

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

ENXERTO OSTEOCONDRAI ALÓGENO, ASSOCIADO À INOCULAÇÃO DE PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA NO REPARO DO SULCO TROCLEAR DE COELHOS

Lilian Vieira de Andrade

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

ENXERTO OSTEOCONDRAI ALÓGENO, ASSOCIADO À INOCULAÇÃO DE PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA NO REPARO DO SULCO TROCLEAR DE COELHOS

Lilian Vieira de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Duvaldo Eurides

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária-UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde Animal).

UBERLÂNDIA-MINAS GERAIS-BRASIL

Agosto de 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- A553e Andrade, Lilian Vieira de, 1979-
2011 Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos / Lilian Vieira de Andrade. – 2011.
55 f. : il.
- Orientador: Duvaldo Eurides.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Ossos - Enxerto - Teses. I.Eurides, Duvaldo. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Epígrafe

*“Desconfie do destino e acredite em você.
Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando, vivendo que espe-
rando... Porque, embora quem quase morre es-
teja vivo, quem quase vive, já morreu...”*

Luiz Fernando Veríssimo

DEDICATÓRIA

*A minha mãe **Sirlene** por todo amor, carinho, apoio, e toda a dedicação que proporciona a mim. É o meu alicerce nos momentos mais difíceis. É a pessoa que me dá o verdadeiro significado da vida. Te amo, mamãe!!!*

*Ao meu pai **Baltazar** rígido, porém batalhador, forte e guerreiro.
Fonte de inspiração para minha caminhada.*

*A minha irmã **Livia** pelo incentivo, cooperação, carinho e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por guiar meus passos sempre, me possibilitando a realização de mais esse sonho e de tantas outras conquistas.

Agradeço de forma especial ao meu orientador **Prof. Dr. Duvaldo Eurides**, pela paciência, incentivo, confiança, aos ensinamentos, competência e determinação. Obrigada por me mostrar na prática o que realmente é ser um professor, um “pai”, um amigo.

Aos colegas Veterinários **Benito** e **Luiz** pela cooperação no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos **Lorena, Evelyn, Camila, Roberta, Daniel, Laura** que tiveram os seus finais de semana e feriados sacrificados, em benefício a colaboração na execução deste projeto. Muito Obrigada!

A **todos os funcionários** do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária, e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFU, sem exceção.

A **Prof. Dr^a. Tânia Alcântara Machado** do laboratório de patologia na Faculdade de Medicina da UFU pelo auxílio, conhecimento e fundamental cooperação no desenvolvimento deste trabalho.

A **Prof. Dr^a. Deise Aparecida de Oliveira Silva** do laboratório de imunologia da UFU pelo auxílio e sabedoria.

Ao **Laboratório Vallée** de Uberlândia que cederam os coelhos em benefício à elaboração do experimento.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO	13
II. REVISÃO DE LITERATURA	14
II.a. Proteínas morfogenéticas ósseas	14
II.b. Enxertos osteocondrais alógenos.....	17
II.c. Conservação dos enxertos	19
II.d. Lesões osteocondrais.....	20
II.e. Características estruturais da cartilagem articular	22
III. MATERIAL E MÉTODO	23
III.a. Animais.....	23
III.b. Grupos experimentais	23
III.c. Processamento da proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-2)	24
III.d. Procedimento cirúrgico.....	25
III.e. Pós-operatório	26
III.f. Avaliação macroscópica.....	26
III.g. Processamento histológico.....	27
III.h. Esquematização das amostras analisadas	27
IV.RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
V. CONCLUSÃO	41
VI. REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE	56
A. Fontes de aquisição dos materiais da pesquisa	56

LISTA DE ABREVIATURAS

- BMP – Proteína Morfogenética Óssea
BMPs – Proteínas Morfogenéticas Ósseas
GT – Grupo Tratado
GC – Grupo Controle
rhBMP-2 – Proteína Morfogenética Óssea Recombinante Humana-2
rhBMP – Proteína Morfogenética Óssea Recombinante Humana
CHO – Ovário de hamster chinês
TGF β – Fator de Crescimento Transformador Beta
FDA – Administração Federal de Alimentos e Medicamentos
GL – Gay-lussac
Kg – Kilogramas
Mg – Miligramas
SC – Subcutâneo
IM – Intramuscular
TM – Tricrômico de Masson
HE – Hematoxilina-eosina
CEUA – Comitê de Ética de Utilização de Animais
TC – Tecido conjuntivo
TG – Tecido de granulação
PO – Pós-operatório
CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária
DMEM – Meio de Cultivo Modificado de Dulbecco
 μ L – Microlitro
 μ g – Micrograma
Mm – Milimolar
Rpm – Rotações por minuto

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Pontos avermelhados nas margens do enxerto e sobre ele no coelho do grupo tratado (A - seta) e no do grupo controle (B - seta).....</p>	29
<p>Figura 2. Fotomicrografia do implante osteocondral de coelho do GC aos 45 dias de PO. Observar após absorção do processo necrótico pelo organismo a formação de tecido conjuntivo (TC) e tecido de granulação (TG) e cicatrização na região de transição do enxerto com o sitio receptor. HE. (40X).....</p>	32
<p>Figura 3. Fotomicrografia da cartilagem articular de coelhos (A e B). Observar que a cartilagem do grupo tratado (A) e grupo controle (B) presença de fissuras (setas) e lacunas(L). HE. (A= 400X; B= 40X).....</p>	33
<p>Figura 4. Fotomicrografia da área de transição entre o implante e o leito receptor de um coelho do GT1 de PO. Visualizar a destruição da cartilagem adjacente ao enxerto (seta) com presença de eburnação (E). HE. (200X).....</p>	34
<p>Figura 5. Fotomicrografia da região de reconstrução subcondral da área de transição entre o implante e o leito receptor. Notar rarefação óssea de coelho do grupo tratado de 90 dias de PO do GT2 (setas). HE. (40X).....</p>	36
<p>Figura 6. Fotomicrografia demonstrando a formação de fibrocartilagem (F) ao lado do implante (E) no coelho do grupo tratado de 45 dias de PO. TM (200X).....</p>	37

Figura 7. Fotomicrografia da região localizada na superfície da cartilagem hialina do enxerto, demonstrando a formação de tecido conjuntivo fibroso acima desta, possivelmente devido à formação de fibrina em excesso no grupo tratado (GT). HE. (200X).....

38

Figura 8. Fotomicrografia da área de transição de um coelho do GT1- 45 dias de PO. Observar o tecido semelhante à cartilagem hialina (CH) entre enxerto (E) e cartilagem adjacente (CA). HE. (100X).....

39

ENXERTO OSTEOCONDRAI ALÓGENO, ASSOCIADO À INOCULAÇÃO DE PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA NO REPARO DO SULCO TROCLEAR DE COELHOS

RESUMO

Vinte e quatro coelhos da raça Nova Zelândia, adultos, machos foram separados em dois grupos de igual número, controle (GC) e tratado (GT) com proteína morfogenética óssea recombinante humana 2. Os grupos foram subdivididos para avaliações aos 45 (C1 e T1) e 90 dias (C2 e T2). Realizou-se uma incisão parapatelar lateral no joelho esquerdo sobre a pele e cápsula articular. A patela foi deslocada medialmente e um segmento do sulco troclear foi removido. No GC e GT foi preenchido por enxerto osteocondral alógeno conservados em glicerina a 98%. Nos coelhos do GT foram administrados intra-articular 1 µg de proteína morfogenética óssea 2 (rhBMP-2). Observou-se aderência da cápsula articular em quatro (33,3%) animais do GT, e em cinco (41,66%) do GC. Entre as alterações encontradas na cartilagem do enxerto verificou-se, severa descamação em dois animais (16,66%) seguida de necrose em quatro (33,3%), já no GT em três (25%) coelhos constatou-se descamação, mas sem presença de necrose. Verificou-se em oito (66,66%) coelhos do GT crescimento da cartilagem hialina em processo de ossificação. A inoculação intra-articular da rhBMP-2 no reparo do sulco troclear de coelhos com enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina, ocasiona satisfatório reparo ósseo e cartilaginoso após 45 e 90 dias de pós-operatório.

Palavras-chave: cartilagem, glicerina, osso, rhBMP-2

OSTEOCHONDRAL ALLOGRAFT, ASSOCIATED INOCULATION BONE MORPHOGENETIC PROTEIN IN THE REPAIR OF TROCHLEAR GROOVE IN RABBITS

ABSTRACT

Twenty-four New Zealand rabbits, adult males were separated into two equal groups, control (GC) and treated (GT) with recombinant human bone morphogenetic protein 2. The groups were subdivided for evaluation at 45 (C1 and T1) and 90 days (C2 and T2). There was a lateral parapatellar incision in his left knee on the skin and joint capsule. The patella was displaced medially and a segment of the trochlear groove was removed. In CG and TG was filled with allograft osteochondral graft preserved in glycerin at 98%. In rabbits the GT were administered 1 mg intra-articular bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2). There was adhesion of the joint capsule in four (33.3%) animals of the GT, and five (41.66%) of GC. Among the changes found in the cartilage graft was found, severe scaling in two animals (16.66%) followed by necrosis in four (33.3%), whereas in GT in three (25%) rabbits was found peeling, but without necrosis. It was found in eight (66.66%) rabbits GT hyaline cartilage growth in the process of ossification. The intra-articular inoculating of rhBMP-2 in the repair of the trochlear groove of rabbits with allogenic osteochondral allograft of rabbits preserved in glycerin, satisfactory results in cartilage and bone repair after 45 and 90 days postoperatively.

Keywords: cartilage, glycerin, bone, rhBMP-2

I. INTRODUÇÃO

Lesões provenientes da cartilagem articular que atingem apenas a superfície e não envolvem o osso subcondral, possuem escassa capacidade intrínseca de reparação. Fato que decorre da ausência de irrigação sanguínea e, dependência da vascularização oriunda da medula óssea para que ocorra migração de células mesenquimais responsáveis pelo processo de cicatrização (LAMMI et al., 2001; SOUZA, DEL CARLO, VILORIA, 2001).

Em casos de lesão profunda, a dificuldade não se situa na reparação que é rápida, mas, na natureza do material que preenche a lesão, que embora cartilaginoso possa apresentar características fibrosas (TRIPPEL, MANKIN, 1996).

Segundo DAMASCENO et al. (2009), o uso dos enxertos alógenos têm sido indicado como uma opção segura que oferece menor morbidade aos procedimentos cirúrgicos. Além disso, é capaz de reduzir o desconforto pós-operatório, possui baixa antigenicidade, oferece potencial satisfatório de incorporação, neoformação óssea e baixo potencial de transmissão de doenças (BATISTA, CABRAL, 2008).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) apresentam várias possibilidades de aplicação, se destaca nas áreas de ortopedia, odontologia e outras que envolve a diferenciação celular. Já que representam fatores indutores, aptos a estimular a diferenciação de células fonte-mesenquimais em células especializadas, capaz de induzir a neoformação e o reparo do tecido ósseo (SANTOS et al., 2005).

A capacidade de induzir a osteogênese da BMP é influenciada por diversos fatores, como a fonte e o potencial osteoindutivo na preparação da BMP, a viabilidade morfogenética óssea, a habilidade de indução das células osteoprogenitoras do hospedeiro e do local da implantação (EKELUND, BROSJO, NILSSON, 1991).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a eficiência do reparo ósseo e cartilaginoso do sulco troclear dos coelhos, submetidos à implantação de enxerto osteocondral alógeno conservado em glicerina á 98% e inoculação de rhBMP-2.

II. REVISÃO DE LITERATURA

II. a. Proteínas morfogenéticas ósseas

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são definidas como um grupo de fatores de crescimento denominado como citocinas (REDDI, REDDI, 2009). Possuem a capacidade de induzir a formação de osso e cartilagem, sendo considerado um grupo de sinais morfogenéticos fundamental, em sintonia com a estrutura em todo o corpo (BLEUMING et al., 2007). Atuam como reguladores pleiotrópicos de volume ósseo, organogênese esquelético e regeneração óssea após uma fratura. Funcionam como agentes de sinalização que interfere nos eventos celulares como a proliferação, diferenciação e síntese da matriz extracelular (VALDES et al., 2009).

A atividade das (BMPs) foi reconhecida por URIST (1965) onde evidenciaram que a matriz óssea desmineralizada pode aumentar a formação de cartilagem e osso em tecidos moles. URIST, STRATES (1971) verificaram uma proteína fator de crescimento que induz a formação óssea ectópica que se denominou proteína morfogenética óssea.

A BMP presente em osso bovino foi purificada através da obtenção de dados sobre a identificação e clonagem molecular dos fatores com atividade da proteína morfogenética óssea. Portanto, tornou-se possível a clonagem das BMPs (BMP2 a BMP9) em que desempenham a função inibitória ou estimulatória sobre as células osteoprogenitoras, dependendo do estágio de diferenciação celular atuante (WOSNEY et al., 1988).

As recomendações para a utilização das BMPs estão associadas, sobretudo a grandes perdas ósseas, decorrentes de anomalias do desenvolvimento, defeitos ósseos causados por trauma, doenças infecciosas e inflamatórias (SANTOS et al., 2005). Por possuírem ação local devem ser depositadas onde se pretende promover o crescimento ósseo (CIANI et al., 2006). Durante a formação óssea a BMP cria um ambiente adequado, que é conduzido ao desenvolvimento da medula óssea funcional (CHEN et al., 2004).

Os eventos envolvidos na formação óssea com o uso das BMPs são semelhantes ao processo de ossificação endocondral, distinguiu-se somente quanto ao

estímulo à precocidade de formação. Os eventos seguem-se a quimiotaxia e proliferação de células mesenquimais, diferenciação em condroblastos e osteoblastos, calcificação da matriz cartilaginosa, angiogênese, diferenciação, mineralização e remodelação óssea, seguida de formação de medula óssea (TSUMAKI, YOSHIKAWA, 2005).

Conforme BESSHO et al. (2000), as BMPs produzidas a partir de células de mamífero (CHO – chinês hamster ovário) com DNA modificado, por meio do processo de clonagem e recombinação são denominadas rhBMPs (Proteínas morfogenéticas ósseas recombinante humana). Com o objetivo de aumentar a produção e diminuir os custos a rhBMP foi elaborada através da *Escherichia coli*. A inserção de sequências de genes das BMPs em partículas bacterianas e virais tem potencializado de modo acentuado as propriedades osteoindutoras destas proteínas. Também, progressos para melhor efetividade das BMPs têm proporcionado a utilização de modernos materiais carreadores como colágenos, hidroxiapatita, polímeros biodegradáveis, dentre outros (BARROS et al., 2006).

Os tipos de BMP-2 a BMP-9 são membros da família do fator de crescimento transformador beta (TGF β) (CHENG et al., 2003). JOYCE, JINGUSHI, BOLANDER (1990) referiram que o TGF β é um importante regulador da proliferação celular, diferenciação e síntese da matriz extracelular, sendo a BMP-2 conhecida como proteína osteoindutiva humana dois (rhBMP-2). As BMPs totalizam um conjunto de pelo menos dezoito diferentes proteínas, com composição e consequência biológica variadas, apresentam potencial indutor em sítios específicos de múltiplos tecidos (MARIE, 1997).

Com a utilização das BMPs ocorre redução significativa do tempo de formação do calo ósseo e sem qualquer reação adversa no foco de aplicação do produto em fratura distal de rádio e ulna em cães (DELLA NINA et al., 2007). Não foi observada relação de toxicidade após aplicação de BMP tanto em tecido muscular como em osso. A implantação de doses crescentes de rhBMP-2 pode acelerar a formação óssea, ou seja, a dose de proteína aplicada é diretamente proporcional ao desenvolvimento ósseo. A BMP-2 atua sendo capaz de induzir o processo de ossificação endocondral e no restabelecimento da consolidação óssea. As células mesenquimais indiferenciadas migram para o local da implantação onde ocorre proliferação. Os condrócitos se hipertrofiam e a cartilagem torna-se calcificada após um período de sete dias da BMP inoculada. Aos 14 dias da inoculação os osteoclastos e

osteoblastos se apresentam abundantes ocorrendo à remodelação da cartilagem calcificada. Observa-se um aumento significativo na vascularização do implante através das células hematopoiéticas e endoteliais e posterior substituição óssea (WANG et al., 1990).

A rhBMP-2 é capaz de regular marcadores fenotípicos de osteoblastos maduros, como a atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno e a expressão da osteocalcina. Também é capaz de aumentar a expressão de indicadores de osteoblastos em culturas de células mesenquimais pluripotentes, o que indica que a rhBMP-2 regula o acesso de células indiferenciadas para os locais de diferenciação específicos (HANADA, DENNIS, CAPLAN, 1997).

A atividade das BMPs é autorregulada, porém o fator que interfere neste processo de expressão inibitória e controlada por meio da regulação autócrina. A BMP-2 pode se unir a outras BMPs sendo capaz de evitar que estas proteínas desempenhem atividade estimulatória unida ao receptor específico da membrana celular. Ocorre o mecanismo de controle local entre os efeitos de formação de osso e efeitos reversos deste processo (CANALIS, ECONOMIDES, GAZZERRO, 2003).

As rhBMP-2 carregadas em esponjas de colágeno foram aprovados recentemente pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (FDA) para uso clínico no tratamento de fraturas de ossos longos (WHITE et al., 2007). Além da utilização em vários modos de tratamento, como na regeneração óssea associada com implantes dentários, e quando não se estabelece a união de esqueletos e na fusão espinhal (DE BIASE, CAPANNA, 2007; GAUTSCHI, FREY, ZELLWEGGER, 2007; PACHECO et al., 2010). No tratamento de alterações na coluna adquiridas ou degenerativas a proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP) tem sido utilizada para promover a fusão óssea autógena. O processo ocorre através de uma série de medidas que incluem a inflamação, a formação de fibrocartilagem, a ossificação endocondral e remodelação final (JEONG, SANDHU, FARMER, 2005). A utilização de rhBMP-2 demonstra o potencial indutor de incremento na densidade óssea em processos reparadores, tanto nos aspectos clínicos quanto em radiográficos em humanos (PACHECO et al., 2010). O uso da rhBMP-2 associada ao enxerto alógeno em ratos induziu a neoformação óssea, e a incorporação ocorreu de forma rápida e efetiva no defeito osteocondral (JORGE, 2004).

A aplicação de rhBMP-2 em mioblastos obstrui a expressão de seus marcadores específicos que passam a apresentar fatores de expressão típicos de células

ósseas. A habilidade osteoindutora pode estar vinculada as células distintas do tecido ósseo. As BMPs desempenham importante função na diferenciação das células mesenquimais em condrócitos e osteoblastos. Portanto, pesquisas vêm sendo realizadas com o uso da rhBMP-2 de modo a aperfeiçoar a qualidade da cicatrização óssea.(BARROS et al., 2006).

Foi avaliado por MINAMIDE et al. (2001), dois sistemas de carregamento para as BMPs, o colágeno tipo I e uma estrutura porosa (cerâmica óssea verdadeira). Observaram que a estrutura porosa demonstrou maior eficiência quando comparado ao colágeno, ocorrendo uma rápida fusão lombar da coluna vertebral em coelhos. O uso adequado do material carreador promoveu a liberação gradual da rhBMP-2 no local da implantação. Visto que, estas proteínas são facilmente solubilizadas e eliminadas dos tecidos após a implantação. Com este objetivo, tem sido utilizados carreadores como osso desmineralizado, colágeno e vários polímeros sintéticos (NIEDERWANGER, URIST, 1996; LI, WOSNEY, 2001).

De acordo com TORIUMI, ROBERTSON (1993), a eficiência do material carreador é indispensável para obtenção de melhores resultados ou não dos enxertos ósseos indutores quando realizado as cirurgias reconstrutivas. O carreador ideal deve garantir uma distribuição constante sem deixar que o material implantado exceda os limites do meio e aumentar a exposição dos tecidos do paciente à substância de crescimento. O material deve também ser absorvido à medida que advém a formação óssea, biodegradável, biocompatível, seguro e estabelecido de acordo com a forma e tamanho apropriado para o enxerto.

II.b. Enxertos osteocondrais alógenos

Na ortopedia veterinária a enxertia óssea é o processo de opção na reposição de perdas e falhas ósseas em fraturas e ressecções amplas. É necessário no processo cirúrgico que os ossos para os implantes sejam antecipadamente retirados do animal doador, sob assepsia e conservados em meio adequado. Além disso, é indispensável que o método de conservação seja viável, de uso simples e de baixo custo (GIOSO, BENITES, KÄMPF, 2002).

A técnica de enxerto osteocondral autólogo apresenta resultados satisfatórios quando utilizada para o tratamento de defeitos cartilaginosos de pequenas dimensões. O sucesso depende de retirada cautelosa do enxerto, posicionamento e fixa-

ção adequada do mesmo no leito receptor. É preciso rigor quanto à retirada e assentamento do enxerto no local do defeito no sentido de minimizar o dano aos condrócitos e aceitar perfeita congruência entre o enxerto e a zona receptora (CHANAMÉ, 2000).

Enxertos de ossos esponjosos são usados para propiciar células vivas e fatores de crescimento que estimulem a produção de osso novo. No entanto, os enxertos ou implantes corticais proporcionam inicialmente uma sustentação mecânica, onde atuam como preenchedores de espaço ou escoras de sustentação de peso. Também funcionam como apoio para intracrescimento de osso novo do hospedeiro. O processo de penetração de capilares, tecidos perivascular e células osteoprogenitoras, provenientes do leito receptor no interior da estrutura de um implante ou enxerto, denomina-se osteocondução (STEVENSON, 1996).

Os aloenxertos ósseos corticais são biodegradáveis e frequentemente usados no tratamento de fraturas em mamíferos (AMENDOLA et al., 2008). As propriedades biomecânicas do enxerto podem ser modificadas conforme a técnica empregada e o tempo de preservação utilizado (DINGEE, 2005; SAMPAIO et al., 2009).

Uma das principais propriedades atribuídas aos enxertos ósseos é a osteoindução (ALEXANDER, 1987). No processo de osteoindução as células mesenquimais são estimuladas a se converterem em condroblastos e osteoblastos que produzem a matriz óssea mineralizada, estas alterações são geradas por vários fatores que se distinguem inclusive pelas proteínas morfogenéticas do osso (BMP). O enxerto cortical assim como o esponjoso contém BMP em sua matriz (STEVENSON, 1998; MARTINEZ, WALKER, 1999).

Diversos fatores determinam a incorporação bem sucedida do osso enxertado. Destacam-se o tipo do enxerto ósseo, o local de acolhimento, a vascularização da interface do enxerto e enxerto-hospedeiro, a imunocompatibilidade entre o doador, técnicas de preservação, presença de citocinas, fatores de crescimento e fatores sistêmicos (JEONG, SANDHU, FARMER, 2005). O enxerto alógeno envolve diferenças entre códigos genéticos do receptor e doador, pode haver respostas imunes ocasionando reabsorção óssea (JANEWAY, 2002).

Existem diversos estágios de incorporação do enxerto alógeno esponjoso no foco de fratura. Inicialmente ocorre a formação de hematoma, que é reabsorvido entre uma e duas semanas, e após a resposta inflamatória que ocorre em intervalo de minutos ou horas. Surgem alças capilares transcorridos cinco dias com o processo

de revascularização e osteoindução. Em vinte dias o tecido necrótico é reabsorvido e o enxerto é revascularizado. A remodelação continua com corticalização e medulização (MILLIS, MARTINEZ, 2003).

II.c. Conservação dos enxertos

Existem vários métodos utilizados na preservação de ossos, como congelamento (DUELAND et al., 1989), armazenamento em meio de cultura de células a 4°C (DAVIDSON et al., 2007), a liofilização (MACEDO et al., 1999), tintura de iodo a 2% (PINTO JÚNIOR, 1995), glicerina (OLIVEIRA, 2008), mel (AMENDOLA et al., 2003), óxido nitroso (JOHNSON, SHOKRY, STEIN, 1985).

O método de conservação ideal é aquele que conserva a função osteoindutora, enquanto perde a antigenicidade, contudo, a imunogenicidade dos ossos esterilizados em glicerina a 98% não foi determinada (STEVENSON, 2005). Foi observada a manutenção da atividade osteoindutora em fragmentos ósseos de ratos após a conservação em glicerina a 98%, durante trinta dias à temperatura ambiente que apesar da diferença imunogênica entre doador e receptor, o transplante ósseo não foi comprometido (CAVASSANI, MORAES, PADILHA FILHO, 2001)

Ossos de cães conservados em glicerina a 98% por nove anos com medula óssea íntegra, foram observados preenchimento do canal medular, coloração rósea pálida e sem presença de ressecamento, sendo possível colheita de seu conteúdo com uso de seringa. Não sendo verificada rejeição do organismo (GIOSO, BENITES, KÄMPF, 2002). Foi comparado por AMENDOLA et al. (2008) a biomecânica da resistência óssea de diáfises femorais conservadas em glicerina ou mel durante trinta dias. Foi notado que com a utilização da glicerina o osso continha mais resistência que no mel.

O glicerol, propanotriol ou glicerina se apresenta como um líquido incolor, viscoso, não tóxico, higroscópico e solúvel em água. É muito empregado em formulações farmacêuticas como veículo e solvente na composição de cremes, supositórios, elixires, xaropes, e colírios. Também é conhecido na prática laboratorial como crioprotetor, quando utilizado em baixas concentrações (5% a 20%), sendo que, em altas concentrações, possui ação preservada (SWEETMAN, 2002; REY, 2003).

A glicerina desidrata o tecido ósseo sendo capaz de substituir a maior parte da água intracelular sem alterar a concentração iônica das células, atuando de forma

eficaz protegendo a integridade celular (PIGOSSI, 1964). Atua como antisséptico diante os vários gêneros de microorganismos patogênicos, agindo como bactericida e fungicida, exceto contra esporuladas (PIGOSSI, 1967). Age de forma eficiente a temperatura ambiente, pois mantém o material livre de contaminação (PINTO JÚNIOR, 1995; GIOSO, BENITES, KÄMPF, 2002; ZILLOTTO et al., 2003). Contudo, MELO et al. (1998) avaliaram bacteriologicamente aloenxertos ósseos conservados em glicerina e notaram o crescimento de *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus spp* em 21,4% amostras de segmentos ósseos.

A glicerina além de ser um bom meio de conservação de fragmentos ósseos para utilização como enxerto, mantém a função osteoindutora e um apropriado grau de osteocondução, não oferece sinais de infecção e de rejeição no receptor (ZILLOTTO et al., 2003). É um método economicamente acessível, que dispensa o uso da autoclavagem e congelamento, cujas técnicas causam danos teciduais e prejudicam a formação de calo ósseo no pós-cirúrgico (GIOSO, BENITES, KÄMPF, 2002). Os tecidos biológicos, no caso o fragmento ósseo devem permanecer conservados em glicerina por um período de pelo menos trinta dias e antecipadamente hidratado durante trinta minutos antes da implantação (DALECK et al., 1992). Por serem tóxicos as células, o enxerto não deve ser mergulhado em soluções isotônicas ou submeter a tratamento com uso de antibióticos (PIERMATTEI, FLO, 1997).

II.d. Lesões osteocondrais

O defeito osteocondral surge em pacientes que possuam cartilagem saudável, de procedência frequentemente traumática. Acontece após um trauma de fratura articular, lesão ligamentar ou meniscal, ou lesão osteocondral isolada. Outras afecções, como doenças congênitas e metabólicas, podem induzir a esse tipo de lesão. Os defeitos osteocondrais proporcionam pouca resposta intrínseca de reparação tecidual, sendo a falha preenchida então por tecido fibrocartilaginoso. Embora algumas lesões condrais sejam assintomáticas, estas podem evoluir para a degeneração da cartilagem e osteoartrose (BUCKWALTER, 1998).

Foi descrito por SELLARDS, NHO, COLE (2002), a classificação de Outerbridge para caracterizar as lesões da cartilagem, que se baseia nas alterações articulares, como: Grau 0: normal; Grau I: lesão articular branda; Grau II: lesões caracterizadas por fibrilação, com fissuras menores que 1,5 cm de diâmetro; Grau III: le-

sões com fissuras profundas até o osso subcondral; Grau IV: lesões são diferenciadas por expor o osso subcondral.

Fatores relacionados à etiopatogênese da doença degenerativa osteoarticular indicavam alterações da vascularização óssea e alterações do osso subcondral, mas estas alterações são provavelmente em consequência da osteoartrose. As alterações primárias da osteoartrose acontecem na cartilagem articular. Quando ocorre perda de proteoglicanos, rompe-se determinados pontos da zona superficial da cartilagem, conseqüentemente, libera mais proteoglicanos, que afeta a viscoelasticidade com evolução para a degeneração (VELLUTINI, 1997).

Determinados procedimentos cirúrgicos visam à reparação das lesões osteocondrais (PETERSON et al., 2000), no entanto nenhum dos procedimentos atualmente utilizados é capaz de regenerar a cartilagem hialina em seu aspecto original (BUARQUE DE HOLANDA et al., 2010). Dessa forma, demonstra que a cartilagem possui capacidade restrita de autorregeneração após lesão (OCHI et al., 2004).

O elemento de cicatrização tecidual pode ser dividido em três fases naturais: necrose, inflamação e reparação. Se a lesão é restrita às camadas superficiais da cartilagem (defeito condral) não corresponde às três fases, justamente por ser desprovida de irrigação sanguínea a cartilagem hialina. Todavia, na presença de um defeito osteocondral, com exposição do osso subcondral, as três fases ocorrem facilmente (RIBEIRO, CAMANHO, TAKITA, 2004).

Segundo WAKITANI et al. (1994) o tecido de reparação, mesmo que parecido à cartilagem hialina em análise histológica, se difere da cartilagem articular normal, tanto bioquímica como biomecanicamente. Foi observado por SOUZA, DEL CARLO, VILORIA (2001) falhas preenchidas por cartilagem hialina com áreas de fibrocartilagem. No tecido de reparação foram notados vacúolos de diferentes tamanhos em sua camada mais superficial, o que sugeri lesão degenerativa da cartilagem de reparação. Sendo o processo de reparação caracterizado como progressivo e demorado.

As técnicas para o tratamento de lesões cartilaginosas com o uso de estimulação da medula óssea e que provocam penetração do osso subcondral para alcançar a zona de vascularização, estimulam a formação de coágulos de fibrina que contém células primitivas pluripotenciais. Este coágulo se diferencia e se remodela o que resulta em tecido de reparação fibrocartilaginoso (BUCKWALTER, MANKIN, 1997). Entre as técnicas destacam-se as perfurações múltiplas do osso subcondral, a artroplastia por abrasão e as microfraturas, que originam como tecido de regene-

ração a fibrocartilagem. Contudo, a fibrocartilagem não tem as mesmas propriedades mecânicas e estruturais da cartilagem hialina normal, sendo capaz de sofrer degeneração com o passar do tempo (MINAS; NEHRER, 1997).

II.e. Características estruturais da cartilagem articular

Segundo BUCKWALTER; MANKIN (1997), a cartilagem hialina possui características físico-químicas específicas que garantem uma mobilidade com baixo atrito e durabilidade. É um tecido de alta complexidade que varia em espessura, densidade celular, composição da matriz e propriedades mecânicas na mesma articulação, entre articulações e entre espécies. Entretanto, os componentes são os mesmos em todas as articulações sinoviais.

A principal função da cartilagem hialina é absorver e distribuir a carga recebida sobre o osso subcondral. Isto ocorre devido sua constituição capaz de criar um ambiente intra-articular de baixa fricção, com lubrificação, possibilitando movimentos articulares recorrentes. A composição da cartilagem hialina e de condrócitos (em torno de 10%), uma densa matriz extracelular, constituída por fibras de colágeno tipo II (10-20%), proteoglicanos (10-15%) e água (60-80%). Por apresentar natureza avascular, a nutrição dos condrócitos ocorre por difusão, ou seja, a partir do líquido sinovial, que atravessa a matriz extracelular, até atingir os condrócitos (BUCKWALTER, EINHORN, SIMON, 2000).

A cartilagem articular demonstra diversas características segundo a camada que se analisa. Estas diferenças estão relacionadas com a quantidade e organização dos componentes da matriz e dos condrócitos, o que dá às camadas características biomecânicas conforme a região. Em função destas variações divide-se a cartilagem em quatro camadas: superficial, média, profunda e calcificada (ANGEL, RAZZANO, GRANDE, 2003).

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.a. Animais

Colheu-se seis articulações do joelho de cadáveres de coelhos adultos, machos, da raça Nova Zelândia, com peso que varia de 3,0 kg a 5,0 kg e idade aproximada de 90 dias. As peças foram obtidas após abate dos animais, no abatedouro da Escola Agrotécnica Federal de Uberlândia, fiscalizado pelo serviço de inspeção municipal. Os doadores selecionados se apresentavam clinicamente saudáveis.

A região do joelho foi submetida à tricotomia e antissepsia com iodo degermante¹ a 1%, álcool² 70° GL, e iodo povidona³ a 1%. Realizou-se uma incisão parapatelar lateral de pele, divulsão do subcutâneo e incisão na cápsula articular. A patela foi deslocada medialmente para exibição do sulco troclear femoral. Utilizando um paquímetro graduado⁴ mensurou-se uma área no sulco de 0,4 cm de largura x 1,0 cm de comprimento que foi demarcada por meio de incisões na cartilagem articular com uma lâmina de bisturi⁵ nº10. Com uma micro-retífica Dremel⁶ acoplada com um disco diamantado em baixa rotação perfazendo um ângulo por volta de 45°, e sobre gotejamento com solução fisiológica⁷ a 0,9%, removeu-se, da área demarcada, um segmento osteocartilaginoso em formato de cunha. Os enxertos foram higienizados diversas vezes com solução fisiológica a 0,9% para remoção de detritos impregnados, e armazenados em frascos contendo solução de glicerina⁸ a 98%, em temperatura ambiente, por um período mínimo de 30 dias até a utilização.

III.b. Grupos experimentais

Utilizou-se 24 coelhos adultos, machos, com idade aproximada de 18 meses, da raça Nova Zelândia, com peso médio 3,25 kg, provenientes do Laboratório Valée de Uberlândia, MG. Os animais foram alojados em gaiolas individuais, em um box coberto de uso exclusivo aos coelhos, com água e ração⁹ à vontade. Para que fossem considerados aptos a participarem do experimento foram submetidos às avaliações clínicas da articulação do joelho esquerdo. Foi administrado ivermectina¹⁰ a 1% (0,1 mg/kg, SC), para eliminação de endo e ectoparasitas. Antes do início do expe-

rimento manteve-se um intervalo de quinze dias de adaptação dos animais com os pesquisadores e ao ambiente em que foram acomodados. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo 063/10.

Os animais foram distribuídos em dois grupos de modo aleatório e de igual número (n=12), sendo grupo controle (GC) e grupo tratado (GT) com proteína morfogenética óssea recombinante humana 2¹¹. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos iguais (n=6), para avaliações aos 45 dias (GC1 e GT1) e 90 dias (GC2 e GT2) de pós-operatório (PO). Os coelhos foram submetidos à avaliação quanto aos aspectos clínicos da área operada, macroscópicos e histológicos, conforme os períodos estabelecidos.

Os coelhos permaneceram em jejum hídrico e sólido por um período de duas a quatro horas, respectivamente. Utilizou-se como protocolo anestésico a cetamina¹² (30 mg/Kg, IM) e cloridrato de xilazina¹³ (5,0 mg/Kg, IM). Quando necessário, foram administradas subdosagens do protocolo para manutenção do plano anestésico. Para analgesia foi administrado o cloridrato de tramadol¹⁴ (2,0 mg/Kg, SC) e 30 minutos antes da intervenção cirúrgica foi aplicado o antiinflamatório flunixin meglumine¹⁵ (1,0 mg/kg, IM) e antibioticoprofilaxia ceftiofur¹⁶ (1,0 mg/Kg, IM).

A pele na região da articulação do joelho esquerdo foi submetida à tricotomia e a antisepsia com iododegermante, álcool, iodo povidona.

III.c. Processamento da proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-2)

O frasco da proteína contendo 10 µg em sua forma liofilizada foi mantido em refrigerador a -20° C. Previamente a sua utilização para administração no local do implante osteocondral, permaneceu em ambiente natural por um período de 10 minutos. Realizou-se homogeneização do frasco contendo a proteína em centrífuga a 2000 rpm durante um minuto. A manipulação com a rhBMP-2 ocorreu em uma capela de fluxo laminar¹⁷, desinfetada com álcool 70° GL e luz germicida, procedeu-se a diluição em 100 µL de solução com ácido acético¹⁸ a 20 mM, tornando a concentração da rhBMP-2 a 0,1 µg/µL. Alíquotas de 10 µL, ou seja, 1 µg de rhBMP-2 foi adicionado ao meio DMEM (Meio de cultivo modificado de Dulbecco)¹⁹ suplementado com 10% de soro fetal bovino²⁰, até que a amostra atingisse o volume total de 500

μL . As amostras foram embaladas em tubos de eppendorff²¹, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e transportadas até a sala de cirurgia experimental do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

III.d. Procedimento cirúrgico

Com o animal em decúbito dorsal foi realizada uma incisão de pele de aproximadamente 4,0 cm na região parapatelar lateral da articulação do membro pélvico esquerdo, seguido de divulsão do tecido subcutâneo. A cápsula articular foi incisada cerca de 4,0 cm, e a patela luxada no sentido medial para exposição do sulco troclear femoral. Utilizando um paquímetro graduado, mensurou no sulco uma área de 0,4 cm de largura x 1,0 cm de comprimento. Delimitou-se a área por meio de incisões na cartilagem articular com lâmina de bisturi nº10. No local demarcado foi realizado osteotomia com um disco diamantado acoplado a uma micro-retífica Dremel[®] em baixa rotação e sob gotejamento de solução fisiológica a 0,9%. O disco foi mantido posicionado a um ângulo em torno de 45° para remover o segmento em forma de cunha, preservando a aresta medial e lateral da tróclea femoral.

O segmento do sulco troclear foi removido com uma lâmina de bisturi, evitando-se danificar as arestas da tróclea femoral e a cartilagem articular adjacente. As frações ósseas removidas foram lavadas por diversas vezes com solução fisiológica a 0,9% para remoção de sangue e resíduos ósseos, e em seguida colocados em frascos contendo glicerina a 98% e conservados por um período mínimo de 30 dias. Os enxertos osteocondrais alógenos conservados em glicerina previamente a sua implantação ao sítio receptor, foram lavados e hidratados com solução fisiológica a 0,9% durante 30 minutos e com as bordas enxerto/receptor adaptadas para evitar depressão entre as superfícies cartilaginosas do implante e do leito.

Após o posicionamento do enxerto, a patela foi recolocada no sulco troclear do fêmur. Com fio poliglactina 910²², nº 4-0 a cápsula articular foi aproximada com pontos simples isolados e a redução do espaço subcutâneo utilizou-se poliglactina 910 nº 4-0, em sutura ziguezague. Para síntese de pele empregou-se o mononáilon²³ nº 3-0, com pontos simples isolados.

Nos animais do grupo controle (GC) realizou-se somente a implantação osteocondral alógena. Nos do grupo tratado (GT), após enxertia e sutura da cápsula arti-

cular, foi inoculado intracapsular, 1,0 mL, 1 µg rhBMP-2, diluída em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino.

III.e. Pós-operatório

Os animais foram mantidos com colar “elisabetano” elaborado com filmes radiográficos, para evitar que interferisse na ferida cirúrgica. O local da incisão de pele foi higienizado duas vezes ao dia, com gazes embebidas de solução fisiológica a 0,9% e aplicação tópica de iodo povidine. Seguido da administração tópica de rifamicina spray²⁴ por durante 10 dias, momento da remoção dos pontos. Prescreveu-se como analgésico o cloridrato de tramadol (2,0 mg/Kg, SC); de oito em oito horas, durante três dias seguidos. Realizou-se a antibioticoprofilaxia com ceftiofur (1,0 mg/Kg, IM), uma vez ao dia durante sete dias, e como antiinflamatório a flunixin meglumina (1,1 mg/Kg, IM), a cada 24 horas por três dias consecutivos.

III.f. Avaliação macroscópica

Transcorridos os períodos pré-estabelecidos de 45 e 90 dias de pós-operatório os animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia com aplicação de altas dosagens de tiopental sódico²⁵ a 2,5% e cloreto de potássio²⁶ a 10%. Conforme as normas recomendadas para o uso de animais em pesquisas científicas (CRMV-MG, 2002). Foram realizadas avaliações macroscópicas e colheitas de amostras das articulações do joelho para avaliação histológica.

As articulações foram avaliadas quanto à cicatrização das incisões, presença de transudato e/ou exsudato e reações teciduais anormais. Na inspeção intra-articular foram notados os aspectos do líquido sinovial como a coloração, volume, viscosidade, espessura da cápsula articular, posicionamento da patela, aderências e crescimento tecidual. Do mesmo modo, avaliou-se a consistência, irregularidades na superfície do enxerto, áreas de contato com as bordas trocleares e a adesão do enxerto ao sítio receptor. Examinou-se também a presença de áreas com reabsorção óssea dos enxertos osteocondrais.

III.g. Processamento histológico

Decorridos os períodos de 45 e 90 dias de PO, a epífise distal do fêmur de cada animal foram retiradas e armazenadas em frascos individuais, fixados em formol²⁷ a 10% por um período mínimo de 24 horas, em temperatura ambiente até a preparação histológica. O processamento histológico iniciou-se com a descalcificação em ácido nítrico²⁸ a 5% durante 48 horas, sendo realizada a troca do fluído descalcificador de duas em duas horas. As amostras foram lavadas em água corrente por 12 horas. No processo de desidratação utilizou-se álcool absoluto²⁹, com trocas a cada hora, durante quatro vezes. A diafanização dos materiais foi realizada com o uso de xilol³⁰, e antecipadamente a inclusão em blocos, as amostras permaneceram imersas em parafina líquida em estufa a 70°C, durante 120 minutos. Cortes transversais de 0,5 µm foram realizados na região entre o implante e o leito receptor, com intuito de analisar a área de transição. Os cortes foram submetidos às colorações com Hematoxilina-Eosina³¹ (HE) e tricrômico de Masson³² (TM). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Olympus BX 60) acoplado à câmera digital (Olympus DP-71-12,5 MPixel)³³ do laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Uberlândia de Uberlândia/UFU, para observar as principais alterações histológicas encontradas.

III.h. Esquematização das amostras analisadas

Para avaliação das lâminas histológicas teve como critério a intensidade da reação inflamatória provocada na região subcondral localizada no osso subcondral. A resposta inflamatória na região subcondral foi analisada com base no tipo de infiltrado, isto é celularidade e presença de exsudato purulento. A atividade inflamatória foi classificada como: a. Nenhuma, que caracterizou pela ausência de sinais inflamatórios como células de defesa e ausência de piócitos; b. Leve, em decorrência da presença de células (macrófagos, linfócitos, células gigantes e multinucleadas) em pequena quantidade; c. Moderada, presença de células de defesa em grande quantidade e ausência de piócitos e d. Intensa, grande quantidade de células de defesa e presença de piócitos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo anestésico utilizado se mostrou adequado por ser de fácil administração (IM), segura do fármaco e por manter um plano anestésico adequado de 30 a 75 minutos. Pode realizar a mistura dos fármacos cetamina e xilazina na mesma seringa para administração. Esta técnica é bastante utilizada em coelhos, e a associação minimiza os efeitos de catalepsia e delírio produzido pela quetamina em uso individual, além do baixo custo (MASSONE, 1988).

Entre as alternativas terapêuticas dos defeitos condrais do joelho em humanos pode citar uma simples lavagem articular, com ou sem debridamento, onde se consegue remover as substâncias que degradam a cartilagem e que causam dor (ZHANG et al., 2008). Diferentes técnicas como perfurações, microfraturas e abrações em que regeneram a superfície articular com tecido semelhante à cartilagem hialina, para a reparação das lesões da cartilagem articular do joelho (MITHOEFER et al., 2006), mosaicoplastia, transplante autólogo de condrócitos (GOBBI et al., 2010) e utilização de enxertos alógenos osteocondrais (INOUYE et al., 2002). Conforme foi verificado por OLIVEIRA (2008), este trabalho fundamentou-se na reparação osteocartilaginosa com o uso de enxertos alógenos conservado em glicerina a 98%, na articulação do joelho de coelhos com a inoculação de proteína morfogenética óssea 2, contudo sem a utilização de células tronco.

Os coelhos do GC e GT apresentaram boa cicatrização de pele. Durante a observação macroscópica do GT1 dois (16,66%) (C3 e C6) e em GT2 todos os seis (50%) (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) foi notado à presença de pontos avermelhados na cartilagem do enxerto assim como nas laterais, sugerindo reabsorção óssea. Sendo que no GC foi verificado em um animal (8,33%) (C5) do GC2. Este processo pode ser devido à resposta imune que pode ocorrer pelo receptor do enxerto alógeno, visto que, existem diferenças entre códigos genéticos do receptor e doador, de forma que respostas imunes de reabsorção são esperadas (Figura 1), como foi referido por (JANEWAY, 2002).

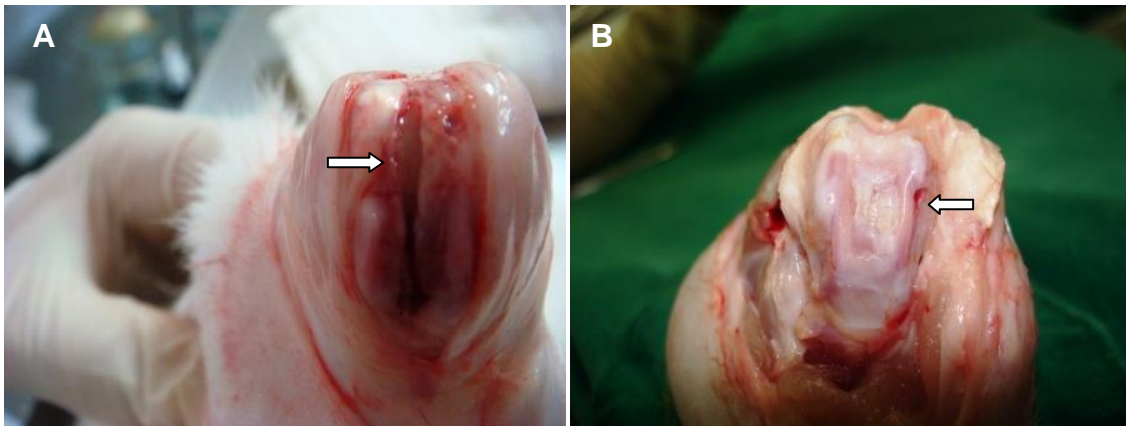


Figura 1. Pontos avermelhados nas margens do enxerto e sobre ele no coelho do grupo tratado (A - seta) e no do grupo controle (B - seta).

Verificou-se que o líquido sinovial no GC1 se demonstrava viscoso e de coloração amarelada em quatro (33,3%) casos, já no GC2 foi observada em apenas um (8,33%), possivelmente deveu-se à contaminação. No entanto em um (8,33%) coelho do GC1 apresentava coloração escura que sugere uma hemorragia devido à instabilidade articular (BIASI, RAHAL, LOPES, 2001). A redução da viscosidade foi observada em quatro (33,3%) animais do GC2, o que se deveu, possivelmente, pela liberação da enzima hialuronidase, que degradou o ácido hialurônico. Na ocorrência de processo inflamatório intra-articular, a diminuição da concentração do ácido hialurônico, que ocasiona alteração na sua composição tanto na qualidade como na quantidade do líquido sinovial (LIPOWITZ, 1993; ODDIS, 1996). No grupo tratado o líquido sinovial apresentava-se viscoso, ausência de piócitos, com escassez na quantidade em quatro (33,3%) no T1 e em cinco no T2 (41,66%), quando comparado aos do GC.

Dos 24 animais avaliados, o enxerto demonstrou-se bem aderido ao leito receptor em 22 coelhos, sendo um (8,33%) do GC1 e outro do GT2 com movimentação dentro do sulco. Aparentemente encontrava-se em fase de absorção. A incorporação de enxertos não vascularizados é um processo que depende não exclusivamente das propriedades biológicas do enxerto e condição do leito receptor. Depende também da estabilidade da fixação e da resistência mecânica ao qual o enxerto é submetido, além de ser um processo lento, que pode manter-se por anos (BAUER, MUSCHLER, 2000; GONÇALVES, HONDA, ONO, 2003). Entretanto, pode-se afirmar que, nesse experimento, a estabilidade no local de enxertia foi indispensável à incorporação leito-receptor, por oferecer formato tridimensional e conformação tra-

becular, constituiu um arcabouço para a revascularização do implante, promovendo a osteocondução.

Durante a análise macroscópica ainda foi constatado crescimento tecidual cartilaginoso, localizados nos côndilos femorais, bordas trocleares, e sobre o implante. No GC1 em cinco coelhos (41,66%) houve deposição tecidual nas bordas trocleares e sobre o enxerto, e quatro (33,3%) nos côndilos femorais. No GC2 notou-se em um (8,33%), dois (16,66%) e três (25%) animais, houve a formação tecidual nos côndilos femorais, bordas trocleares e sobre o implante alógeno, respectivamente. Já no GT2 houve crescimento tecidual cartilaginoso em ambas as cristas trocleares em dois coelhos (16,66%). Conforme AMIEL et al. (1985), não se pode estabelecer uma correlação exata com as características histológicas, bioquímicas ou biomecânicas dos reparos osteocondrais. Verificaram a formação de tecido novo semelhante à fibrocartilagem, liso, brilhante, firme, e em continuidade com a cartilagem adjacente. Observações semelhantes às verificadas neste experimento.

Constatou-se em seis (50%) animais GC1 espessamento significativo da cápsula articular fibrosa, enquanto que no grupo GC2 em somente três (25%) coelhos. Nos grupos tratados não foi verificada estas alterações. BRINKER, PIERMATTEI, FLO (1986) afirmaram que o espessamento da cápsula fibrosa está associado com o amadurecimento do tecido fibroso, que caracteriza uma reação inflamatória aguda ou crônica. O fato presenciado no grupo controle deste experimento pode ser devido ao processo inflamatório da ferida cirúrgica alterando a cápsula articular.

Observou-se aderência da cápsula articular em três (25%) animais do GT2, e em um (8,33%) do GT1, no GC1 em três (25%) e no GC2 em dois (16,66%) coelhos. As principais estruturas envolvidas no processo na união foram o implante osteocondral alógeno e os côndilos femorais laterais. Foi descrito por VELLOSO (2005) que a aderência resulta da deposição de fibrina após episódio inflamatório de trauma ou de manipulação cirúrgica, podendo acarretar redução do movimento articular. Aderências podem ocorrer também entre o tecido sinovial e a superfície articular, a este estado patológico de uma articulação com aderências denomina-se artrofibrose. Este fato ocorreu como foi descrito, possivelmente, devido à manipulação dos tecidos da área cirurgiada.

Nos coelhos do GC verificou-se formação de osteófitos periarticulares, e também foi notado em um (8,33%) animal presença de luxação patelar medial de grau 4. Nas áreas livres de sobrecarga ocorre o crescimento exacerbado ósseo e cartila-

ginoso, caracterizando o osteófito. A forma e a posição do osteófito dependem do grau de instabilidade e da extensão da subluxação. O desenvolvimento ocorre através da ossificação endocondral que ocorre por penetração vascular na cartilagem existente ou por focos de metaplasia cartilaginosa nas margens articulares onde existem inserções ligamentares e capsulares, o que caracteriza as zonas de tensão (BULLOUGH, 2003).

Formação de calo ósseo foi observada em dois (16,66%) animais do GT com a rhBMP-2, sendo um (8,33%) do GT1 e outro (8,33%) do GT2. A formação do calo plástico três semanas após a colocação do enxerto, entre as lacunas do enxerto-leito receptor, tornam-se celular, vascularizado e com diminuição da movimentação do fragmento ósseo (CORNELL, LANE, 1992). Os canais circulatórios medulares e periosteais proliferam muito, sendo o sistema arterial medular essencial para a formação do calo ósseo e o predomínio deste, amplia à medida que progride a fase de cicatrização (SOUZA, 2003). Com isso, verificou-se que no GT o processo de consolidação e reparação óssea foi realizado de modo efetivo, fato que pode ser justificado devido a administração intracapsular da rhBMP-2.

Durante a avaliação microscópica do GC corados com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Masson (TM), constatou-se em sete coelhos (58,3%) processos degenerativos da cartilagem do enxerto, dois (16,66%) de 45 dias e cinco (41,66%) de 90 dias do GC1 e GC2, respectivamente (Figura 2). Ainda foi observada em um (8,33%) do GC1 necrose focal da cartilagem do implante, e hemorragia. O processo degenerativo ou degradativo da cartilagem articular pode ter sido devido a causas primárias e secundárias, como doenças hereditárias, doenças endócrinas, desarranjos articulares e doenças inflamatórias (PELLETIER, MARTEL-PELLETIER, HOWELL, 2001). A técnica de enxerto osteocondral alógeno apresentou resultados satisfatórios, entretanto o êxito depende de retirada cautelosa do enxerto, posicionamento e fixação adequada do mesmo no leito receptor (CHANAMÉ, 2000). Possivelmente, no momento do assentamento do enxerto no local do defeito não ocorreu perfeita congruência entre o enxerto e a zona receptora, provocando um desarranjo articular após o processo cirúrgico.

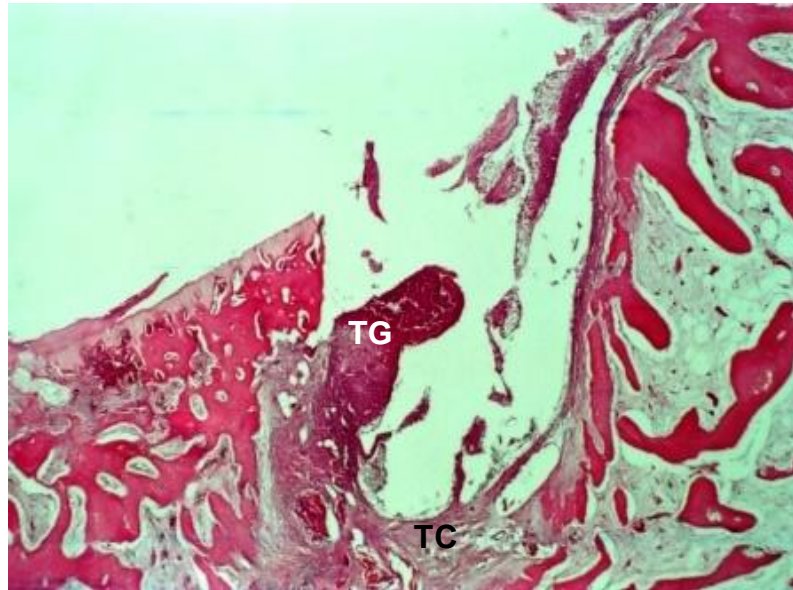


Figura 2. Fotomicrografia do implante osteocondral de coelho do GC aos 45 dias de PO. Observar após absorção do processo necrótico pelo organismo a formação de tecido conjuntivo (TC) e tecido de granulação (TG) e cicatrização na região de transição do enxerto com o sitio receptor. HE. (40X).

Entre as alterações observadas na cartilagem do enxerto em dois animais (16,66%) do GC ocorreram severa descamação seguida de necrose em quatro (33,3%) e reabsorção do osso subcondral, no entanto no GT nove (75%) houve formação de fissuras. Em três (25%) coelhos foram constatados descamação, em cinco (41,66%) apresentaram fragmentação da cartilagem com formação de lacunas, entretanto, não foi notado necrose, como pode ser observado na (Figura 3). Verificou-se também no grupo GT hipocelularidade em seis (50%), hiper celularidade em dois (16,66%) e empilhamento de condrócitos em nove (75%) coelhos. Esses processos degenerativos são constatados na fase inicial da osteoartrite, onde ocorre fibrilação e irregularidades da camada superficial da cartilagem articular, que pode se estender para as demais camadas com o aumento de microfissuras. O processo inicia no osso subcondral favorecendo a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios que atingem a cartilagem promovendo a degradação (MARTEL-PELLETIER, LAJEUNESSE, PELLETIER, 2005; GARSTANG, STITIK, 2006). Provavelmente ocorreu extravasamento de mediadores inflamatórios apesar da administração de anti-inflamatórios no pré e pós-cirúrgico.

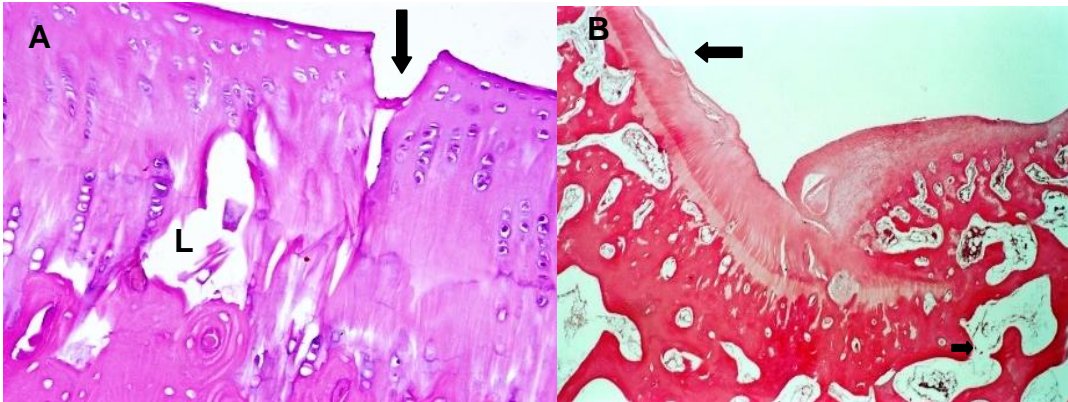


Figura 3. Fotomicrografia da cartilagem articular de coelhos (A e B). Observar que a cartilagem do grupo tratado (A) e grupo controle (B) presença de fissuras (setas) e lacunas(L). HE. (A= 400X; B= 40X).

Constatou-se depressão do enxerto em relação à cartilagem adjacente em doze (100%) animais, sendo nove (75%) no GT e no GC foram observados em três casos (25%). Em dois (16,66%) do GT1 tiveram sobrelevação. Também foi verificado por OLIVEIRA (2008) no reparo do sulco troclear de coelho, desnivelamento do enxerto osteocondral alógeno com relação à cartilagem adjacente em dois animais (16,66%) num total de 24, com a inoculação de proteína morfogenética óssea e células mononucleares da medula óssea. Neste experimento a causa provável da depressão do enxerto pode ser devido à pressão exercida pela patela que impulsionou o enxerto para dentro da cavidade receptora. Foi descrito por SOUZA, DEL CARLO, VILORIA (2001), que a camada mais superficial da cartilagem articular é rica em fibras colágenas, que são dispostas paralelamente à superfície articular. A provável etiologia da sobrelevação pode ser devida a aplicação da rhBMP-2 que pode ter contribuído para a ampliação na atividade da síntese de colágeno pelas células presentes no tecido de reparação.

A integração do enxerto à cartilagem adjacente não foi verificado em três (25%) animais do GT1 e em um (8,33%) do GT2. Integração em uma das extremidades notou-se nos coelhos C3 e C6 (16,66%) do GT1 e em cinco (41,65%) do GT2 e em ambas as extremidades apenas um (8,33%) do GT1. Verificou-se neste experimento a ocorrência variável de osteointegração entre o implante e o leito receptor. Fato que provavelmente, deve-se à instabilidade no local de enxertia durante a fase de reparação. Também, notou-se que na avaliação histológica do GT, a falha na adesão foi superior ao revelado na macroscopia, não correlacionando tais achados (RIBEIRO, CAMANHO, TAKITA, 2004).

Em dois (16,66%) coelhos do GT1 notou-se eburnação na cartilagem adjacente, ou seja, exposição do osso subcondral (Figura 4). Segundo ARRUDA (2010), os condrócitos podem multiplicar e constituir aglomerados celulares ocorrendo, a-crécimo de síntese da matriz como reparação tecidual. No entanto, na fase crônica as enzimas degenerativas excedem a capacidade sintética e o processo de reparação falha com o aumento da fibrilação e eburnação na superfície, as alterações tornam-se profundas no tecido, a cartilagem é corrompida e o osso subcondral manifesta-se espesso. Portanto, acredita-se que neste estudo o processo de reparação sofreu alteração resultando em processo degenerativo.

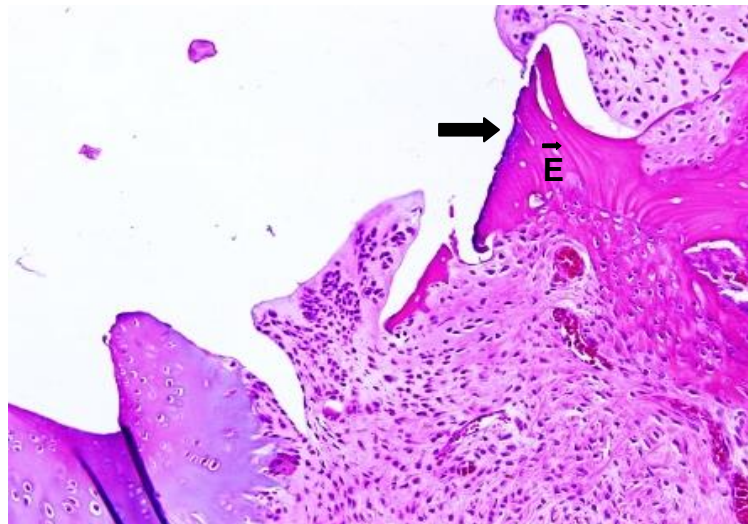


Figura 4. Fotomicrografia da área de transição entre o implante e o leito receptor de um coelho do GT1 de PO. Visualizar a destruição da cartilagem adjacente ao enxerto (seta) com presença de eburnação (E). HE. (200X).

Foi notado em cinco (41,66%) coelhos do GC redução da espessura da cartilagem do enxerto e um (8,33%) do GC2 não se visualizou a cartilagem sugerindo reabsorção e a área foi substituída por tecido conjuntivo fibroso. Entretanto, em dois (16,66%) houve aumento da espessura, já no GT apenas um (8,33%) houve acréscimo da cartilagem, e diminuição em sete (58,3%), porém, em todos os animais a cartilagem articular estava presente. Cartilagem quanto mais fina maior a predisposição a microfraturas e a aceleração da degeneração articular (SILVA, MONTANDON, CABRAL, 2008), ou quanto menor a capacidade de absorção de cargas na articulação (DEL CARLO et al., 2007). Foi observado por HAYAMI et al. (2006), que a instabilidade altera a resultante das forças que atuam sobre a superfície articular, tanto

na intensidade, quanto na área da carga. Podendo gerar mudanças profundas e progressivas na composição bioquímica e nas propriedades mecânicas da cartilagem articular resultando em alterações degenerativas, como a redução da espessura da cartilagem após dez semanas de experimento. Conforme BURR (2004), o espessamento é uma adaptação à alteração da biomecânica da articulação, a origem e distribuição de forças concentradas na região superficial da cartilagem articular. Portanto, tais fatos verificados neste trabalho podem ter sido devido à instabilidade da patela com relação ao enxerto promovendo estas alterações.

Na região do osso subcondral foi verificada rarefação óssea focal no GT1 em três coelhos (25%), e quatro (33,3%) no GT2 (Figura 5), no GC1 em apenas um (8,33%), e quatro (33,3%) do GC2. No GT1 cinco (41,66%) animais houve reabsorção óssea em seis 50% no GT2, no GC em quatro (33,3%) animais foram observados. A rejeição aos implantes ósseos é qualificada pela reabsorção da periferia do implante sem a substituição por tecido reparador, e pelo aumento de fraturas com posterior redução do diâmetro do implante. Assim como pela redução da reparação do implante, pela resposta inflamatória com predominância de linfócitos, pelo tecido fibroso encapsulando o implante, pela oclusão de neovasos com necrose progressiva e ainda pela dor, edema e vermelhidão (SINIBALDI et al., 1976; ROSSO et al., 1997). Embora tenha sido observado neste experimento tecido fibroso ao redor do implante, não foram notados sinais clínicos, macroscópicos ou histológicos de rejeição aos implantes ósseos.

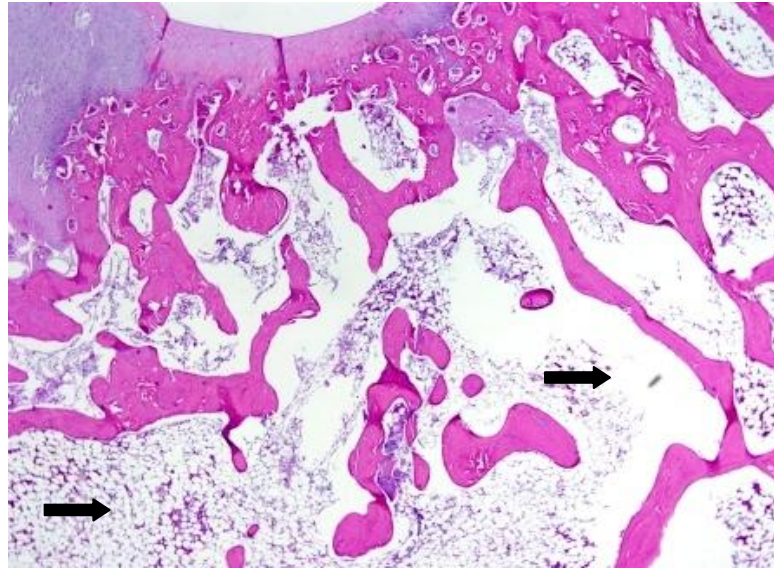


Figura 5. Fotomicrografia da região de reconstrução subcondral da área de transição entre o implante e o leito receptor. Notar rarefação óssea de coelho do grupo tratado de 90 dias de PO do GT2 (setas). HE. (40X).

Áreas com hipertrofia dos condrócitos, caracterizando ossificação endocondral foram observadas em todos os coelhos (50%) do GT2 e em apenas três (25%) do GT1. Conforme foi constatado por WANG et al. (1990) que a BMP-2 atua induzindo o processo de ossificação endocondral e no restabelecimento da consolidação óssea. O processo ocorre através de uma série de medidas que incluem a inflamação, formação de fibrocartilagem, ossificação endocondral e remodelação final (JEONG, SANDHU, FARMER, 2005).

Considerando a capacidade biomecânica articular e o impacto de compressões, a reparação óssea favorece a integridade da cartilagem articular quando as forças a que é submetida superam a capacidade de atuação. Deve-se considerar ainda que o tecido fibrocartilaginoso de reparação não possua as mesmas características atribuídas devido à presença de proteoglicanos que são altamente viscosos e intensamente hidrofílicos. Até mesmo as propriedades coloidais extracelulares da matriz que são importantes para a rigidez e elasticidade da cartilagem (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004). As lesões nas superfícies articulares que incluam toda a cartilagem hialina, e que penetra também no osso subcondral, são reparadas a partir de células mesenquimais provenientes da medula óssea, havendo a formação de fibrocartilagem e cartilagem semelhante à hialina, com ou sem arquitetura típica da cartilagem articular normal (SOUZA, DEL CARLO, VILORIA, 2000). Neste experimento,

verificou a formação de fibrocartilagem na zona de transição nos coelhos do GT (Figura 6), com exceção de um (8,33%) do GT1, pode-se afirmar que o processo de reparação óssea ocorreu de forma adequada havendo formação de fibrocartilagem.

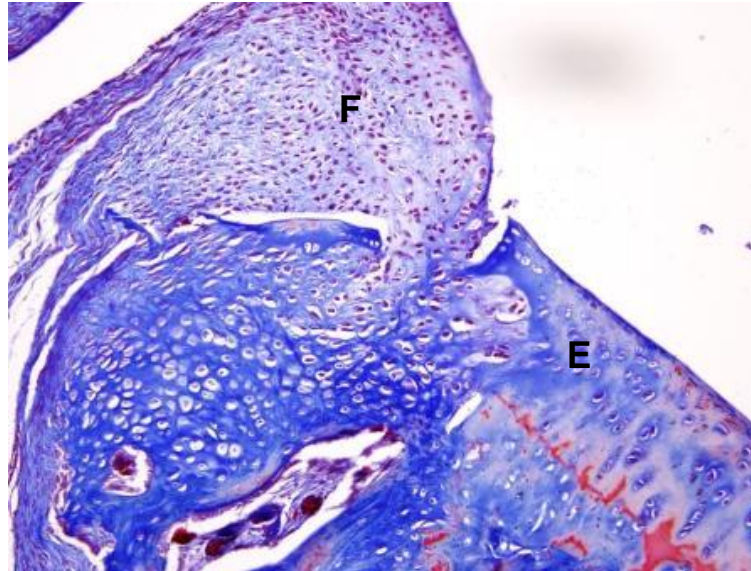


Figura 6. Fotomicrografia demonstrando a formação de fibrocartilagem (F) ao lado do implante (E) no coelho do grupo tratado de 45 dias de PO. TM (200X).

No GT1 foi visualizada a presença de tecido conjuntivo fibroso em dois (16,66%) animais no espaço subcondral e um (8,33%) na região da borda do implante leito-receptor. No GT2 em todos (50%) havia sido constatados sendo, dois (16,66%) localizados focalmente um crescimento sobre o enxerto (Figura 7), em outro (8,33%) tecido conjuntivo fibroso com infiltrado de células inflamatórias, e os demais (25%) sem constar característica marcante. QUEZINE, CARVALHO (2009) utilizando proteína morfogenética óssea observou tecido conjuntivo fibroso com neoformação de vasos e escassas áreas de tecido ósseo neoformado. Durante a implantação do enxerto osteocondral alógeno pode ter havido formação de fibrina em excesso sobre o enxerto, promovendo a ocorrência de tecido conjuntivo fibroso vascularizado em cima da cartilagem hialina. Fato também evidenciado por OLIVEIRA (2006) na terapia laser associada ao sulfato de condroitina e quitosana na reparação de defeito osteocondral da cabeça do úmero de cães e LIMONGE et al. (2007) na reparação de defeito osteocondral da cabeça do úmero de cães com aplicação de laser a diodo de arsenieto de gálio associado à administração oral de sulfato de condroitina.

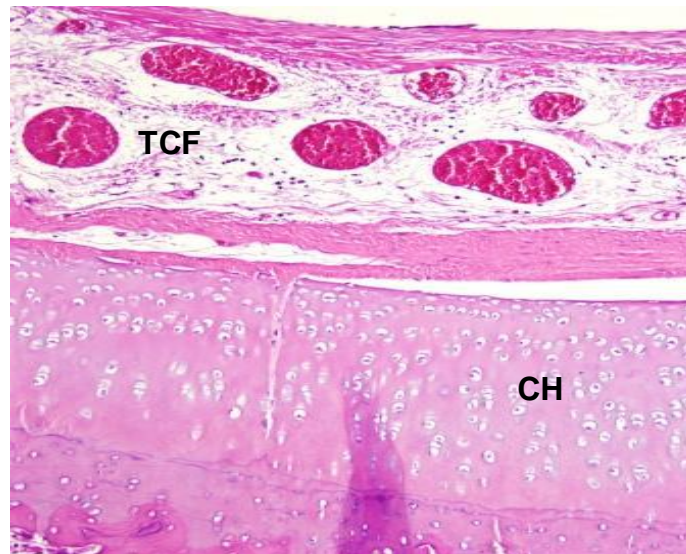


Figura 7. Fotomicrografia da região localizada na superfície da cartilagem hialina do enxerto, demonstrando a formação de tecido conjuntivo fibroso acima desta, possivelmente devido à formação de fibrina em excesso no grupo tratado (GT). HE. (200X).

Foi descrito por SHAPIRO, KOIDE, GLIMCHER (1993) que após o procedimento cirúrgico, a formação de coágulo sanguíneo, o qual é substituído por uma rede de fibrina, ocorre à proliferação de capilares a partir da medula óssea adjacente. As células mesenquimais invadem a periferia do coágulo, e se distribuem por todo o tecido de reparação. Na camada superficial acontece a formação de uma camada fibrosa, com fibras colágenas orientadas paralelamente a superfície articular. E na porção profunda, as células mesenquimais se diferenciam em condroblastos. À medida que advém a diferenciação celular, o tecido de reparação torna-se semelhante à cartilagem hialina. Em três (25%) animais do GT1 e do GT2 houve formação de cartilagem hialina na área de transição implante leito receptor, sendo que em um (8,33%) do GT1 houve a formação no interior da junção do enxerto (Figura 8). Os resultados apresentados no grupo tratado demonstram que a rhBMP-2 atuou de modo osteoindutivo na reparação, por meio do recrutamento de células mesenquimais locais, contribuindo no processo reparativo.

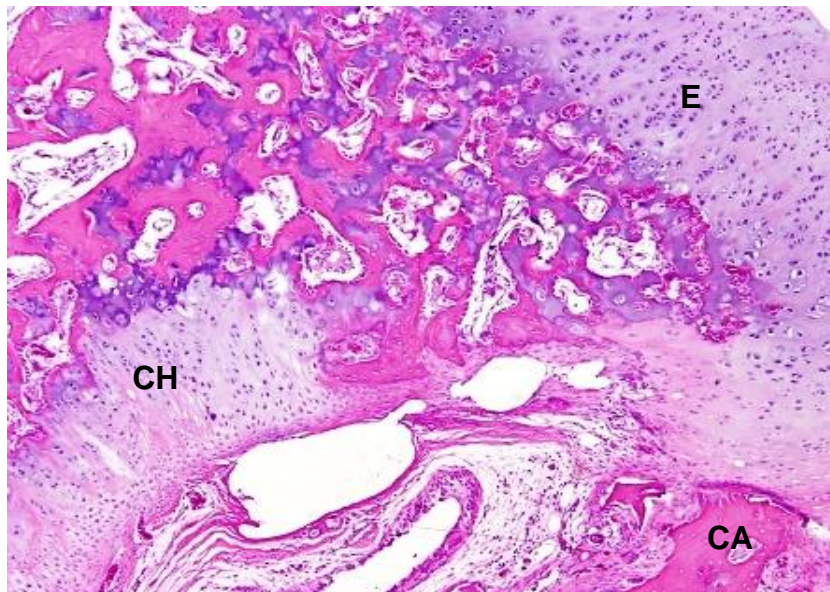


Figura 8. Fotomicrografia da área de transição de um coelho do GT1- 45 dias de PO. Observar o tecido semelhante à cartilagem hialina (CH) entre enxerto (E) e cartilagem adjacente (CA). HE. (100X).

Na avaliação histológica, os coelhos do GT evidenciaram melhores resultados no reparo ósseo e cartilaginoso quando observados aos do GC. Foi verificado em três (25%) coelhos do GT1 e em cinco (41,66%) do GT2 crescimento da cartilagem hialina em processo de ossificação. Sabendo-se que as células mesenquimais indiferenciadas migram para o local da implantação ocorrendo proliferação, os condrócitos se hipertrofiam e a cartilagem torna-se calcificada após um período de sete dias da BMP inoculada (WANG et al., 1990). Pode-se afirmar que a rhBMP-2 atuou de forma efetiva no restabelecimento da consolidação óssea.

Constatou-se no GC a presença de infiltrados inflamatórios polimorfonucleares em três coelhos (25%) e mononucleares em dois (16,67%) e piócitos em trabéculas ósseas em apenas um animal (8,33%), caracterizando osteomielite. Em GC 45 dias de PO somente um coelho evidenciou concomitante infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares com predominância de células mononucleares (plasmócitos). No GT a inflamação foi considerada leve constituída por macrófagos e células gigantes multinucleares com ausência de piócitos. Considerando-se um esquema de avaliação da inflamação na região subcondral variando de nenhuma, leve, moderada e intensa. Entretanto, a glicerina como meio de conservação de enxertos e membranas biológicas reduz a antigenicidade, além das propriedades antibacteriana e antifúngica (DALECK et al., 1992). Contudo, MELO et al. (1998) avaliaram a-

loenxertos ósseos conservados em glicerina e notaram o crescimento de *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus* spp em 21,4% amostras de segmentos ósseos. Possivelmente, neste trabalho, a contaminação pode ser atribuída ao procedimento cirúrgico ou a glicerina não extinguiu as bactérias presentes nos enxertos.

V. CONCLUSÃO

O reparo do sulco troclear de coelhos com enxerto alógeno conservado em glicerina a 98%, associado à inoculação intra-articular da rhBMP-2, ocasiona satisfatório reparo ósseo e cartilaginoso após 45 e 90 dias de pós-operatório, quando comparado aos animais do grupo controle.

VI. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.W. Bone grafting. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, V.17, n.4, p.811-819, 1987.

AMENDOLA, G.F.; ILHA, M.; BERGER, R.; STEDILE, R.; SCHOSSLER, J.E. Correção de defeito ósseo femoral em cães utilizando implante cortical homólogo conservado em mel. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.4, p.302-307, 2003.

AMENDOLA, G.F.; RAISER, A.G.; SOARES, J.M.D.; BECKMANN, D.V. Aspectos biomecânicos compressivos de diáfises femorais caninos conservadas em glicerina a 98% ou em mel. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1341-1345, 2008.

AMIEL, D.; COUTSS, R.D.; ABEL, M.; STEWART, W.; HARWOOD, F.; AKESON, W.H. Rib perichondrial grafts for the repair of full-thickness articular cartilage defects. A morphological and biochemical study in rabbits. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.67-A, n.6, p. 911-920, 1985.

ANGEL, J.; RAZZANO, P.; GRANDE, D. Defining the challenge: the basic science of articular cartilage repair and response to injury. **Sports Medicine & Arthroscopy Review**, v.11, n.3, p.168-181, 2003.

ARRUDA, M.F. **Resposta imuno bioquímica e avaliação histológica da cartilagem articular de ratos artrose induzidos, frente ao tratamento com iontoforese isolada e de ácido L-ascórbico**. 2010. 110f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas a Farmácia) _ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho"-UNESP. Araraquara, São Paulo.

BARROS, L.F.M.; MACHADO, T.F.S.; FERRAZ, V.M.; FERRIGNO, C.R.A. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs): modo de ação, aplicação e carreadores. **Ciência Veterinária dos Trópicos**, v.9, n.1, p.1-8, 2006.

BATISTA, E.C.; CABRAL, R.P. **Enxertos alógenos: uma revisão de literatura**. 2008. 35f. Tese (Especialista) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.

BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.371, p.10-27, 2000.

BESSHO, K.; KONISHI, Y.; KAIHARA, S.; FUJIMURA, K.; OKUBO, Y.; LIZUKA, T. Bone induction by Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. **British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v.38, p.645-649, 2000.

BIASE, F.; RAHAL, S.C.; LOPES, R.S. Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.563-567, 2001.

BLEUMING, S.A.; HE, X.C.; KODACH, L.L.; HARDWICK, J.C.; KOOPMAN, F.A.; TEN KATE, F.J.; VAN DEVENTER, S.J.H.; HOMMES, D.W.; PEPPELENBOSCH, M.P.; OFFERHAUS, G.J.; LI, L.; VAN DER BRINK, G.R. Bone morphogenetic protein signaling suppresses tumorigenesis at gastric epithelial transition zones in mice. **Cancer Research**, v.67, n.17, p.8149-8155, 2007.

BRINKER, W.O.; PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. São Paulo: Manole, cap. 20, p.324-333, 1986.

BUARQUE DE HOLANDA, J.P.; FERRETTI, M.; QUARTEIRO, M.L.; AMARO, J.T.; COHEN, M. Transplante osteocondral autólogo no tratamento de lesões osteocondrais em atletas. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.18, n.6, p.349-352, 2010.

BUCKWALTER, J.A. Articular cartilage: injuries and potential for healing. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v.28, n.4, p.192-202, 1998.

BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J. Articular cartilage. Part I: tissue design and chondrocyte matrix interactions. **Journal Bone and Joint Surgery**, v.79-A, n.4, p.600-611, 1997.

BUCKWALTER, J.A.; EINHORN, T.A.; SIMON, S.R. Orthopaedic basic science: biology and biomechanics of the musculoskeletal system. **American Academy of Orthopaedic Surgeons**. 2nd Edition. 2000. 873p.

BULLOUGH, P.G. **Pathology of osteoarthritis**. In: HOCHBERG, M.C.; SILMAN, A.J.; SMOLEN, J.S.; WEINBLATT, M.E.; WEISMAN, M.H. Rheumatology. 3.ed. London: Mosby, p.1835-1845, 2003.

BURR, D.B. Anatomia e fisiologia dos tecidos mineralizados: papel na patogênese da osteoartrose. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.12, suppl.1, p.20-30, 2004.

CANALIS, E.; ECONOMIDES, A.N.; GAZZERRO, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. **Endocrine Reviews**, v.24, n.2, p.218-235, 2003.

CAVASSANI, M.M.; MORAES, J.R.E.; PADILHA FILHO, J.G. Função osteoindutora de fragmentos ósseos conservados em glicerina a 98% estudo experimental em ratos. **Ciência rural**, v.31, n.3, p.445-448, 2001.

CHANAMÉ, L.A.S.R. **Enxerto autólogo de cartilagem em defeitos osteocondrais do côndilo femoral: estudo experimental em cães**. 2000. 48f. (Dissertação-Mestrado) – Programa de Mestrado Interinstitucional em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná e FURB, Curitiba, Paraná.

CHEN, D.; ZHAO, M.; HARRIS, S.E.; MI, Z. Signal transduction and biological function of bone morphogenetic proteins. **Frontiers in Bioscience**, v.9, p.349-358, 2004.

CHENG, H.; JIANG, W.; HAYDON, R.C.; PENG, Y.; ZHOW, L.; LUU, H.H.; AN, N.; BREYER, B.; VANICHAKAM, P.; SZATKOWSKI, J.P.; PARK, J.Y.; HE, T-C. Atividade osteogênica dos quatorze tipos de proteínas morfogenéticas ósseas humanas (BMPs). **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.85, p.1544-1552, 2003.

CIANI, R.B.; RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; TAGA, R.; GRANJEIRO, J.M.; CESTARI, T.M.; MAMPRIM, M.J. Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p.59-67, 2006.

CORNELL, C.N.; LANE, J.M. Newest factors in fracture healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.277, p.297-311, 1992.

CRMV-MG. Eutanásia: resolução do CFMV institui normas e procedimentos para eutanásia em animais. **Veterinária e Zootecnia em Minas Gerais**, v.17, n.75, p.25, 2002.

DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G.; DALECK, C.L.M.; COSTA NETO, J.M.; ALLESSI, A.C. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v.22, n.2, p.179-183, 1992.

DAMASCENO, M.L.; FERREIRA, T.F.; D'ELIA, C.O.; DEMONGE, M.K.; PÉCORA, J.R.; HERNANDEZ, A.J.; CAMANHO, G.L.; CROCI, A.T.; SANTOS, L.A.U.; HELITO, C.P. A utilização de enxerto alógeno nas reconstruções ligamentares do joelho. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.17, n.5, p.265-268, 2009.

DAVIDSON, P.A.; RIVENBURGH, D.W.; DAWSON, P.E.; ROZIN, R. Clinical, histologic, and radiographic outcomes of distal femoral resurfacing with hypothermically stored osteoarticular allografts. **The American Journal of Sports Medicine**, v.35, n.7, p. 1082-1090, 2007.

DE BIASE, P.; CAPANNA, R. Bone morphogenetic proteins and growth factors: emerging role in regenerative orthopaedic surgery. **Journal of Orthopaedics Traumatology**, v.8, n.1, p.43-48, 2007.

DEL CARLO, R.J.; GALVÃO, M.R.; VILORIA, M.I.V.; NATALI, A.J.; BARBOSA, A.L.T.; MONTEIRO, B.S.; PINHEIRO, L.C.P. Imobilização prolongada e remobiliza-

ção da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos: estudo clínico e microscópico. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.59, n.2, p.363-370, 2007.

DELLA NINA, M.I.; SCHMAEDECKE, A.; ROMANO, L.; FERRIGNO, C.R.A. Comparação de osteossíntese com placa e osteossíntese com placa associada a enxerto de proteína morfogenética óssea em fratura bilateral distal de rádio e ulna em cão – relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.4, p.297-303, 2007.

DINGEE, F. **Análise da influência dos tratamentos de liofilização, esterilização e rehidratação nas propriedades mecânicas do osso cortical bovino**. 2005. 53f. Monografia (Graduação em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Florianópolis, Santa Catarina.

DUELAND, R.T.; Cryopreserved intercalary bone allografts: early experience (1975-1980) in eight canine cases. **The Journal of the American Animal Hospital Association**, v.25, n.3, p.305-316, 1989.

EKELUND, A.; BROJÓ, O.; NILSSON, O.S. Experimental induction of heterotopic bone. **Clinical Orthopaedics Related Research**, v.263, p.102-112, 1991.

GARSTANG, S.V.; STITIK, T.P. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. **American Journal of Physical Medicine Rehabilitation**, v.85 suppl. 11, p.s2-11, 2006.

GAUTSCHI, O.P.; FREY, S.P.; ZELLWEGGER, R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. **ANZ Journal of Surgery**, v.77, n.8, p. 626-631, 2007.

GIOSSO, M.A.; BENITES, N.R.; KÄMPF, G. Análise microbiológica de ossos de cães conservados por longo período de tempo na glicerina a 98% à temperatura ambiente, objetivando a enxertia óssea. **Acta Cirúrgica brasileira**, v.17, n.4, p.242-246, 2002.

GOBBI, R.G.; DEMONGE, M.K.; BARRETO, R.B.; PÉCOR, J.R.; REZENDE, M.U.; BARROS FILHO, T.E.P.; LOMBELLO, C.B. Transplante autólogo de condrócitos-Relato de três casos. **Revista Brasileira Ortopédica**, v.45, n.4, p. 449-456, 2010.

GONÇALVES, H.R.; HONDA, E.K.; ONO, N.K. Análise da incorporação do enxerto ósseo acetabular. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.38, n.4, p.149-160, 2003.

HANADA, K.; DENNIS, J.E.; CAPLAN, A.I. Stimulatory effect of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow- derived mesenchymal stem cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.12, n.10, p.1606-1614, 1997.

HAYAMI, T.; PICKARSKI, M.; GREGG, Y.A.; WESOLOWSKI, G.A.; RODAN, G.A.; DONG, L.T. Caracterização da cartilagem articular e alterações do osso subcondral em ratos transecção do ligamento cruzado anterior e modelos meniscoectomizados de osteoartrite. **Bone**, v.38, n.2, p.234-243, 2006.

INOUE, C.M.; FAGUNDES, D.J.; FALOPPA, F.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; FIGUEIREDO, A.S.; TAHA, M.O. Estudo morfológico da articulação do joelho de coelhos após a reparação de um defeito osteocondral. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p.403-409, 2002.

JANEWAY, C.A. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, p.549-557, 2002.

JEONG, G.K.; SANDHU, H.S.; FARMER, J. Bone morphogenic proteins: applications in spinal surgery. **Journal Hospital for Special Surgery HSS J**, v.1, n.1, p. 110-117, 2005.

JOHNSON, A.L.; SHOKRY, M.M.; STEIN, L.E. Preliminary study of ethylene oxide sterilization of full-thickness cortical allografts used in segmental femoral fracture repair. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, n.5, p.1050-1056, 1985.

JORGE, R.S. **Estudo imunoistoquímico da incorporação de enxerto alógeno com proteína morfogenética do osso-2 na mandíbula de rato**. 2004. 128f. Tese (Doutorado em Biologia Buco-Dental) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo.

JOYCE, M.E.; JINGUSHI, S.; BOLANDER, M.E. Transforming growth factor beta in the regulation of fracture repair. **Orthopedic Clinics of North America**, v.21, n.1, p.199-209, 1990.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 130p, 2004.

LAMMI, P.E.; LAMMI, M.J.; TAMMI, R.H.; HELMINEN, H.J.; ESPANHA, M.M. Strong hyaluronan expression expression in the full-thickness rat articular cartilage repair tissue. **Histochemistry and cell biology**, v.115, n.4, p.301-308, 2001.

LI, R.H.; WOSNEY, J.M. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. **Trends in Biotechnology**, v.19, n.7, p.255-265, 2001.

LIMONGE, C.R.; DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; RODRIGUES, C.B.S.; DEL CARLO, K.N. Estudo microscópico da reparação de defeito osteocondral experimental da cabeça do úmero de cães após aplicação de laser a diodo de arsenieto de gálio (As-Ga) associado à administração oral de sulfato de condroitina. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.25, n.4, p.385-390, 2007.

LIPOWITZ, A.J. Degenerative Joint Disease. In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**, Philadelphia: Saunders, v.2, cap. 143, p.1921-1927, 1993.

MACEDO, C.A.S.; GALIA, C.R.; SILVA, A.L.B.; CÉSAR, P.C.; SANCHES, P.R.S.; DUARTE, L.S.; MÜLLER, L.M. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.34, n.9/10, p.529-534, 1999.

MARIE, P.J. Effects of bone morphogenetic proteins on cells of the osteoblastic lineage. **Journal Cell Engineering**, [s1], n.2, p. 92-99, 1997.

MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J.P. **Etiopatogenesis of osteoarthritis**. 15.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.2199-2226, 2005.

MARTINEZ, S.A.; WALKER, T. Bone grafts. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.29, n.5, p. 1207-1219, 1999.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara S.A., 235p, 1988.

MELO, E.G.; REZENDE, C.M.F.; BORGES, A.P.B. NOBREGA NETO, P.I. Aloenxerto ósseo cortical: avaliação do seu emprego em tibia de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.4, p.385-394, 1998.

MILLIS, D.L.; MARTINEZ, S.A. Bone grafts. In:_____.SLATTER, D. **Small animal surgery**. 3ed. Philadelphia: Saunders, cap.133, p. 1875-1891, 2003.

MINAMIDE, A.; KAWAKAMI, M.; HASHIZUME, H.; SAKATA, R.; TAMAKI, T. Evaluation of carries of bone morphogenetic protein for spinal fusion. **Spine**, v.26, n.8, p. 933-939, 2001.

MINAS, T.; NEHRER, S. Current Concepts in the Treatment of Articular Cartilage Defects. **Orthopedics**, v.20, n.6, p.525-538, 1997.

MITHOEFER, K.; WILLIAMS, R.J.; WARREN, R.F.; POTTER, H.G.; SPOCK, C.R.; JONES, E.C.; WICKIEWICZ, T.L.; MARX, R.G. Revestimento condral de defeitos da cartilagem articular no joelho com a técnica de microfratura. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.88, suppl.1, p.294-304, 2006.

NIEDERWANGER, M.; URIST, M.R. Matriz óssea desmineralizada fornecidos pelos bancos de ossos para uma transportadora da proteína óssea morfogenética recom-

binante humana (rhBMP-2) um substituto para os enxertos ósseos autógeno. **Journal of Oral Implantology**, v.22, n.3-4, p.210-215, 1996.

OCHI, M.; ADACHI, N.; NOBUTO, H.; YANADA, S.; ITO, Y.; AGUNG, M. Articular cartilage repair using tissue engineering technique--novel approach with minimally invasive procedure. **Artificial Organs**, v.28, n.1, p. 28-32, 2004.

ODDIS, C.V. News perspectives on osteoarthritis. **American Journal of Medicina**, v.100, n.6, suppl2A: p. 10s-15s, 1996.

OLIVEIRA, B. J. N. **Enxerto osteocondral alógeno, associado á inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelho**. 2008. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais. Disponível em: <http://www.btdtd.ufu.br//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2303>. Acesso em: Fev. 2011.

OLIVEIRA, C.R.L. **Terapia laser de baixa potência ($\lambda= 904\text{nm}$) associada ao sulfato de condroitina e quitosana na reparação de defeito osteocondral experimental da cabeça do úmero de cães. Estudo histopatológico**. 2006. 29f. Tese (“Magister Scientiae” em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. Disponível em: http://www.tede.ufv.br/tesesimplificado/tde_arquivos/8/TDE-2006-12-12T092015Z-140/Publico/texto%20completo.pdf. Acesso em Fev. 2011.

PACHECO, C.R.; CAMPOLI, M.A.; GOMES, S.S.R.; SIMAMOTO JÚNIOR, P.C.; FERNANDES NETO, A.J. Implantes dentários recobertos com proteína morfogenética óssea recombinante humana tipo-2. **Revista Gaúcha Odontológica**, v.58, n.3, p.333-337, 2010.

PELLETIER, J.P.; MARTEL-PELLETIER, J.; HOWELL, D.S. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: KOOPMAN W.J. **Arthritis and allied conditions**. 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, p.2195-2215, 2001.

PETERSON, L.; MINAS, T.; BRITTIBERG, M.; NILSSON, A.; SJÖGREN-JANSSON, E.; LINDAHL, A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.374, p. 212-234, 2000.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. Bone Grafting. In:_____. **Small animal orthopedics and fracture repair**. 3.ed., Philadelphia: Saunders, cap.3, p.147-153, 1997.

PIGOSSI, N. **Implantação de dura-máter homóloga conservada em glicerina. Estudo experimental em cães**. 1964. 92f. Tese (Doutorado em cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

PIGOSSI, N. **Glicerina na conservação de dura-máter. Estudo experimental**. 1967. 83f. Tese (Livre docência em cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

PINTO JÚNIOR, H.S. **Utilização de enxerto ósseo cortical homólogo preservado em tintura de iodo a 2% na reparação de fraturas cominutivas de ossos longos em cães**. 1995. 75f. [Tese – Doutorado] - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, SP.

QUEZINI, S.G.; CARVALHO, P.T.C. Ação do laser de baixa potência sobre proteínas morfogenéticas em defeitos ósseos. **ConScientiae Saúde**, v.8, n.4, p.549-557, 2009.

REDDI, A.H.; REDDI, A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v.20, n.5/6, p.341-342, 2009.

REY, L. **Dicionário de termos técnicos de medicina e saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.413, 2003.

RIBEIRO, J.L.; CAMANHO, G.L.; TAKITA, L.C. Estudo macroscópico e histológico de reparos osteocondrais biologicamente aceitáveis. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.12, n.1, p.16-21, 2004.

ROSSO, R.; SCHÄFER, D.; FRICKER, R.; BREENWALS, J.; JUNDT, G.; SPAGNOLI, G.; HARDER, F.; HEBERER, M. Functional and morphological outcome of knee joint transplantation in dogs depend on control of rejection. **Transplantation**, v.63, n.12, p.1723-1733, 1997.

SAMPAIO, R.L.; LACERDA, M.S.; OLIVEIRA, P.C.L.; PANETO, J.C.C.; BITTAR, E.R.; BORGES, G.A.; CAMACHO, G.M.M.; BRAGA, E.M. Variação da força de resistência à micro-tração de fragmentos de ossos corticais preservados em diversos meios e a fresco: estudo experimental em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.4, p.345-352, 2009.

SANTOS, A.A.; MIRANDA, C.D.O.; ALVES, M.T.S.; FALOPPA, F. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.13, n.4, p.194-195, 2005.

SELLARDS, R.A.; NHO, S.J.; COLE, B.J. Chondral injuries. **Current Opinion in Rheumatology**, v.14, p.134-141, 2002.

SHAPIRO, F.; KOIDE, S.; GLIMCHER, M.J. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.75-A, n.4, p.532-553, 1993.

SILVA, N.A.; MONTANDON, A.C.O.S.; CABRAL, M.V.S.P. Doenças osteoarticulares degenerativas periféricas. **Einstein**, v.6, supl.1, S21-S28, 2008.

SINIBALDI, K.; ROSEN, H.; LIU, S.K.; DEANGELIS, M. Tumors associated with metallic implants in animals. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.118, p.257-266, 1976.

SOUZA, T.D.; DEL CARLO, R.J.; VILORIA, M.I.V. Eletroterapia no processo de reparação da superfície articular de coelhos. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.819-824, 2001.

SOUZA, V.L. **Efeitos do ultra-som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (*Canis***

familiaris). 2003. 127f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10137/tde-01062004-153913/fr.php>>. Acesso em: Fev. 2011.

STEVENSON, S. Enxertamento ósseo. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Roca, cap.48, p. 758-819, 1996.

STEVENSON, S. Enxertos Ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos Animais**. 2.ed. v.2. São Paulo: Manole, p. 2006-2016, 1998.

STEVENSON, S. Enxertadura óssea. In: BOJRAB, J.M. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Roca, p.786-793, 2005.

SWEETMAN, S.C. **Martindale- the complete drug reference**. London: Pharmaceutical Production, p.1616-1617, 2002.

TORIUMI, D.M.; ROBERTSON, K. Bone inductive biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery. **Facial Plastic Surgery**, v.9, n.1, p. 29-36, 1993.

TRIPPEL, S.B.; MANKIN, H.J. Consolidação da cartilagem articular. In: BOJRAB, M.J.; SMEAK, D.D.; BLOOMBERG, M.S. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. São Paulo: Manole, p.829-846, 1996.

TSUMAKI, N.; YOSHIKAWA, H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v.16, n.3, p.279-285, 2005.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, n.3698, p. 893-899, 1965.'

URIST, M.R.; STRATES, B.S. Bone morphogenetic protein. **Journal of Dental Research**, v.50, n.6, p.1392-1406, 1971.

VALDES, M.A.; THAKUR, N.A.; NAMDARI, S.; CIOMBOR, D.M.; PALUMBO, M. Recombinant bone morphogenetic protein-2 in orthopaedic surgery: a review. **Archives of orthopaedic and trauma surgery**, v.129, n.12, p.1651-1657, 2009.

VELLOSO, G.R. Rigidez articular. **Universitas Ciências da Saúde**, v.3, n.1, p.141-144, 2005.

VELLUTINI, W.C. Envelhecimento e degeneração da cartilagem articular. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.5, n.1, p. 01-04, 1997.

ZHANG, W.; MOSKOWITZ, R.W.; NUKI, G.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R.D.; ARDEN, N.; BIERMA-ZEINSTRAS, S.; BRANDT, K.D.; CROFT, P.; DOHERTY, M.; DOUGADOS, M.; HOCHBERG, HUNTER, D.J.; KWOH, K.; LOHMANDER, L.S.; TUQUWELL. OARSI recomendações para a gestão de osteoartrite do quadril e joelho, Parte II: OARSI baseada em evidências, diretrizes consenso entre os especialistas. **Osteoarthritis Cartilage**, v.16, n.2, p.137-162, 2008.

ZILIO, L.; DALECK, C.R.; PADILHA FILHO, J.G.; SOUZA, A.P.; FANTINATTI, A.P.; DINIZ, P.P.V.P. Utilização de implante ósseo cortical alógeno conservado em glicerina para preservação de membro torácico. Estudo experimental em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.2, p.107-115, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/acb/v18n2/15194.pdf>>. Acesso em: 28 fev.2011.

WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S.J.; YOUNG, R.G.; MANSOUR, J.M.; CAPLAN, A.; GOLDBERG, V.M. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.76, n.4, p.579-592, 1994.

WANG, E.A.; ROSEN, V.; D'ALESSANDRO, J.S.; BAUDUY, M.; CORDES, P.; HARADA, T.; ISRAEL, D.I.; HEWICK, R.M.; KERNS, K.M.; LAPAN, P.; LUXENBERG, D.P.; MCQUAID, D.; MOUTSATSOS, I.K.; NOVE, J.; WOSNEY, J.M. Recombinant human bone morphogenetic proteins induces bone formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.2220-2024, 1990.

WHITE, A.P.; VACCARO, A.R.; HALL, J.A.; WHANG, P.G.; FRIEL, B.C.; MCKEE, M.D. Clinical applications of BMP-7 /OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. **International Orthopaedics**, v. 31, p.735-741, 2007.

WOSNEY, J.M.; ROSEN, V.; CELESTE, A.J.; MITSOCK, L.M.; WHITTERS, M.J.; KRIZ, R.W.; HEWICK, R.M.; WANG, E.A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science**, v.242, n.4885, p.1528-1534, 1988.

APÊNDICE

A. Fontes de aquisição dos materiais da pesquisa

- ¹ Biotrat Iodopovidona. Solução degermante. LMFarma Ind. e Comércio. São José dos Campos, São Paulo, SP. Brasil.
- ² Álcool 70°. GL. Minasúcar. Santa Rosa de Viterbo, São Paulo, SP. Brasil.
- ³ Iodopovidona. Geyer Medicamentos. Porto Alegre, RS. Brasil.
- ⁴ Paquímetro graduado. Produzido por Worker distribuído por FNCL. Brasil.
- ⁵ Lâmina de bisturi nº 10. Cirúrgica Passos. Curitiba, PR. Brasil.
- ⁶ Dremel. Importado por Robert Bosch. Campinas, SP. Brasil.
- ⁷ Cloreto de Sódio 0,9%. Sanobiol. Pouso Alegre, MG. Brasil.
- ⁸ Glicerina 98%. Indústria Rioquímica, São José do Rio Preto, SP. Brasil.
- ⁹ Ração para coelhos Coelho. BN & F Agronegócios. Uberlândia, MG. Brasil.
- ¹⁰ Ivermectina 1%. Merial. Campinas, SP. Brasil.
- ¹¹ Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. Gibco. Invitrogen. São Paulo, SP. Brasil.
- ¹² Cetamin. Syntec. Patrocínio Paulista, SP. Brasil.
- ¹³ Cloreto de xilazina. Virbaxyl. Virbac Saúde Animal. Jurubatuba, SP. Brasil.
- ¹⁴ Tramal. União Química Farmacêutica Nacional. Pouso Alegre, MG. Brasil.
- ¹⁵ Banamine. Injetável. Schering-Plough Saúde Animal Indústria e Comércio. Cotia, SP. Brasil
- ¹⁶ Ceftiofur. Pfizer Saúde Animal. Belo Horizonte, MG. Brasil.
- ¹⁷ Capela de fluxo laminar. Lupe Indústria e Comércio. São Paulo, SP. Brasil.
- ¹⁸ Ácido acético. Casquímica Produtos Químicos. Diadema, SP. Brasil.
- ¹⁹ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²⁰ Fetal Bovine Serum. Gibco. Invitrogen Brasil. São Paulo, SP. Brasil.
- ²¹ Eppendorf. CRAL artigos para laboratórios. Cotia, SP, Brasil.
- ²² Vicryl 4-0. Ethicon. São Paulo, SP. Brasil.
- ²³ Nylon 3-0. Polysuture Indústria e Comércio. São Sebastião do Paraíso, MG. Brasil.
- ²⁴ Rifocina spray. Hoechst Marion Roussel. Suzano, SP. Brasil.
- ²⁵ Tiopental sódico 2,5%. Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos. Campinas, SP. Brasil.
- ²⁶ Cloreto de potássio 10%. Darrow Laboratórios S.A. Rio de Janeiro, RJ. Brasil.
- ²⁷ Formol 10%. Start Química. Uberlândia, MG. Brasil.
- ²⁸ Ácido Nítrico. SPLabor equipamentos para laboratórios. Prudente, SP. Brasil.
- ²⁹ Álcool Absoluto. Indústria e Comércio Engarrafadora de Álcool Absoluto. Dois Córregos, SP. Brasil.
- ³⁰ Xilol. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ³¹ Hematoxilina-Eosina. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil
- ³² Tricrômio Mallory. Interlab distribuidora de produtos científicos. São Paulo, SP. Brasil.
- ³³ Microscópio de luz Olympus DP-71. New York microscope Company Inc. DBA YScopes. Com. Hicksville, New York. EUA.