de colágeno, proteínas não colagenosas e fatores de crescimento, ao passo que a inorgânica é basicamente mineral (Mann e Payne, 1989; Lind, 1998). O enxerto de matriz desmineralizada alogênica produzida a partir de osso cortical por meio, em geral, de solução ácida, tem sido aplicado com sucesso para estimular a formação óssea em sítios ectópicos (Forell et al., 1993) e para promover fusão óssea espinhal (Oikarinen, 1982) ou preencher falhas ósseas (Bolander e Balian, 1986; Braz et al., 2003), devido às suas propriedades osteoindutoras e osteocondutoras (Mann e Payne, 1989).

Quando o osso mineralizado, desproteínizado a 100°C ou 1000°C (Oliveira et al., 1999) ou desproteínizado a 100°C nas formas micro ou microgranular (Sicca et al., 2000), foi implantado em subcutâneo de ratos, observou-se microscopicamente ocorrência de reação granulomatosa tipo corpo estranho, com recrutamento de macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias. Outro estudo, ao testar o mesmo produto nas formas macro e microgranular, em defeitos críticos da calota craniana de cobaias, mostrou maior produção óssea pelo grupo-controle, com raras áreas de osso neoformado e intensa fibrose ao redor da maioria das partículas (Cestari et al., 2002).

No presente experimento, observou-se histologicamente, aos 60 dias de pós-operatório, que a lacuna do defeito estava preenchida por partículas de osso inorgânico, formando pequenos conjuntos envoltos individualmente por tecido conjuntivo fibroso, ou um único conjunto maior, envolto por cápsula fibrosa. Aos 150 dias de pós-operatório, embora existissem partículas em reabsorção, ocorreu também seqüestro de conjunto de partículas e isolamento de outras no local, provavelmente impedindo o crescimento ósseo no local. Esses achados histológicos mostravam correspondência com os dos exames radiográficos. Como o único biomaterial radiopaco tratava-se do osso mineralizado desproteinizado, provavelmente ele foi o maior responsável pela inibição da formação óssea, como verificado em outros estudos acima citados (Oliveira et al., 1999; Sicca et al., 2000; Cestari et al., 2002).

CONCLUSÃO

Pelas avaliações radiográficas e histológicas, a regeneração óssea foi inibida nos defeitos segmentares que receberam os biomateriais.

AGRADECIMENTO

À Baumer S.A pela liberação dos materiais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOLANDER, M.E.; BALIAN, G. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. *J. Bone Jt. Surg. Am.*, v.68, p.1264-1273, 1986.
- BRAZ, F.; RAHAL, S.C.; ROCHA, N.S. et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. *Acta Cir. Bras.*, v.18, p.19-24, 2003.
- CESTARI, T.M.; JANA, A.C.O.; SOTTOVIA, A.D. et al. Teste biológico de osso inorgânico bovino macrogranular e microgranular em defeito ósseo craniano. *Pesq. Odontol. Bras.*, v.16, supl., p.95, 2002.
- CIRELLI, J.A.; MARCANTONIO Jr., E.; MARCANTONIO, R.A.C. et al. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. *Biomaterials*, v.18, p.1227-1234, 1997.
- COOK, S.D.; RUEGER, D.C. Osteogenic protein-1. *Clin. Orthop.*, n.324, p.29-38, 1996.
- COSTA FILHO, L.C.; TAGA, R.; TAGA, E.M. Rabbit bone marrow response to bovine osteoinductive proteins and anorganic bovine bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.16, p.799-808, 2001.
- DEN BOER, F.C.; WIPPERMANN, B.W.; BLOKHUIS, T.J. et al. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J. Orthop. Res.*, v.21, p.521-528, 2003.
- FORELL, E.B.; STRAW, R.C.; POWERS, B.E. et al. Evaluation of the osteoinductive capacity of canine demineralized bone matrix in heterotopic muscle sites of athymic rats. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, v.6, p.21-28, 1993.
- GASQUE, K.C.S.; CORREA, A.M.; OLIVEIRA, R.C. et al. Análise microscópica e perfil de imunoglobulinas em resposta ao implante de membrana de pericárdio bovino em camundongos. *Pesq. Odontol. Bras.*, v.16, supl., p.69, 2002.
- GENIUS. 2001. Disponível em: <<http://www.genius.ind.br>> Acessado em: 8 nov. 2003.
- GRANJEIRO, J.M.; TAGA, E.M.; FONSECA, M. et al. Hidroxiapatita para uso clínico. *Rev. Gaúcha Odontol.*, v.40, p.130-134, 1992.
- HOLLINGER, J.O.; BREKKE, J.; GRUSKIN, E. et al. Role of bone substitutes. *Clin. Orthop.*, n.324, p.55-65, 1997.
- JAMES, N.L.; POOLE-WARREN, L.A.; SCHINDHELM, K. et al. Comparative evaluation of treated bovine pericardium as a xenograft for hernia repair. *Biomaterials*, v.12, p.801-809, 1991.
- KEATING, J.F.; McQUEEN, M.M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J. Bone Jt. Surg. Br.*, v.83, p.3-8, 2001.
- LANE, J.M. BMPs: Why are they not in everyday use? *J. Bone Jt. Surg.*, v.83-A, suppl.1, p.161-163, 2001.

- LEKOVIC, V.; CAMARGO, P.M.; WEINLAENDER, M. et al. Combination use of bovine porous bone mineral, enamel matrix proteins, and a bioabsorbable membrane in intrabony periodontal defects in humans. *J. Periodontol.*, v.72, p.583-589, 2001.
- LIMA, A.F.M.L. *Influência das proteínas morfogenéticas ósseas adsorvidas à hidroxiapatita e aglutinantes do colágeno bovino na consolidação da fratura do rádio em coelhos*. 2002. 79f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- LIND, M. Growth factor stimulation of bone healing. *Acta Orthop. Scand.*, v.69, suppl., p.1-37, 1998.
- MAIZATO, M.J.S.; HIGA, O.Z.; MATHOR, M.B. et al. Glutaraldehyde-treated bovine pericardium: effects of lyophilization on cytotoxicity and residual aldehydes. *Artif. Organs*, v.27, p.692-694, 2003.
- MANN, F.A.; PAYNE, J.T. Bone healing. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.*, v.4, p.312-321, 1989.
- OIKARINEN, J. Experimental spinal fusion with decalcified bone matrix and deep-frozen allogenic bone in rabbits. *Clin. Orthop.*, n.162, p.210-218, 1982.
- OLIVEIRA, R.C.; SICCA, C.M.; SILVA, T.L. et al. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. *Rev. Fac. Odontol. Bauru.*, v.7, p.85-93, 1999.
- REMEDIOS, A. Bone and bone healing. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, v.29, p.1029-1044, 1999.
- RILEY, E.H.; LANE, J.M.; URIST, M.R. et al. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, n.324, p.39-46, 1996.
- SICCA, C.M.; OLIVEIRA, R.C.; SILVA, T.L. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, v.8, p.1-10, 2000.
- SUH, D.Y.; BODEN, S.D.; LOUIS-UGBO, J. et al. Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate. *Spine*, v.27, p.353-360, 2002.
- TAGA, E.M.; MULATINHO, J. Biomateriais. In: *___ Dentoflex catálogo*. São Paulo: Dentoflex, 1998. p.1-16.
- TEIXEIRA, J.O.C.; URIST, M.R. Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch. Orthop. Traum. Surg.*, v.117, p.27-34, 1998.
- URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science*, v.150, p.893-899, 1965.
- ZEGZULA, H.D.; BUCK, D.C.; BREKKE, J. et al. Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2). *J. Bone Jt. Surg. Am.*, v.79, p.1778-1790, 1997.
- ZELLIN, G.; LINDE, A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.*, v.31, p.97-104, 1997.