

AMANDA SILVEIRA DENADAI

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA
SOBRE A AÇÃO DAS PROTEÍNAS MORFOGÊNICAS ÓSSEAS (BMP) EM
DEFEITOS ÓSSEOS PROVOCADOS EM RATOS WISTAR.**

Campo Grande
2008

AMANDA SILVEIRA DENADAI

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA
SOBRE A AÇÃO DAS PROTEÍNAS MORFOGÊNICAS ÓSSEAS (BMP) EM
DEFEITOS ÓSSEOS PROVOCADOS EM RATOS WISTAR.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste –
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul -
UFMS, para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Tecnologia e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de
Carvalho

Campo Grande

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA SILVEIRA DENADAI

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste –
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
- UFMS, para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Tecnologia e Saúde

Aprovado em: 20 de Fevereiro de 2008-03-13

Banca Examinadora

Profº Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho

Instituição: UFMS

Assinatura: _____

Profª Drª Iandara Schettert Silva

Instituição: UFMS

Assinatura: _____

Profª Drª Doroty Mesquita Dourado

Instituição: UNIDERP

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico a meu pai

José Marcio Denadai (in memorian),

que lá do céu ilumina meu caminho.

*Torce e me empurra para realizar todos meus
sonhos e objetivos, que de alguma maneira em vida,
sonhou junto comigo e acreditou que eu conseguiria.*

Pai este sonho eu realizei.

Obrigado !!!

Agradecimentos

A minha **mãe Sandra**, que da maneira dela me estimulou, me encorajou e me apoiou nos momentos difíceis.

A minha **sobrinha Gaby (magrela)**, que por vezes derrubou todas as minhas folhas tirando-as de ordem enquanto eu tentava me organizar. Que me tirou do trabalho para jogar ou para levar ela pra lancha. Se não fosse sua alegria magrela eu não seria tão feliz.

A minha **sobrinha Paolla**, que mesmo sem entender nada, consegue me fazer tentar ser tão corajosa quanto ela, que tão pequenininha já passa por algumas provas e venceu todas até agora. Mesmo tendo riscado muitos artigos você também me ajudou.

A minha **irmã Arielle** que não desmarca nenhum compromisso social para me fazer companhia, mas se eu precisasse relaxar era com ela mesmo que eu podia contar. Valeu pelo apoio.

A minha **irmã Adriana** e **meu cunhado Renato** que entre encontros e desencontros sempre me impulsionaram para cima.

A meu **namorado João Paulo** que sempre falava que estudaria enquanto eu escrevia meu trabalho e depois de quinze minutos só fazia me atrapalhar com seu leve ronco, que há três anos não me deixa desistir de nada que eu começo, mesmo quando a tarefa é a mais árdua possível, se não fosse seu apoio eu não conseguiria. Obrigado pelas vezes que entendeu que não poderíamos nos ver ou sair, pois eu tinha que fazer as “coisas do meu mestrado” valeu pela compreensão. Gordo você é meu ponto de apoio, meu porto seguro, Te Amo Muito!!!!

Ao meu **orientador Prof. Drº Paulo de Tarso Camillo de Carvalho**, que desde o dia que fui procurá-lo expressando minha vontade de iniciar o mestrado, me

deu força e me encorajou a tentar, e durante a execução deste trabalho esteve sempre compartilhando comigo sua sabedoria, seus conhecimentos e sua habilidade no meio científico. Muito obrigado por acreditar em mim.

A **Profª Drª Iandara Schettert Silva** que despendeu tempo e paciência para auxiliar nos procedimentos cirúrgicos.

A **Profª Drª Doroty Mesquita Dourado** pelo auxílio na confecção e leitura das lâminas.

Ao **Profº Ms. Sérgio Pacheco Oliveira Júnior** que nos cedeu alguns equipamentos utilizados no experimento e por nos ajudar na confecção das fotos.

Ao **Profº e colega de mestrado Daniel Martins**, pela ajuda na execução da análise estatística.

Aos colegas de mestrado que com muito jogo de cintura e bom humor conseguimos realizar todos os créditos. Conseguimos cumprir mais esta etapa.

Aos funcionários do biotério e do laboratório de pesquisa da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, pela cooperação durante os meus procedimentos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste que com extremo profissionalismo, ética e inteligência se empenharam em nos ensinar e instruir para a confecção dos trabalhos, tanto no período de aulas como no período de elaboração do trabalho final.

E agradeço a Deus, pois sem sua vontade nada acontece. Obrigado pela vida !!!!

RESUMO

As Proteínas Morfogenéticas do Osso (BMPs) são secretadas por moléculas sinalizadoras que pertencem a super família do Fator Transformador de Crescimento beta (TGF- β). O objetivo deste estudo foi verificar a ação do Laser de Baixa Potência AsGaAl 650nm sobre as BMPs no reparo de falhas ósseas induzidas no fêmur de ratos. A amostra experimental consistiu de 36 ratos machos, albinos de linhagem Wistar: que foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo 1: (n=12) Defeitos ósseos induzido e preenchidos com substância osteoindutora associada à aplicação de laser de baixa potência, denominado de grupo BMP+Laser; Grupo 2: (n=12) defeito ósseo induzido e preenchido com substância osteoindutora sem aplicação do laser de baixa potencia denominado de grupo sem Laser.; Grupo 3: (n=12), defeito ósseo induzido e sem nenhum tratamento, denominado de grupo controle. Realizou-se um defeito ósseo empregando brocas diamantadas. Nos grupos 1 e 2, o defeito foi preenchido com uma pasta formada por substância osteoindutora. Os animais foram tratados com o Laser GaAlAs (50mW), com densidade de energia de 4 joules/cm² e tempo de 80 segundos para uma área de 1cm². O grupo 3 foi adotado como grupo-controle. As amostras do osso foram retiradas para procedimento histológico e análise morfométrica nos 7°,14°e 28° dias de pós-operatório.Os resultados obtidos foram submetidos a analise estatística utilizando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, para a comparação intra e intergrupos em cada período. Utilizando como hipótese de nulidade $p < 0,05$. Na comparação entre G1, G2 e G3, observou-se diferença estatística entre todos os grupos sendo $p < 0.001$. Podemos concluir que a associação do laser com a substancia osteoindutora produziu resultados melhores que a utilização de BMPs de forma isolada.

Palavras-chaves: Laser de Baixa Intensidade, Remodelagem Óssea, Biomateriais, Proteína Morfogenética Óssea.

ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted signaling molecules belonging to the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily. The objective of this study was to analyze how GaAlAs 650nm laser influenced BMPs action on bone defects created in rat femurs. The sample consisted of 36 male albino Wistar rats – Group 1: (n=12) Bone defect filled with bone-inducing substance, with application of low-power laser; Group 2: (n=12) Bone defect filled with bone-inducing substance, without application of low-power laser and Group 3: (n=12) Bone defect without any treatment (control group). A bone defect was produced using drills. In Groups 1 and 2 defects were filled with a bone-inducing substance. Animals were treated with GaAlAs (50mW) laser, energy density 4 J/cm², for 80 seconds on a 1 cm² irradiated area. Groups 3 were used as control. Bone samples were removed for histological procedures and morphometric analysis on the 7th, 14th and 28st days after surgery. Results obtained were subjected to statistical analysis using Kruskal-Wallis post hoc test de Dunns. Rejection level for the nullity hypothesis was 0,05. On the comparison among G1, G2 and G3 could be observed statistical difference between Groups 1 and 3 (p < 0.001). We concluded that the association of low power laser with a bone-inducing substance produced better results than when low power laser or BMPs used alone.

Key words: Low Power Laser, Bone remodeling, Biomaterials, Bone Morphogenetic Proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Diagrama representativo das células componentes do tecido ósseo.....	16
Figura 2 -	Fases do processo de reparação óssea: 1 - formação do hematoma peri-fraturário; 2 – reação inflamatória com migração de células de defesa e início da formação óssea; 3 – proliferação de células de reparo ósseo e formação do calo ósseo; 4 – fase de remodelamento por meio dos osteoclastos.....	17
Figura 3 -	Diagrama da ação das proteínas morfogenéticas do osso no processo de reparação óssea.....	25
Figura 4 -	Representação celular, contendo mitocôndria e os citocromos.....	41
Figura 5 -	Figura representativa: A - incisão cirúrgica com exposição do osso do fêmur e início da confecção da falha óssea; B confecção da falha óssea utilizando broca multilaminada do tipo esférica nº 2; C - perfuração da cortical do osso até atingir o canal medular; D fêmur dissecado, onde observa-se a falha óssea produzida.....	53
Figura 6 -	Painel do laser – Laserline modelo Inova 50mw – 650nm de comprimento de onda.....	53
Figura 7 -	Figura representativa da tela do programa <i>Image Pro Plus</i> (versão 4.5), utilizado durante a análise morfométrica.....	54
Figura 8 -	Segmentação da imagem utilizando o programa <i>Image Pro Plus</i> (versão 4.5) para mensuração da neoformação óssea.....	54
Figura 9 -	Comparação dos valores de neoformação óssea, intra e intergrupos nos períodos de 7, 14 e 28 dias. Valores expressos em média e desvio padrão. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.....	57
Figura 10 -	Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) associado à aplicação de laser de baixa potência (BMP+Laser) aos 7 dias - observa-se à presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) com neoformação de vasos (V), e algumas escassas áreas de tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos (os). Barra de escala 20µm.....	58
Figura 11 -	Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) aos 7 dias - observa-se a presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) algumas escassas áreas de tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos (os). Barra de escala 20µm.....	59
Figura 12 -	Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo grupo controle aos 7 dias - observa-se à formação de tecido ósseo irregular. Barra de escala 20µm.....	59
Figura 13 -	Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) e aplicação de laser aos 14 dias - observa-se trabéculas ósseas neoformadas (T), numerosos osteoblastos alinhados em sua periferia, intensa presença de neovascularização. Barra de escala 20µm.....	60

Figura 14 - Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo sem preenchimento com BMP e aplicação de laser (Grupo Controle) aos 14 dias - observa-se presença de tecido fibroso (TCF), canal de havers e pequena proliferação de osteócitos. Barra de escala 20µm.....	61
Figura 15 - Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) e aplicação de laser aos 28 dias - observa-se presença de trabéculas ósseas (T) densas com aspecto de osso lamelar. Barra de escala 20µm.....	62
Figura 16 - Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) sem aplicação de laser aos 28 dias - observa-se a presença de tecido fibroso, neoformação de vasos e áreas de formação óssea irregular e trabéculas ósseas (T) Barra de escala 20µm.....	63
Figura 17 - Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo sem preenchimento com BMP e aplicação de laser (Grupo Controle) aos 28 dias - observa-se presença proliferação de células ósseas neoformadas ainda de forma irregular e trabéculas ósseas (T). Observar a diferença na formação de osso primário e secundário. Barra de escala 20µm.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da análise morfométrica dos 5 campos das 4 amostras dos grupos pesquisados em 7, 14 e 28 dias. Campo Grande - MS, 2007.....	56
Tabela 2 - Resultado das medias da análise morfométrica indicando a evolução da neoformação óssea ao longo dos 28 dias. Campo Grande – MS, 2007.....	56

Lista de Abreviaturas

BMP -	Proteína Morfogenética do Osso (Bone Morphogenetic Protein)
TGF- β -	Fator de Crescimento Beta Transformador
AsGaAl -	Arsenieto de Gálio e Alumínio
HeNe -	Hélio Neônio
LLLT -	<i>Low level Laser Therapy</i> (Laserterapia de Baixo Nível)
rhBMP -	Proteína Morfogenética do Osso Recombinante Humana
LASER -	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Luz Amplificada por Emissão Estimulada de Radiação)
ATP -	Trifosfato de Adenosina
OP -	Proteína Osteogênica
RPM -	Rotações por Minuto

Lista de Siglas

1. nm - Nanômetro
2. J/cm² - Joule por centímetro quadrado
3. pH - Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Revisão da Literatura	15
2.1 Tecido Ósseo	15
2.2 Neoformação Óssea	19
2.3 Problemas que são Encontrados na Cicatrização Óssea	21
2.4 Materiais Osteoindutivos	23
2.5 Proteínas Morfogenéticas do Osso (BMP)	24
2.6 Carreadores	37
2.7 Terapia do Laser de Baixa Intensidade	40
3. Objetivos	46
3.1 Objetivo Geral	46
4. Metodologia.....	47
4.1 Animais de Experimentação	47
4.2 Grupos Experimentais	48
4.3 Produção dos Defeitos Ósseos	48
4.4 Aplicação do Laser Diodo Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)	50
4.5 Eutanásia	50
4.6 Procedimentos Histológicos	50
4.7 Análise Morfométrica	51
4.8 Análise Histopatológica	51
4.9 Análise Estatística	51
5. Resultados.....	55
5.1 Análise Histopatológica	57
6. Discussão	64
7. Conclusão	70
8. Referências Bibliográficas	71
Anexo A	79
Anexo B	81
Anexo C	85

1. INTRODUÇÃO

Só nos Estados Unidos, estima-se que ocorram 5,6 milhões de fraturas por ano, sendo que 5% a 10% destas evoluem para retardo de consolidação ou pseudoartrose. Os gastos com tratamento de fraturas são raramente estudados, mas estes incluem cirurgias, pós-operatório, custos do paciente e licença do trabalho (LIRANI, 2004b).

Recentemente estudos na área da biologia molecular, a descoberta de novos biomateriais e a elucidação dos componentes reparadores, e sua capacidade de promover a diferenciação de células imaturas em células osteocompetentes, muito tem contribuído para consolidação dos resultados das técnicas empregadas em reparação óssea (KIRKER-HEAD, 1995).

A habilidade osteoindutora das Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) já foi demonstrada em uma grande variedade de espécies, com diversos carreadores, incluindo colágeno e polímeros, em sítios heterotópicos e ortotópicos. Entre as funções do carreador estão: o atraso, a rápida dispersão da BMP do local do implante e proteção contra lises não específicas (BAX *et al.*, 1999).

Paralelamente com a evolução em biotecnologia e ciências médicas, os lasers de baixa potência tornaram-se populares, e atualmente, surgindo como uma alternativa complementar não invasiva para a recuperação do tecido ósseo. O que pode ser comprovado pelos trabalhos de vários pesquisadores (DAVID *et al.*, 1996; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002; PINNHEIRO, 1997).

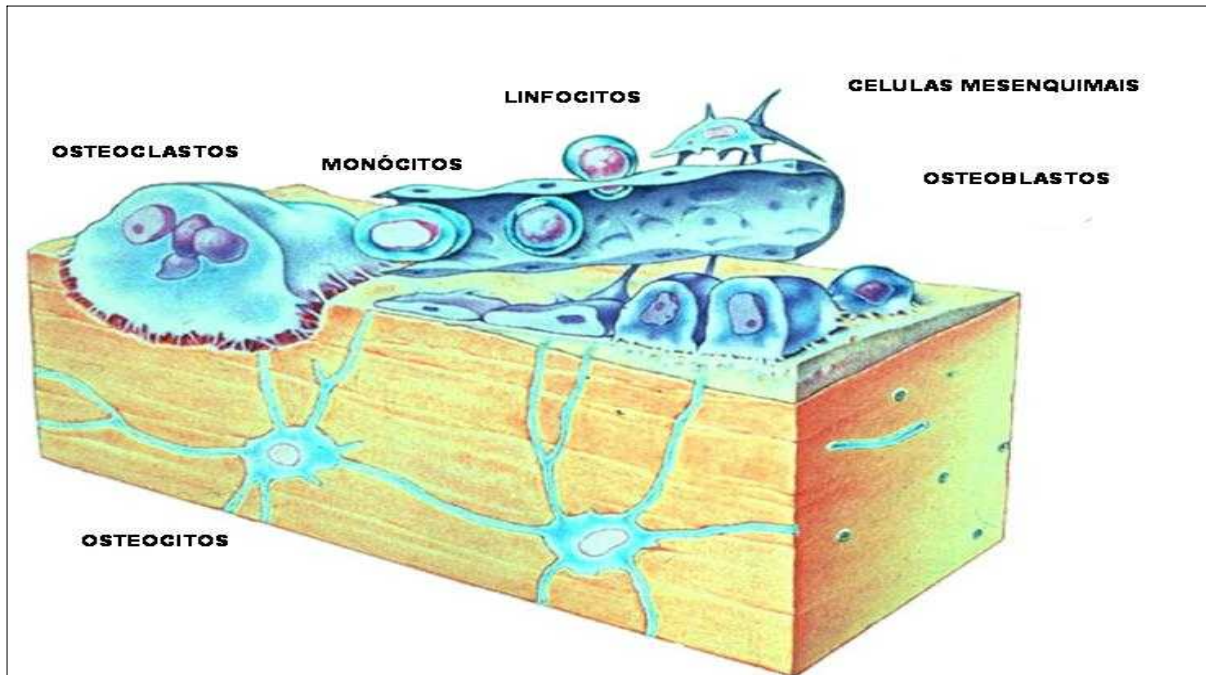
Diante do exposto este estudo propõe verificar a ação do laser de baixa potência sobre as BMP no reparo de falhas ósseas induzidas no fêmur de ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O corpo humano tem uma capacidade notável para regeneração. Células de tecidos tais como o sangue e o epitélio dividem-se rapidamente e são regeneradas continuamente durante toda a vida. As células precursoras são células que têm a capacidade de neoformação e às vezes dão origem a diversos tipos de células. No tecido maduro, estas células fazem um papel importante na homeostase e na reparação tecidual (KREBSBACH e ROBEY, 2002).

Segundo Gartner e Hiatt (2003), o tecido ósseo é composto por quatro tipos de células: as células osteoprogenitoras que apresentam potencial de se diferenciar em osteoblastos; os osteoblastos que são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, incluindo fibras colágenas e proteínas não colagenosas, além de possibilitar a mineralização da matriz óssea; osteócitos que apresentam função de manutenção do tecido ósseo; e por fim os osteoclastos responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo (Figura1).



Fonte: figura adaptada do www.rocche.com/pages/facets/11/ostedefefe.htm

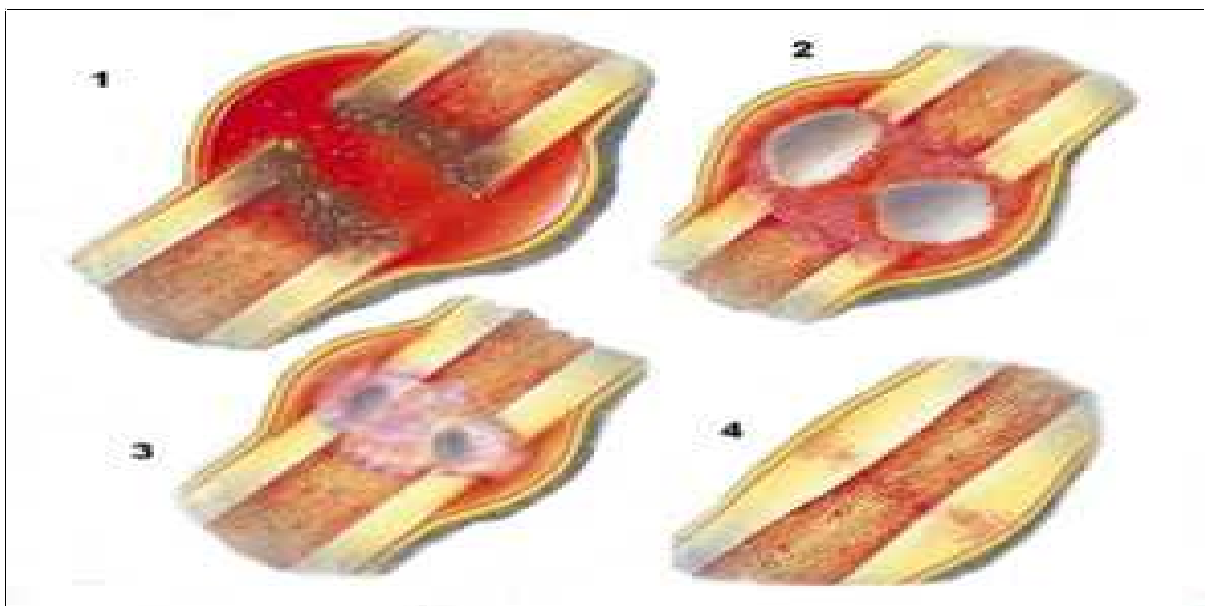
Figura 1: Diagrama representativo das células componentes do tecido ósseo.

Ao contrário dos outros sistemas do corpo humano, o osso tem habilidade de regenerar-se e reparar-se através da cicatrização do ferimento. Desde o século passado, a melhora do reparo foi encontrada através do uso de enxerto autólogo ósseo (LUDWIG *et al.*, 2000).

Lirani em 2004, afirma que as fraturas do sistema esquelético constituem lesões consumadas integrais do osso, consistindo de todos os aspectos de lesão física e potencial circulatória do conteúdo celular viável, bem como da integridade estrutural óssea. Células viáveis devem estar disponíveis; sinais apropriados devem ser gerados para permitir que estas células produzam a matriz extracelular apropriada em cada fase do reparo, e um meio mecânico suficiente conservado deve existir para assegurar que isto ocorra.

Os três principais estágios de consolidação de uma fratura são: fase inflamatória (10%), fase reparativa (40%) e fase de remodelagem (70%). Essas fases se superpõem e os eventos que ocorrem em uma fase podem ter-se iniciado numa fase anterior (LOURENÇO, 2002).

O suprimento sanguíneo adequado, a formação e a manutenção do coágulo são fatores necessários para desencadear a cascata de eventos inflamatórios que levarão ao reparo de um defeito ósseo. Esta reparação tecidual possui limitações quando o defeito excede o tamanho crítico para aquela região, idade e espécie a ser tratada. Estas restrições geram dificuldades na resolução de tratamentos em ortopedia e nas cirurgias odontológicas (LOURENÇO, 2002).



Fonte: www.apatech.com/patient-bone.html

Figura 2 Fases do processo de reparação óssea: 1 - formação do hematoma perifratório; 2 – reação inflamatória com migração de células de defesa e início da formação óssea; 3 – proliferação de células de reparo ósseo e formação do calo ósseo; 4 – fase de remodelamento por meio dos osteoclastos.

Um atributo interessante do osso é que os processos moleculares e celulares que conduzem ao desenvolvimento das estruturas esqueléticas dentro do embrião são muito similares às cascatas que ocorrem no processo de cicatrização de um osso ferido. Porém o processo de remodelamento ósseo que ocorre na cicatrização do organismo adulto sofre influências físicas e hormonais. (RENGACHARY, 2002).

Embora a maioria das fraturas cicatrizem normalmente, entre 5 e 10% dos pacientes apresentam problemas na cicatrização óssea. Para que a cicatrização óssea ocorra, é essencial que haja um ambiente biológico em que o osso novo possa se formar. Muitas condições tais como vascularização insuficiente, infecções, instabilidade mecânica e doenças sistêmicas podem danificar este ambiente (TERMAAT *et al.*, 2005).

O osso fraturado provoca imediatamente uma resposta inflamatória local. Os danos vasculares no local do ferimento causam extravasamento sanguíneo. Desse modo os monócitos e os macrófagos são atraídos para o local da ferida e este extravasamento sanguíneo dará forma a um hematoma, o qual impede uma perda maior de sangue. Alguns dias após a fratura inicia-se o reparo ósseo através da formação de um calo ósseo, neoformações de colágeno, de vasos sanguíneos e de células de fibroblastos (HOFFMANN *et al.*, 2001).

Para Croci *et al.*, em 2003, uma fratura começa o seu processo de consolidação assim que o osso se quebra, e se as condições forem favoráveis, este processo se dá por uma série de fases, até que o osso esteja totalmente consolidado. A consolidação de um osso esponjoso fraturado segue um padrão diferente daquele do osso cortical. Como o osso tem uma textura esponjosa uniforme e não tem canal medular, há uma área de contato mais ampla entre os fragmentos que é a trama de trabéculas que permite uma penetração mais fácil do tecido ósseo e sua formação. A consolidação pode ocorrer diretamente entre as superfícies dos ossos e não precisa ocorrer através do calo externo ou do calo endosteal, como em um osso cortical.

O quadro de fratura como um todo, a partir da sintomatologia dolorosa, edematosa e, sobretudo, no processo de reparo, constitui uma indicação para a

laserterapia. Assim, a aceleração na velocidade mitótica proporciona aumento na velocidade de consolidação óssea, bem como redução na incidência de aderência pós-imobilização (CARVALHO *et al.*, 2004).

Segundo Giordano *et al.* (2001), embora em condições normais a maioria das fraturas não apresente problemas de consolidação, existem algumas situações em que o processo de reparo pode ser acelerado, assegurando rápido retorno da função músculo-esquelética. O desenvolvimento de novas técnicas capazes de acelerar o processo de reparo ósseo tem proporcionado avanços significativos no tratamento das fraturas.

Para Rizzo *et al.*, (2005), um dos fatores que compromete o sucesso da união é a movimentação excessiva dos segmentos operados. Por essa razão, é sugerido que procedimentos com fixações rígidas promoveriam maior união, porém é um tratamento cirúrgico altamente invasivo.

A perda óssea pode ser resultado de várias patologias, trauma ou uma consequência de procedimentos cirúrgicos. Isto conduziu aos estudos extensivos realizados por pesquisadores do mundo todo no processo de reparação óssea. Diversas técnicas para a correção de defeitos ósseos já foram propostas, entre elas o uso de diferentes tipos de enxertos, de membranas ou da associação de ambas as técnicas (PINHEIRO *et al.*, 2003b).

2.2 NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

Os primeiros questionamentos sobre processos que determinam a neoformação óssea, em sítios desprovidos de tecidos ósseos, foram baseados na

descoberta de Urist. Para ele, um fator central seria o responsável por este efeito. Esse fator foi relatado como uma substância indutora de formação óssea, presente na matriz óssea. As células indutoras e as células induzidas eram provenientes do hospedeiro e estas mesmas células indutoras seriam descendentes de histiócitos e células do tecido conjuntivo perivascular. O termo osteoindução foi designado para um princípio fundamental de regeneração óssea desencadeado pela ação das proteínas ósseas morfogenéticas (SANTOS *et al.*, 2005).

Para Termaat *et al.* (2005), a regeneração óssea é uma recapitulação do desenvolvimento embrionário do osso, como o osso deve cicatrizar completamente, a formação do osso novo deve ter a melhor forma possível do tecido cicatricial.

Pretel (2005), afirma que a regeneração óssea não é somente um processo biológico, mas fatores elétricos, bioquímicos e mecânicos são também de fundamental importância na regeneração e manutenção do osso *in vivo*.

O princípio de neoformação óssea utilizando-se bioengenharia tecidual está baseado na utilização de arcabouços (osteocondutores), moléculas sinalizadoras (osteoindutoras) e células tronco (osteogênicas) (PRETEL, 2005).

A necessidade de restauração dos ossos, especialmente em decorrência de anomalias da consolidação, muitas vezes, denota obstáculo aos clínicos e cirurgiões capacitados, a reabilitação dos pacientes (GROENEVELD; BURGER, 2000).

O osso, quando lesado, tem a capacidade de regenerar e retornar à estrutura tecidual original, sem a formação de tecido cicatricial. Apesar desse potencial, a regeneração necessita de auxílio em várias ocasiões, como nas uniões retardadas, nas não-uniões, em fraturas múltiplas ou cominutivas, nas osteotomias, artrodeses e no preenchimento de cavidades ou defeitos segmentares extensos. Para manter ou auxiliar a capacidade regenerativa inerente, de forma relativamente

inalterada, utilizam-se substitutos ósseos osteoindutores e osteocondutores. Uma das vantagens desses substitutos ósseos é não produzir trauma adicional ao paciente, o que ocorre na coleta de enxerto autógeno. O estudo de material osteoindutor iniciou-se com experimentos na década de 60. Em 1965, foi publicado o primeiro trabalho subsidiando a teoria da indução óssea de autoria Urist (CIANI *et al.*, 2006).

2.3 PROBLEMAS QUE SÃO ENCONTRADOS NA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA

Freqüentemente são encontrados problemas de perda óssea em seus pacientes fraturados. A severidade destes problemas é determinada por numerosos fatores, incluindo a extensão da perda óssea, a qualidade do osso restante, a fonte vascular disponível e as condições dos tecidos vizinhos. O tratamento bem sucedido requer a combinação de fatores como uma osteoindução marcante, uma matriz osteoindutiva, uma resposta em forma de células com potencial osteogênico e uma fonte vascular adequada (OAKES; LEE; LIEBERMAN, 2003).

Reis; Hungria Neto; Pires (2005) citam que cerca de 5% das fraturas de ossos longos evoluem para pseudo-artrose, termo aplicado para designar a situação em que a fratura não mostra evidências radiográficas de progressão do processo de consolidação, indicadas por esclerose nas extremidades da fratura, presença de um hiato, calo ausente ou hipertrófico e persistência ou alargamento do traço de fratura. Devido à sua alta incidência, é importante que o ortopedista conheça todos os aspectos da doença para corretamente direcionar o tratamento para cada tipo de

paciente. A instabilidade e a falta de vascularização adequada são os principais fatores que conduzem à pseudo-artrose. Infecção falta de cooperação do paciente e neuropatias também devem ser consideradas na gênese da falta de consolidação.

Variações temporais e espaciais interferem na secreção dos vários fatores de crescimento e isto já foi comprovado em culturas de osteoblastos e em vários estudos experimentais *in-vivo*, incluindo a cicatrização de fraturas em seres humanos. As BMPs são fatores de crescimento vastamente estudados que podem provocar formação óssea ou osteoindução (SOLHEIM, 1998).

A estabilização inadequada da fratura com aparelhos externos ou osteossíntese pode permitir movimentação excessiva no foco da fratura, dificultando ou impedindo a consolidação, podendo levar a uma pseudo-artrose. Vários métodos podem ser utilizados no tratamento, como a descorticação ou escamação osteoperiosteal, o auto-enxerto esponjoso, a adição de BMP (proteína morfogenética óssea), o concentrado de células-tronco da medula óssea e de fatores de crescimento plaquetário, a distração do calo ósseo com fixadores externos, o enxerto ósseo vascularizado nas perdas ósseas, os materiais de estabilização interna, os estabilizadores externos (fixadores externos ou órteses), além do ultrassom, ondas de choque e campos eletromagnéticos. Porém se a fratura evolui para uma pseudo-artrose o tratamento é mais demorado, não sendo muito vantajoso para o paciente (REIS; HUNGRIA NETO; PIRES, 2005).

Só nos Estados Unidos são realizadas 500 mil cirurgias/ano utilizando o enxerto ósseo. Concomitantemente, as cirurgias de revisão das artroplastias, tanto do quadril como do joelho, têm aumentado progressivamente e, por consequência, ocorre aumento das complicações e dificuldades inerentes a esses tipos de cirurgias. Há vários tipos de enxertos que podem ser utilizados, entre eles o enxerto

homólogo, que é o enxerto colhido em indivíduos da mesma espécie e que pode ser utilizado de várias formas: fresco, congelado (-60° a -80°C) ou liofilizado (FUJIKI *et al.*, 2005).

2.4 MATERIAS OSTEOINDUTIVOS

Os pesquisadores atualmente estão estudando o uso clínico das proteínas morfogenéticas do osso (*Bone Morphogenetic Protein* - BMP), consideradas fatores de crescimento osteoindutores com potencial de atuar sobre uma célula mesenquimal, tornando-a capaz de sintetizar osso (NUNES, 1999).

Segundo Sellers *et al.* em 2000, as indicações para o uso de BMP estão associadas principalmente a grandes perdas ósseas, decorrentes de anomalias de desenvolvimento e neoplasia, bem como doenças infecciosas e inflamatórias, entre outras.

O fenômeno da osteoindução já é descrito desde 1965. Esta capacidade de realizar osteoindução foi estudada localmente em roedores com implantação de cilindro de osso descalcificado em combinação com ácido hialurônico. E assim o fenômeno da osteoindução foi atribuído pela presença de uma proteína na matriz óssea a BMP. Desde então, a estrutura da BMP foi amplamente estudada e descrita (TERMAAT *et al.*, 2005).

O conceito de neoformação óssea promovida por substâncias osteoindutoras não é recente, no entanto, somente no final da década de 70, foi isolado e descrito o primeiro fator de crescimento e diferenciação óssea. Foi observado que fragmentos

de osso desmineralizado implantados em sítios subcutâneos e intramusculares de cobaias, induziam formação de tecido ósseo, atribuindo este fato a um fator osteoindutor ativo presente na matriz óssea, ao qual chamaram de BMP (PADULA *et al.*, 2003; LUYTENT *et al.*, 1999).

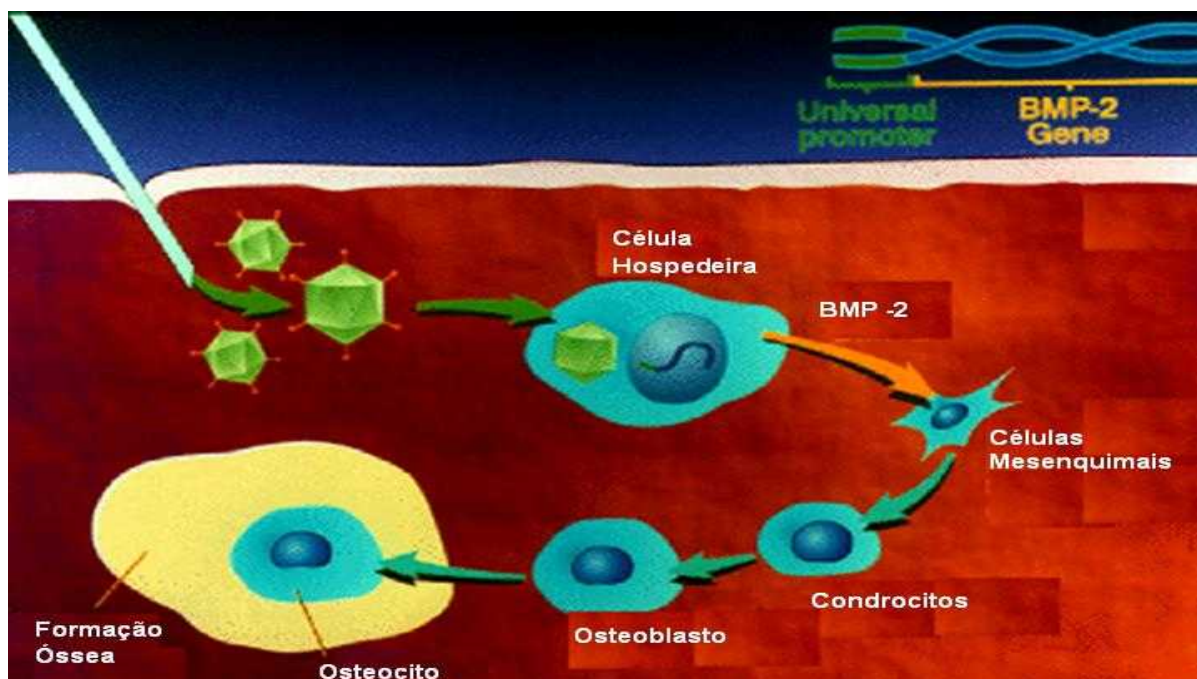
As células mesenquimais não especializadas que se diferenciam em células formadoras de osso, em resposta à estimulação das proteínas morfogenéticas são denominadas células osteoprogenitoras indutíveis, estando presentes em abundância no músculo esquelético e tecido conjuntivo, locais onde a formação de osso pode ser induzida com maior facilidade (MASTROCINQUE *et al.*, 2004).

2.5 PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DO OSSO (BMP)

Os biofatores têm sido testados recentemente para o tratamento clínico de doenças músculo-esqueléticas e de fraturas abertas com perda de tecido ósseo, aumentando o potencial de cura consideravelmente se comparado ao potencial do tecido sozinho. Estes estudos com biofatores concentraram-se nas BMPs e seus carreadores como esponjas de colágeno ou de hidroxiapatita que já foram testados no homem (MUSSANO *et al.*, 2007).

As BMPs são membros da superfamília TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) que quando secretadas sinalizam à transformação. As BMPs eram originalmente identificadas como as moléculas que induzem a formação ectópica do osso quando implantado nos músculos do roedor. Neste processo mesenquimal as células do precursor condensam-se e diferenciam-se em dois tecidos distintos.

Subseqüentemente, condrócitos submetem-se a um programa de proliferação, hipertrofia, calcificação e finalmente, a morte da célula. (HOFFMANN *et al.*, 2001; KUGIMIYA *et al.*, 2006).



Fonte: Figura adaptada Tord D.A.; Hankins, G.R.; Beres, E.J.; Kallmes, D.F.; Helm, G.A. Bone morphogenetic protein gene therapy for the induction of spinal arthrodesis. *Neurosurg Focus*, v. 4, n.2, 1998.

Figura 3: Diagrama da ação das proteínas morfogenéticas do osso no processo de reparação óssea.

Proteínas desta família do TGF- β estão implicadas em diversas atividades biológicas, envolvendo diferenciação celular, morfogênese tecidual, regeneração, reparo e estímulo de secreção de matriz extracelular. As BMPs são glicoproteínas não colágenas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea. São proteínas encontradas em altas concentrações no tecido ósseo e são consideradas as responsáveis pela habilidade indutiva e regenerativa dos enxertos ósseos desmineralizados usadas em terapia periodontal. Atuam durante a embriogênese e na idade adulta do indivíduo, modulando negativa ou positivamente vários processos biológicos que ocorrem no organismo humano (CANOVA, 2003; LIMA *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005).

Os potenciais usos clínicos dessas proteínas incluem a substituição de enxertos ósseos no tratamento de uniões retardadas, não-uniões, má consolidações, artrodeses e procedimentos ortopédicos reconstrutivos, entre outros (LIMA *et al.*, 2004).

Segundo Rengachary (2002), a história da BMP é destacada desde 1889, quando se observou que o osso descalcificado podia induzir a cicatrização de defeitos ósseos. O objetivo inicial era o uso de outras substâncias analisadas como anti-sépticas e usando o osso descalcificado bovino como carreador. Assim, foi observado que não o osso descalcificado diminui a infecção como também deu forma ao novo osso formado. Segundo, o autor, ainda o primeiro estudo clínico das proteínas só foi realizado em 1988.

Pouco se sabe sobre o efeito fisiológico dos diversos fatores de crescimento, mas muitos estudos *in-vivo* já foram feitos para cicatrização de fraturas. E acredita-se que osteoindução que o osso desmineralizado causa, é devido a BMP, fator contido nesta substância (SOLHEIM, 1998).

Riley *et al.* em 1996 e Canova em 2003, afirmaram que nove proteínas da superfamília TGF- β têm mostrado individualmente induzir ossos ectópicos em um sistema de prova *in vivo*. Elas parecem ter como alvo a célula perivascular tipo mesenquimal indiferenciada. Lane em 2001, confirmou que as BMPs são capazes de estimular células progenitoras a diferenciar e formar osso. Formas recombinantes de BMPs, particularmente BMP-2, 4 e 7 têm capacidade de curar defeitos ósseos críticos em roedores, cães, carneiros e primatas, quando combinadas com um carreador de colágeno, matriz óssea desmineralizada, hidroxiapatita e polímeros biodegradáveis. E por fim, Millis em 1999, citou que as BMPs causam osteogênese

de uma forma dose-dependente. Além disso, para atuarem durante a consolidação da fratura, elas precisam ser mantidas no local pela combinação a um carreador.

Em geral, os materiais usados como substitutos do tecido ósseo atuam por meio de três diferentes mecanismos: osteogênese capaz de formar osso diretamente a partir dos osteoblastos; osteocondução, pois quando colocado em uma ferida óssea, preenche a cavidade e conduz ao desenvolvimento de novo tecido ósseo, ex. sulfato de cálcio, colágeno, hidroxiapatita, polímero de mamona e osteoindução através do auxílio na reparação da ferida óssea, induzindo a formação do novo tecido ósseo, ex. osso autógeno, matriz orgânica do osso humano ou bovino e fatores de crescimento como BMP e PDGF (CARVALHO *et al.*, 2004; PRETEL, 2005).

Quanto à origem e a obtenção da BMPs, sabe-se que são produtos de metabolismo de osteoblastos, odontoblastos e de várias células tumorais, e, são armazenadas em forma concentrada no osso, dentina e em células neoplásicas do osteosarcoma. A extração da BMP foi obtida de vários animais, como bois, porcos, ratos, camundongos, cães e coelhos, bem como humanos. Independentemente do animal de onde a BMP for extraída, ela promove osteoindução, sendo a extraída de humanos a mais difícil de ser concebida (HOFFMANN, 2001; PRETEL, 2005).

Sabe-se que algumas BMPs possuem atividade osteogênica e condrogênica, e outras trabalham cooperativamente e sinergicamente, afetam vários estágios da formação óssea e promovem consolidação da fratura, mas com atividades distintas. A BMP-2 recombinante humana (rh), a BMP-4, a BMP-5 e a BMP-7 (OP-1) possuem atividade osteogênica e condrogênica. A BMP-2/-4 e a BMP-7 (OP-1) trabalham cooperativamente e sinergicamente, afetam vários estágios

da formação óssea e promovem consolidação da fratura, mas com atividades distintas (SAKOU, 1998; LIMA *et al.*, 2004).

Nakase e Yoshikawa (2006) afirmam que as BMPs parecem realizar papéis cruciais nos eventos cicatriciais da fratura óssea. Os mecanismos de atuação da BMP como a aceleração da fase do reparo da fratura, podem servir como uma opção para resolver o mecanismo da regeneração óssea. Uma série de achados atuais a respeito dos papéis da BMP e os fatores relacionados no reparo da fratura fornecerão uma chave para formulação de estratégias terapêuticas menos invasivas e um tratamento mais efetivo da fratura.

Presentemente pelo menos 20 tipos de BMPs são estudadas, mas somente a BMP 2, 4 e 7 foram capazes de estimular in-vitro o processo de diferenciação de células bases em células maduras de osteoblasto. Em estudos essa proteína demonstrou potencial osteoindutivo e foram aprovados para o uso clínico no tratamento de fraturas dos ossos longos (BIASE; CAPANNA, 2007).

Embora a função exata e a inter-relação de cada BMP não estejam ainda completamente esclarecidas, evidências indicam sua atuação como parte de uma cascata complexa de fatores reguladores de diferenciação celular, aumentando a expressão de condroblastos e osteoblastos em sítios ósseos lesados. A possível conservação evolucionária estrutural e funcional dos genes de BMPs sugere funções críticas regulatórias no processo de diferenciação durante o desenvolvimento (FORELL; STRAW, 1994; GONÇALVES *et al.*, 1998).

Lourenço em 2002, afirma que a maior compreensão da função que as BMPs executam durante o desenvolvimento embrionário suscita o questionamento em relação ao termo indução. As BMPs não possuem apenas efeitos sobre a direção da diferenciação celular, elas atuam também como sinais de posição e provêm

informações necessárias para o padrão de informações. Em função destas características, as BMPs se ajustam apropriadamente na categoria de morfogenes.

Para Hoffmann *et al.* (2001), as BMPs são reconhecidas como fatores importantes para a formação de tecidos esqueléticos. O papel dessas proteínas morfogenéticas no desenvolvimento e na manutenção do órgão foi e será o assunto de investigações futuras. A administração bem sucedida a um paciente depende da eficácia da dose. O maior problema da utilização clínica das BMPs é controlar a quantidade de BMP necessária para um efeito adequado, além de um carreador apropriado.

As BMPs induzem a diferenciação das células de osteoblastos, além de realçar a função destas. Os fatores de crescimento são regulados nos locais com a presença de BMP e em seus arredores próximos, mas não há nenhuma ligação cientificamente confirmada entre as proteínas e as células esqueléticas. É ainda vastamente conhecido o papel dentro do desenvolvimento e diferenciação celular das BMPs. E também sua capacidade de induzir mitoses nas células ósseas. (REZENDE *et al.*, 1996; GAZZERRO; GANGJI; CANALIS, 1998).

Lima *et al.* (2007), observaram que o implante de matriz óssea desmineralizada conduziu ao desenvolvimento, resultado que foi atribuído pela presença da BMP presente na matriz óssea.

As BMPs, juntamente com outros fatores, podem induzir a formação óssea *in-vitro*. A resposta ao tratamento com BMP varia entre as espécies de animais, os primatas necessitam de uma dose maior de proteína do que os roedores. Para superar estes problemas e para reduzir as quantidades de BMP, estudos de tratamentos combinados com outros reagentes que podem realçar a regeneração óssea, estão sendo realizados (Hosseinkhani *et al.*, 2007).

Luca *et al.* em 2001, realizaram um estudo *in-vitro* fazendo a medida do comprimento e a análise histológica dos ossos metatarsais de ratos ainda em fase de crescimento e submetidos ao tratamento com BMP, que mostrou aceleração significativa do crescimento longitudinal do osso, aumento da altura da zona hipertrófica e aumento no número de condroblastos, no grupo que recebeu a BMP.

Já Tuominen *et al.* (2001), concluíram e afirmaram que a utilização de BMP pura não pode ser considerado como um substituto do material ósseo para o cão, que o enxerto ósseo derivado de espécie diferente desmineralizado não parece ser um material viável como carreador para a BMP e finalizaram que a BMP adicionada ao defeito ósseo pareceu aumentar a formação do osso mas não conduziu a uma união óssea completa, o que diverge da grande maioria das conclusões de diversos autores atualmente.

Esta capacidade de influenciar as células primitivas indiferenciadas em transformar-se dando origem a osteoblastos que a BMP possui, torna-se ineficaz em estimular essa resposta sem um carreador. Estas proteínas teriam ação sobre quatro etapas de diferenciação cito específica com a ativação e proliferação de células do mesênquima, a formação de cartilagem, a formação de osso primitivo e a formação de osso lamelar. A quantidade de osso neoformado é diretamente proporcional à quantidade dessa proteína. Porém a difusão nos tecidos é limitada (CROCI *et al.*, 2003).

A atividade osteoindutiva da BMP somado à sua presença no tecido ósseo sugere que elas são importantes reguladores no processo de reparação óssea e podem estar envolvidas na manutenção destes tecidos (SANTOS *et al.*, 2005).

A habilidade osteoindutora das BMPs já foi demonstrada em uma grande variedade de espécies, com diversos carreadores, incluindo colágeno e polímeros,

em sítios heterotópicos e ortotópicos. Entre as funções do carreador estão: o atraso, a rápida dispersão da BMP do local do implante e proteção contra lises não específicas. As propriedades geométricas de um carreador podem influenciar a performance da BMP (BAX *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2004).

Esta capacidade da BMP de induzir osteogênese é influenciada por vários fatores, como a fonte e o potencial osteoindutivo da preparação do BMP, a viabilidade e habilidade morfogênética óssea ou a capacidade de resposta à indução das células osteoprogenitoras do hospedeiro e das condições do ambiente local de implantação (FERRIGNO *et al.*, 2007).

Gonçalves *et al.* (1998), afirmam que a expressão de diferentes BMPs durante o desenvolvimento sugere novas estratégias de intervenção terapêutica em sítios extra-ósseos. A aplicação clínica de BMPs, como se demonstrou, não está limitada à aceleração e indução à osteogênese. Também é de muita valia na odontologia, tanto na indução de dentinogênese, bem como a aplicação local de BMPs em tecidos periodontais, visando sempre o reparo destes tecidos. Mostrando a importância clínica em diversas áreas da saúde. Segundo Reis; Hungria Neto e Pires em 2005, a BMP tem sido bastante estudada e sua aplicação tem crescido no tratamento das pseudartroses difíceis, com perdas de segmentos ósseos.

Pressupõe-se que a BMP induz o desenvolvimento ósseo na vida pós-fetal a partir de células progenitoras no processo normal de remodelamento, reparo de fraturas, incorporação de enxertos e ossificação heterotópica. Apesar de terem transcorrido mais de 35 anos desde a descrição inicial do processo de indução óssea por URIST, o mecanismo exato de como isto realmente ocorre ainda não está completamente esclarecido, entretanto, o conhecimento das alterações celulares e bioquímicas durante a formação de cartilagem e osso já existe (LOURENÇO, 2002).

Termaat *et al.* (2005), afirmam que em relação à dose, as características dos pacientes não determinam a eficiência da dose de BMPs, pois essas proteínas agem localmente. Conseqüentemente, a concentração de BMP no local do implante é mais importante do que efetivamente a dose total. A dose de BMP deve superar um ponto inicial antes que possa ser administrada para induzir a formação óssea. Se a dose de BMP for demasiadamente baixa, haverá formação inadequada do osso, e a utilização de uma dose elevada não tem nenhuma eficácia adicional na formação óssea.

A concentração exata de BMP no local da fratura, ao contrário da concentração fisiológica normal no osso, é desconhecida. A concentração requerida ideal para construir uma ponte sobre os defeitos ósseos depende de diversos fatores. Estudos experimentais mostram que as fusões dos defeitos ósseos são mais facilmente induzidas em mamíferos mais evoluídos fisiologicamente, e deve ser levado em consideração também o tipo de fratura tratada. (RENGACHARY, 2002).

Segundo Gazzerri; Gangji; Canalis em 1998, o efeito estimulatório da BMP-2 foi estudado em detalhes e determinado que este efeito é tempo e dose dependente, e age através da nivelação de polipeptídeos.

Para Solheim (1998), quando a concentração de BMP-2 é aumentada a formação óssea ocorre mais cedo, e o osso e a cartilagem são formados de forma simultânea. A resposta osteoindutiva pela BMP-4 e BMP-5 parece ser mais fraca do que na BMP-2. E a habilidade da BMP de induzir a osteogênese nos primatas ainda não está bem desvendada.

Os efeitos de doses elevadas de BMP em um embrião em formação ainda são desconhecidos, conseqüentemente, seu uso durante a gravidez não é recomendado. Embora seja uma proteína humana, há um risco de reação inume em

resposta ao tratamento e este risco aumenta se a BMP for administrada mais de uma vez no caso de fraturas repetidas e a dimensão deste risco ainda é desconhecida (RENGACHARY, 2002).

Kirker-head (2005), afirma que a biopsia de ossos recuperados de seres humanos que foram tratados com implante de BMP revela que a indução óssea ocorre sem processos excessivos de inflamações, sem formação óssea excessiva ou anormal.

Biase; Capanna (2007), estudaram 42 pacientes com lesões ósseas, sendo 22 lesões no fêmur, 11 no úmero, 4 na tíbia, 2 na escápula, 2 no calcâneo e 1 na fíbula, tratadas com BMP. Os resultados foram julgados satisfatórios dentro dos ajustes clínicos, mas o estudo não referenciou a segurança do tratamento nem o custo.

Um estudo com 15 coelhos tratados com BMP teve como resultado a reabsorção óssea local e neoformação do tecido ósseo. Embora o retrato histológico fosse similar para ambos os grupos (com e sem BMP), o grupo tratado com BMP mostrou maior osteogênese. E o grupo sem BMP mostrou formação de ossos mais finos. Sendo a concentração de BMP usada neste estudo era determinada pelo fabricante. O que é importante ressaltar, pois o efeito da BMP é dependente da dose e da concentração (LIMA *et al.*, 2007).

Hosseinkhani *et al.* em 2007, realizaram um estudo que demonstrou como resultados que a atividade osteoindutiva *in vivo* da BMP foi influenciada extremamente pela utilização desta proteína combinada com outras substâncias osteoindutivas. E concluíram que a incorporação de outros fatores de crescimento com as proteínas morfogenéticas do osso está em alta.

Santos *et al.* (2005), em um artigo de revisão concluíram que as indicações para o uso de BMPs estão associadas principalmente a grandes perdas ósseas, decorrentes de anomalias de desenvolvimento, bem como defeitos ósseos causados por algum trauma na estrutura óssea, doenças infecciosas e inflamatórias. Uma avaliação definitiva sobre o uso clínico de BMPs, só será possível após a elucidação de todos os diferentes fatores que influenciam na reparação tecidual, juntamente com o desenvolvimento de um sistema carreador apropriado. O que garantirá um protocolo de tratamento mais adequado.

Para avaliar a potencialidade da rhBMP-2 em acelerar a consolidação de fraturas, Bouxsein (2001), realizou fraturas bilaterais na porção medial da ulna de coelhos, que foram divididos em 2 grupos, 1 que recebeu esponja de colágeno absorvível contendo rhBMP-2, esponja de colágeno absorvível com tampão e um não tratado. No período de duas semanas, a área do calo mineralizado foi avaliada por tomografia computadorizada quantitativa. Os autores concluíram que os animais tratados com BMP apresentaram uma velocidade de cicatrização óssea 33% maior.

Luytent *et al.* em 1999, testaram a eficácia da aplicação da BMP-2 com a osteogenina e concluíram que os dois fatores relacionados estimulam a síntese e diminuem a degradação das proteoglicanas da cartilagem articular. E afirmaram ainda que estas proteínas iniciam não somente a neoformação da cartilagem articular *in-vivo*, mas tem também um papel na manutenção da matriz cartilaginosa.

Um outro interesse da aplicação das BMPs são as taxas reduzidas de infecção após o tratamento de fraturas com estas proteínas. Isto pode ser explicado pelo aumento da estabilidade, a osteoindução realçada e o aumento da fonte vascular local criados pela aplicação localizada da BMP (TERMAAT *et al.*, 2005).

O enxerto liofilizado descalcificado é o enxerto sem a parte mineral. Outra forma do uso deste enxerto seria o homoenxerto congelado, reduzido a micropartículas desmineralizadas, liofilizado e armazenado, possuem um significativo potencial osteoindutor, fazem supressão da mitose e intensificação da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos e osteoblastos. Esse “pó de osso” é rico em BMP. E por ser um enxerto poroso permite ainda a invaginação de vasos sanguíneos para seu interior (FUJIKI *et al.*, 2005).

Rizzo *et al.* (2005), analisaram a atuação da matriz óssea homóloga desmineralizada na união da processos transversos após sua descorticação em 24 coelhos e os resultados histológicos demonstraram áreas de fragmentação e mínima formação óssea a partir dos processos descorticados, com reabsorção da matriz até a nona semana e substituição por tecido conjuntivo fibroso. Esses achados, segundo os autores, divergiram de outros encontrados que afirmam que a matriz óssea desmineralizada foi bem aceita pelo hospedeiro sem observação de partículas segmentadas e células do tipo inflamatórias. Por outro lado, Guizzardi *et al.* em 1992, afirmaram que a quantidade de BMP liberada na desmineralização não é suficiente para intensificar a formação óssea na coluna vertebral, podendo ser a explicação dos resultados encontrados.

De acordo com Salgado (2002), uma concepção errônea é considerar que todo material derivado de colágeno é idêntico em composição. De fato, a maneira pela qual o colágeno doador é processado tem efeito significativo na estrutura do material, nas propriedades mecânicas, no potencial imunogênico e no tempo de degradação.

A eficácia de aplicar-se as BMPs foi amplamente investigada fora do uso clínico e conduziram-se esses resultados positivos para que fossem incluídos no uso clínico (TERMAAT *et al.*, 2005).

O uso clínico dessas proteínas inclui a substituição de enxertos ósseos no tratamento de uniões retardadas, não-uniões, más-consolidações, artrodeses e procedimentos ortopédicos reconstrutivos, entre outros (BAX *et al.*, 1999).

Do ponto de vista das aplicações clínicas, médicas e ortopédicas, diversos membros da família das BMPs estão atraindo considerável atenção, por serem denominados de ferramentas terapêuticas para a regeneração esquelética e servirem como moléculas alvo para tratamento de desordens esqueléticas (NAKASE e YOSHIKAWA, 2006).

Gonçalves *et al.* em 1998, já afirmavam que a avaliação definitiva do uso clínico de BMPs seria possível após a elucidação de todos os diferentes fatores influentes na determinação do reparo tecidual e na atividade do implante, bem como após o desenvolvimento de um sistema carreador apropriado. A caracterização completa das BMPs e a compreensão de sua atuação nos diferentes estádios de neoformação óssea possibilitarão a formulação de tratamentos mais adequados, estimulando-se os próprios tecidos ao processo de reparo.

Pinheiro *et al.* (2003a), afirma que o uso do osso inorgânico bovino não é uma nova ferramenta para melhorar o reparo do osso, pois já é relatada desde 1889. Este material foi usado previamente para a reconstrução do cume alveolar, da perda do osso associada às lesões peridentais e periapicais, sobre os defeitos ósseos. Embora o uso da terapia do laser de baixa potência (LLLT) na biomodulação do reparo do osso esteja crescendo e diversos estudos sendo realizados, ainda não

demonstraram resultados significativamente positivos na cicatrização do tecido ósseo.

Carvalho *et al.* em 2006 e Gerbi *et al.* em 2008, concluíram que os biomateriais promovem a neoformação óssea lenta e gradual, mas quando associados com o uso do laser de baixa intensidade ocorre uma aceleração destas capacidades, pois o laser faz a estimulação das células e da microcirculação do tecido. Neste estudo no sétimo dia após a cirurgia, os autores observaram que o grupo tratado com laser associado à BMP estava em um estágio mais avançado de reparo quando comparado com outros tratamentos, apresentando ainda uma área de neoformação de tecido ósseo com uma grande concentração de osteoblastos e ausência de reação inflamatória. Indicando assim uma aparente eficiência do tratamento combinado de BMP e Laser de Baixa Intensidade.

2.6 CARREADORES

Um dos fatores mais importantes que podem determinar o sucesso ou fracasso de enxertos ósseos indutores em cirurgias reconstrutivas é a eficiência do material carreador. O carreador ideal deve aumentar a exposição dos tecidos do hospedeiro à substância de crescimento e assegurar uma distribuição uniforme sem permitir que o material implantado ultrapasse os limites do sítio. Além disso, não deve provocar interferência na regeneração óssea e ainda potencializar a atividade osteogênica da BMP, ter receptividade à esterilização, O carreador deve ser absorvido na medida em que for ocorrendo a formação óssea. Além disso, deve ser

seguro, biodegradável, biocompatível e formulado para permitir tamanhos e formas adequados para o enxerto (RENGACHARY, 2002; SANTOS *et al.*, 2005; PRETEL, 2005).

Diversos estudos experimentais salientaram a importância do uso de um carreador com a finalidade de reter a BMP por tempo suficiente para a indução óssea e de protegê-la contra lises não específicas. Existem diferentes tipos de carreadores, com diferentes tipos de resposta, sendo ainda necessário esclarecer problemas como combinação, bio-disponibilidade, difusibilidade e espécie (LIND, 1998).

De acordo com Rengachary (2002), a proteína morfogenética do osso é uma proteína solúvel em água que difunde facilmente nos líquidos do corpo. Em um ajuste experimental, a BMP sem um carreador não resiste mais do que algumas horas no local depositado. É conseqüentemente necessário conter a BMP em um carreador de modo que tenha um efeito localizado no osso em cicatrização.

Os carreadores provêm três diferentes e importantes funções (GROENEVELD; BURGER, 2000):

1. atuam como um espaçador tridimensional, fornecendo a estrutura necessária para a formação do novo tecido.
2. mantém o nível de concentração crítico das BMPs no local, permitindo que o processo de calcificação ocorra com segurança.
3. contém a BMP no local desejado, impedindo que haja calcificação em locais indesejados.

É absolutamente crítico o tempo de reabsorção do carreador: se por demasiado curto, não mantém a concentração adequada de BMP durante o tempo necessário e se muito longo pode impedir fisicamente o desenvolvimento do novo

tecido calcificado, levando à formação óssea não-orientada e pseudo-artrose (YASKO *et al.*, 1992).

Vários carreadores foram investigados experimentalmente e clinicamente, e podem ser classificados em sais inorgânicos, polímeros sintéticos e compostos de polímeros sintéticos e naturais. Um carreador ideal não pode induzir uma resposta imune, nem uma reação inflamatória e também deve ser poroso. Além disso, a degradação do carreador não deve resultar em resíduos tóxicos (RENGACHARY, 2002).

Segundo Oakes, Lee; Lieberman (2003), existem inúmeros carreadores para as matrizes comercialmente disponíveis, entre eles polímeros naturais e sintéticos, o glicerol, o colágeno, o sulfato de cálcio, hidroxiapatita, alginatos, cerâmicas e o ácido hialurônico.

Para Rengachary (2002), a hidroxiapatita que é um mineral natural possui uma absorção muito lenta e está tornando-se menos popular. O colágeno é o carreador hoje mais usado, ele tem a preferência, pois pode ser obtido do osso, dos tendões ou dos ligamentos. O colágeno bovino é atualmente usado como opção de carreador no ajuste clínico. No caso específico da BMP o colágeno ósseo como carreador permite maior firmeza na ligação proteína – carreador. E os autores afirmam que o colágeno derivado do osso é o carreador mais utilizado no tratamento dos seres humanos.

Oakes, Lee; Lieberman, em 2003, concluíram que o ácido hialurônico e o glicerol são carreadores viáveis para matrizes ósseas desmineralizadas. Quando analisados e comparados os tipos de carreadores, não se notou nenhuma diferença significativa de resultado. Mas embora estas matrizes produzissem osteoindução,

sozinhas elas não geraram uma resposta adequada para facilitar a cicatrização do defeito ósseo.

Minamide *et al.* em 2001, avaliaram dois sistemas de carregamento para as BMPs, o primeiro foi uma estrutura porosa chamada *true bone ceramics* e o outro foi o colágeno tipo I. Os resultados mostraram que o primeiro apresentava sua estrutura porosa preenchida por osso e foi mais eficiente que o colágeno tipo I, e que promoveu um rápido crescimento com formação de osso resistente.

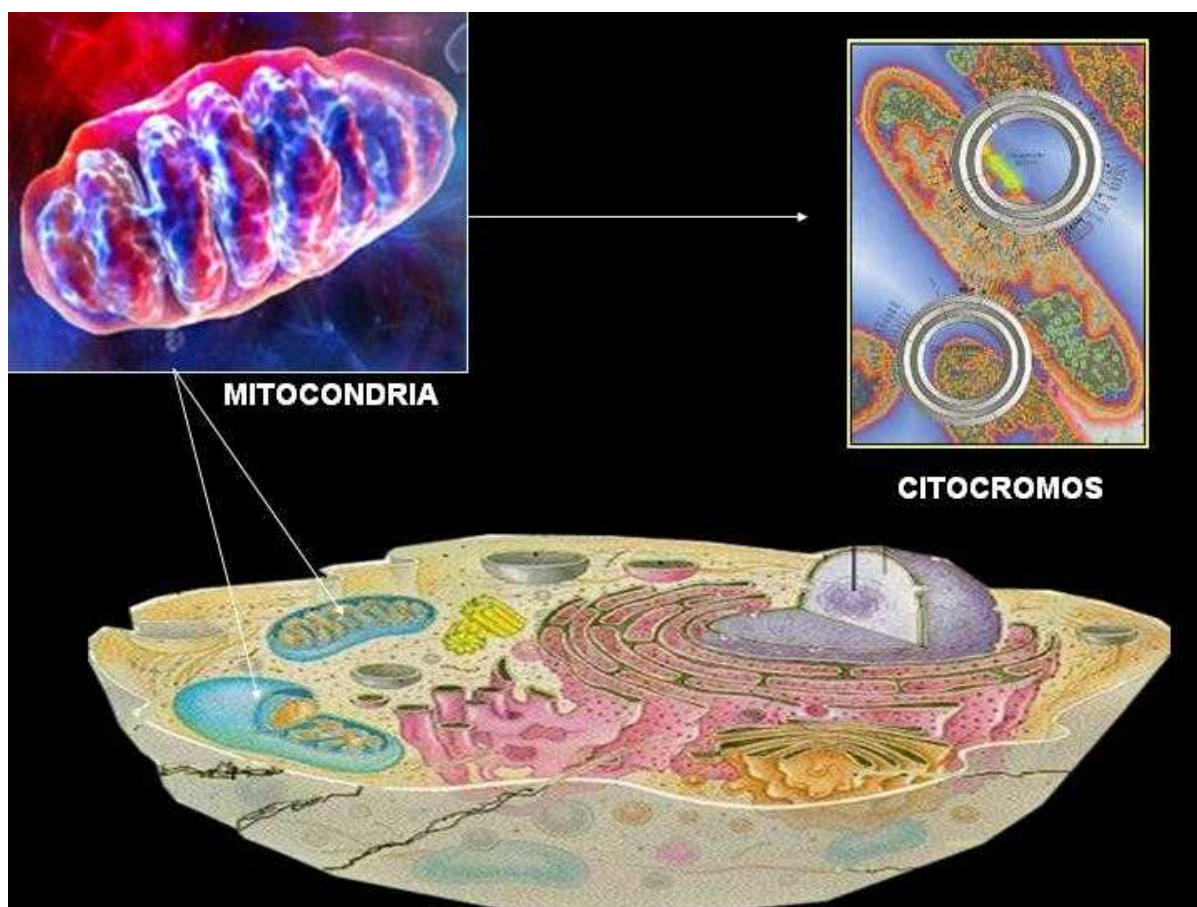
Teixeira *et al.* (2004), utilizaram em um estudo pombos como animais experimentais, tratamento de fratura de úmero com BMP e como carreador hidroxiapatita e concluíram que a BMP pode não ter permanecido por tempo suficiente no local desejado para estimular a diferenciação celular, ou pela rápida absorção da hidroxiapatita ou pela falta de uma membrana osteopromotora.

Apesar de associadas ao colágeno, as BMPs são classificadas como não colágenas. E o colágeno tem sido amplamente utilizado como carreador para as proteínas morfogenéticas do osso (CANOVA, 2003).

2.7 TERAPIA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Os aparelhos de laser tornaram-se extensamente e cada vez mais usado na medicina. O uso da terapia com laser de baixa potência já foi amplamente estudado e seus efeitos em condições patológicas altamente comprovadas, entre estas aplicações para o laser estão: diminuição da dor, feridas e lesões nervosas. O efeito bioestimulatório do laser de baixa potência descoberto em 1960 onde foi

demonstrado o aumento na síntese de colágeno dentro de feridas da pele (KHADRA *et al.*, 2004a).



Fonte: própria

Figura 4: representação celular, contendo mitocôndria e os citocromos.

A terapia com laser de baixa potência parece ser promissora na aceleração do reparo de lesões em diferentes tecidos biológicos, pois tem o atributo de ser uma técnica de tratamento que emprega procedimentos não-invasivos, não-patogênicos, não-químicos e não-térmicos (FREITAS, 2001).

Lirani; Lazaretti-castro (2005), afirmam que existem muitas evidências científicas que demonstram os efeitos biológicos positivos do laser de baixa intensidade sobre o tecido ósseo. É difícil saber qual a dose de energia necessária para estimular a osteogênese em diferentes estados biológicos como, por exemplo,

no osso normal, naquele com atraso de consolidação ou no osteoporótico, necessitando de estudos que formem protocolos de aplicação.

O estímulo de incremento ósseo se consegue tanto com substâncias químicas como pela utilização de ultra-som, emprego de campos eletromagnéticos, e mais recentemente pela terapia do laser de baixa potência. O laser de baixa intensidade apresentou resultados promissores na década de 60 quando as pesquisas neste campo iniciaram-se (PRETEL, 2005).

Khadra *et al.* (2004), confirmam o efeito bioestimulatório positivo da terapia com o laser de baixa potência, mas estes efeitos dependem da habilidade dos tecidos de responder à energia clara. Os mecanismos estimulatório da cicatrização óssea não são bem compreendidos, mas pode ser multifatorial que incluem: promoção da angiogênese, produção de colágeno, proliferação celular e diferenciação osteogênica entre outros.

Karu *et al.* (1995), afirma que os efeitos do laser de baixa intensidade são extremamente dose-dependente. Estes efeitos dependem da fluência, energia, intensidade e comprimento de onda. Estas afirmações são confirmadas tanto *in vitro* como *in vivo*.

A hipótese mais provável para a melhora do crescimento do tecido ósseo é que a energia do laser possa excitar as porfirinas e os citocromos (que são cromóforos intracelulares) e desta maneira induzir um aumento da atividade celular, aumentando a concentração de ATP e liberando cálcio (FREITAS, 2001).

Freitas (2001), afirma que o tecido ósseo irradiado por laser de baixa potência pode apresentar aumento da vascularização e aceleração dos processos biológicos envolvidos no reparo de lesões, aumento da calcificação da matriz óssea, maior resistência mecânica no tecido ósseo neoformado e aumento do número de

osteoblastos e osteoclastos, além da proliferação e diferenciação de células osteoblásticas. Com isso as propriedades e os efeitos da irradiação por laser em materiais biológicos têm sido amplamente pesquisados, e alguns resultados já são aplicados em novas técnicas, como, por exemplo, os procedimentos de micro-cirurgias.

O laser de baixa intensidade pode promover maior velocidade de cicatrização e reparo, aceleração da neovascularização, oclusão de feridas, maior formação do tecido de granulação, maior número de fibroblastos, maior número de fibras colágenas, aumento na síntese de ATP, liberação de histamina pré-formada, redução do pH intracelular e alterações na proliferação e motilidade celular, fagocitose, resposta imune e respiração (LIRANI, 2004).

Freitas (2001), concluiu que a irradiação do laser de baixa potência acelerou a velocidade de consolidação de lesão de tíbia produzida cirurgicamente. Estes resultados reforçam observações já existentes. Avanços na elucidação desta questão fundamental podem contribuir para que o laser de baixa potência possa ser futuramente uma ferramenta promissora para a pesquisa da regeneração óssea.

Segundo Khadra *et al.* (2004a), estudos investigaram o efeito da terapia com laser de baixa potência no osso alveolar após extração dentária. E mostrou o aumento da deposição óssea, sugerindo o efeito de ossificação. Sugerindo que a terapia pode ser usado como uma ferramenta não-invasiva e eficaz para realçar a fusão óssea em alguns tipos de fraturas.

Silva Júnior *et al.* (2002), estudaram a ação da terapia com laser de baixa potência em um modelo de defeito ósseo em fêmur de ratos, e a morfometria computadorizada demonstrou maior mineralização 7 dias após a cirurgia no grupo

tratado. A aplicação diária de LLLT por mais de sete dias acelera a neoformação trabecular de acordo com os resultados.

Barushka *et al.* (1995), em estudo feito com fraturas de tíbias em 292 ratos, obteve resultados que demonstraram que a terapia com laser de baixa intensidade pode aumentar a atividade e o número de osteoblastos e osteoclastos. Confirmando esses resultados, Lirani (2004) ainda afirma que a terapia laser é capaz de acelerar o processo de reparo ósseo.

Lirani e Lazaretti-castro (2005), que avaliou os efeitos da terapia laser de baixa potência em células osteoblásticas humanas utilizou doses diárias de laser AsGaAl (830nm, densidades de energia de 1,7 a 25,1J/cm²) por até 10 dias, e o aumento do cálcio intracelular indicou que estas células respondem à terapia com laser de baixa potência.

Baruska *et al.* em 1995, investigaram o efeito do laser hélio-neônio sobre o reparo ósseo e observaram que nos animais irradiados com o laser He-Ne ocorreu mudança na relação osteoblastos - osteoclastos e acúmulo mais rápido de matriz osteóide no local da lesão provocada.

Segundo Khadra *et al.* (2004b), a análise histológica de seu estudo revelou que a terapia com o laser de baixa intensidade estimulou o depósito de cálcio, fósforo e proteína. Indicando assim que a aplicação do laser de baixa potência acelera a maturação do tecido ósseo novo e realça o metabolismo ósseo no processo de cicatrização.

Freitas em 2001, concluiu e afirmou que os resultados obtidos por seu estudo, pelas diferentes análises realizadas apontam uma sólida indicação de que as alterações provocadas pelos efeitos da irradiação por laser promovem uma ação estimulante no reparo da lesão durante a primeira semana de irradiação e uma ação

inibitória na segunda semana. Deve ser considerado que um duplo mecanismo possa estar envolvido na interação da irradiação eletromagnética do laser com processos de regeneração do tecido ósseo. O primeiro mecanismo, foto-estimulatório, pode estar relacionado com a ativação de osteoblastos na produção da matriz óssea, promovendo o aumento significativo da área trabecular e do número de vasos sanguíneos na primeira semana de irradiação consecutiva. Num estágio seguinte, um mecanismo foto-inibitório deve diminuir a atividade osteoblástica e concomitantemente estimular a atividade osteoclástica, promovendo assim, a reabsorção da matriz óssea e inibindo a proliferação de vasos sanguíneos na segunda semana de irradiação.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar morfométricamente e histologicamente a ação do laser de baixa potência (AsGaAl) com comprimento de onda λ 650nm em defeitos ósseos, preenchidos com enxerto composto de matriz orgânica bovina e Proteína Morfogenética do Osso (BMP).

4. METODOLOGIA

4.1 Animais de experimentação

A amostra foi composta de 36 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, com peso corporal *variando de 300 a 350* gramas, adultos. Procedentes do Biotério Central – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Os animais foram confinados em gaiolas de 0,15 m², com 6 animais por gaiola, mantidos em foto período de 12 horas, temperatura e umidade mantidas por ar condicionado, ruídos mínimos, ração sólida¹ e água “*ad libitum*”, ficando sob observação por um período de dois dias, antes da sua utilização no experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FUFMS), sob protocolo nº 131/2006 (Anexo-A).

¹ Nuvilab – Nuvital Nutrientes Prod. Vet. Ltda – Curitiba PR

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais, conforme o procedimento realizado:

- Grupo 1: constituído por 12 animais. Defeitos ósseos induzidos e preenchidos com substância osteoindutora associada à aplicação de laser de baixa potência. Que foi denominado de grupo BMP+Laser.

- Grupo 2: constituído por 12 animais. Com defeito ósseo induzido e preenchido com substância osteoindutora sem aplicação do laser de baixa potencia. Que foi denominado de grupo BMP.

- Grupo 3: constituído por 12 animais. Com defeito ósseo induzido e sem nenhum tratamento. Que foi denominado de grupo controle.

4.3 Produção dos defeitos ósseos

Os animais foram submetidos à anestesia dissociativa com 10mg/100g de peso de quetamina associada a 0,4mg/100g de xilazina, por via intraperitoneal.

Após o procedimento anestésico e constatado o efeito da droga, foi realizada a tricotomia da face lateral da coxa direita, em extensão suficiente para permitir a visualização da região a ser abordada. O animal foi, então, posicionado em decúbito lateral, e o local da incisão preparado com anti-sepsia.

Foi realizada uma incisão de acesso ao fêmur direito. Após a incisão da fáscia lata, foi localizada a diáfise femoral e na face crânio-lateral a aproximadamente 50mm da epífise proximal foi realizado um defeito ósseo empregando brocas multilaminadas do tipo esférica nº 2 (KG Sorensen) acopladas a uma peça reta (Kavo – Kavo do Brasil) acionado por motor de implante (Easy Implant – Easy Equipamentos) a 46.000 RPM sob irrigação constante com soro fisiológico, perfurando a cortical do osso até atingir o canal medular.

Nos grupos 2 e 3 o defeito foi preenchido com uma pasta formada de substância osteoindutora Gen – Pró² composta pela aglutinação de matriz orgânica de osso, osso bovino inorgânico, proteínas morfogenéticas do osso, carregados por hidroxiapatita e colágeno, na proporção de 10:1, homogeneizado com solução salina 9%.

Para que o biomaterial não sofresse dispersão os defeitos foram recobertos com membrana biológica constituída de cortical óssea bovina descalcificada Gen Derm³. Após estes procedimentos foi feita a síntese por planos com nylon poliamida 0,30, agulhado. E em seguida, os animais dos três grupos receberam uma dose única de antibiótico (Penicilina associada a estreptomicina) em dose de 1mg/100g por via intramuscular, para profilaxia de infecções e Dipirona como analgésico.

²Gen-Pro Baumer biomaterial division S/A

³ Gen Derm Baumer biomaterial division S/A

4.4 Aplicação do Laser Diodo Arsenieto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)

Foi utilizado o Laser AsGaAl da marca Laserline® modelo Inova, com potência de 50mW, área do feixe de $0,1\text{cm}^2$, e comprimento de onda de λ 650nm. A forma de aplicação foi pelo método transcutâneo pontual, com dose pré-determinada de 4 joules/ cm^2 e tempo de 80 segundos para uma área de 1cm^2 , por meio de aplicações diárias desde o 1º dia de pós-operatório sobre a região da lesão no grupo experimental 3.

4.5 Eutanásia

Foi realizada a eutanásia de quatro ratos por grupo no 7º, 14º e 28º dia de pós-cirúrgico, para a retirada do fêmur. Os animais sofreram eutanásia mediante dose letal de tiopental sódico por via intraperitoneal (100mg/Kg).

4.6 Procedimentos Histológicos

Os segmentos destinados a histologia foram fixados em formol a 10% por 24 horas. Após este período, descalcificados por EDTA, incluídos em blocos de parafina

e submetidos a cortes transversais de 5µm de espessura preparando-se lâminas com dois cortes cada uma coradas com HE (hematoxilina e eosina).

4.7 Análise Morfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio do programa *Image Pro Plus* (versão 4.5). Foram analisados 5 quadrantes por lâmina, sendo quatro periféricas e uma central, realizando-se a contagem da área total de osso neoformado.

4.8 Análise Histopatológica

Foi realizada uma análise qualitativa e descritiva do material obtido.

4.9 Análise Estatística

Os dados foram tabulados de acordo com a distribuição dos valores em cada grupo relacionados a cada período.

Para a análise estatística foi utilizado o Software BioEstat 3.0. O gráfico foi plotado no Software Microsoft Excel 2003.

Para cada grupo foi testada a forma de distribuição dos valores. A hipótese de nulidade referiu-se à distribuição normal dos valores e a hipótese alternativa à não distribuição normal. O nível de decisão foi estabelecido em $p < 0,05$. Para tal análise foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os resultados mostraram que a maioria das ordenações de valores não apresenta distribuição normal, considerando para as comparações teste não-paramétrico.

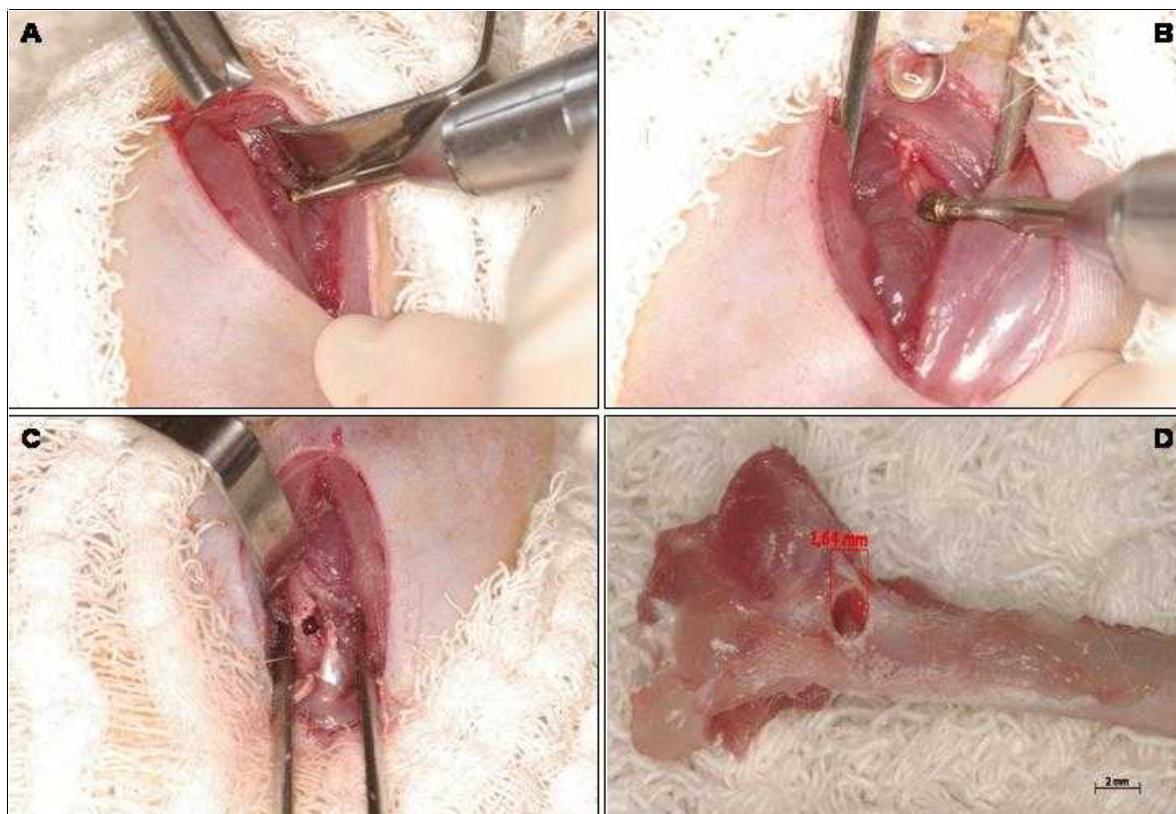


Figura 5: Figura representativa: **A** - incisão cirúrgica com exposição do osso fêmur e início da confecção da falha óssea; **B** confecção da falha óssea utilizando broca multilaminada do tipo esférica nº 2; **C** - perfuração da cortical do osso até atingir o canal medular; **D** fêmur dissecado, onde observa-se a falha óssea produzida.



Figura 6: Painel do laser – Laserline modelo Inova 50mw – 650nm de comprimento de onda.

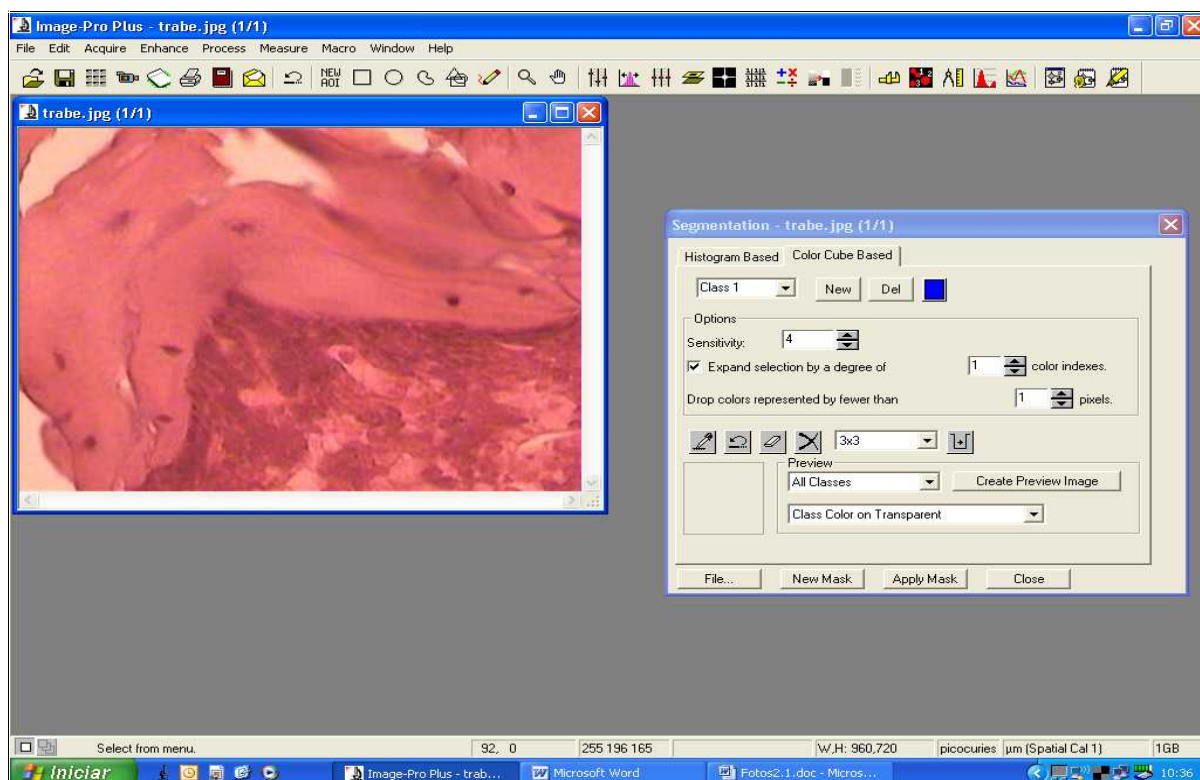


Figura 7: Figura representativa da tela do programa *Image Pro Plus* (versão 4.5), utilizado durante a análise morfométrica.

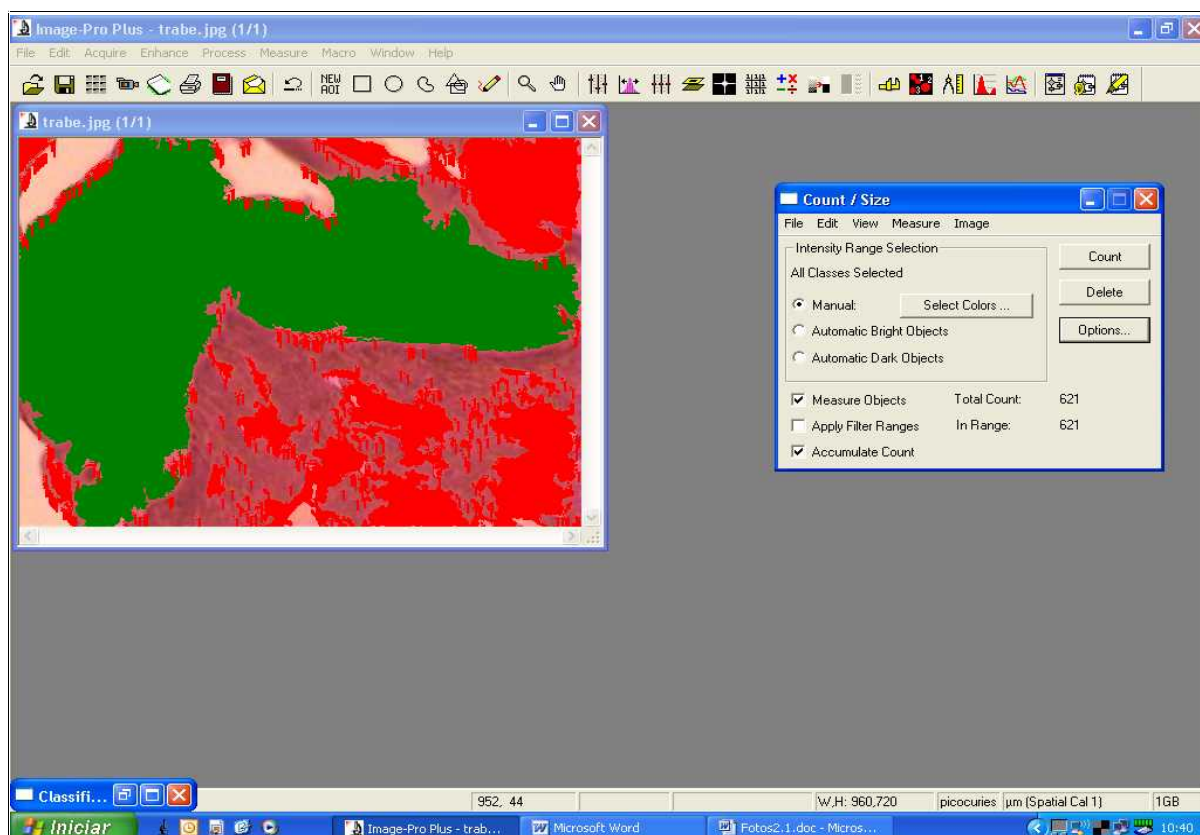


Figura 8: Segmentação da imagem utilizando o programa *Image Pro Plus* (versão 4.5) para mensuração da neoformação óssea.

5. RESULTADOS

Em primeira análise, compararam-se os valores obtidos para cada período (7, 14, 28 dias de pós-operatório) entre os grupos (Grupos 1 - BMP+Laser; Grupo 2 - BMP e Grupo 3 - controle).

A segunda comparação averiguou a hipótese de alteração significativa em cada um dos grupos de acordo com a evolução do período (7, 14 e 28) dias.

O teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns foi utilizado para a comparação intra e intergrupos em cada período. O valor de decisão foi $p < 0,05$.

Os resultados da análise morfométrica estão apresentados na tabela 1. Todas as comparações apresentaram-se diferentes estatisticamente conforme tabela 2.

Tabela 1 – Resultado da análise morfométrica dos 5 campos das 4 amostras dos grupos pesquisados em 7, 14 e 28 dias. Campo Grande - MS, 2007.

Amostra	Campos	7 dias			14 dias			28 dias		
		BMP LLLT	BMP	Controle	BMP LLLT	BMP	Controle	BMP LLLT	BMP	Controle
1	1	70.1	53.8	32.1	98.3	75.5	35.9	110.1	89.2	43.1
	2	68.7	58.7	23.4	99.2	69.9	34.6	112.0	86.1	46.0
	3	67.2	56.9	18.0	100.7	78.1	35.9	111.0	84.7	42.7
	4	66.4	50.0	26.2	99.2	77.6	34.9	100.0	87.2	43.4
	5	67.0	54.2	24.1	99.1	76.8	33.4	99.7	87.7	42.4
2	1	65.2	70.2	29.3	101.0	75.5	40.2	105.2	85.3	42.9
	2	64.0	45.1	25.7	98.0	85.5	35.9	111.0	85.1	43.7
	3	68.1	53.8	30.1	95.4	73.1	34.1	99.8	83.9	44.1
	4	69.5	54.0	23.8	98.7	76.7	33.7	112.0	84.1	42.0
	5	69.4	54.1	28.0	96.2	77.3	34.2	110.1	85.1	43.2
3	1	65.9	55.2	23.4	97.4	79.1	35.2	106.2	87.1	45.1
	2	69.1	50.1	25.8	96.8	70.6	31.5	103.7	86.3	41.9
	3	65.9	60.9	22.1	99.1	69.2	41.0	100.0	84.9	43.0
	4	70.1	50.0	29.2	98.7	77.5	32.7	115.0	87.5	43.8
	5	68.6	55.9	25.3	97.2	78.0	34.2	114.0	86.1	44.1
4	1	70.0	60.0	32.1	95.2	80.0	33.7	114.2	89.2	43.6
	2	68.1	57.0	22.4	99.9	73.2	34.1	110.1	84.2	42.4
	3	67.5	56.3	26.7	97.9	75.3	34.5	104.6	85.4	45.1
	4	64.3	52.9	25.8	106.1	79.1	31.8	114.8	86.7	43.3
	5	65.1	48.0	22.4	99.7	72.7	36.6	100.4	84.9	44.3
Média		67.5	54.9	25.8	98.7	76.0	34.9	107.7	86.0	43.5
Dp		2.0	5.4	3.6	2.4	3.9	2.4	5.6	1.6	1.1

Tabela 2. Resultado das medias da análise morfométrica indicando a evolução da neoformação óssea ao longo dos 28 dias. Campo Grande – MS, 2007.

Período	BMP + LLLT	BMP	Controle	Valor de p
7	67.5	54.9	25.8	p<0,0001
14	98.7	76.0	34.9	p<0,0001
28	107.7	86.0	43.5	p<0,0001
Média	91,4	72,3	34,7	
Dp	20,9	16,0	8,9	
Valor p	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	

Nota: Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

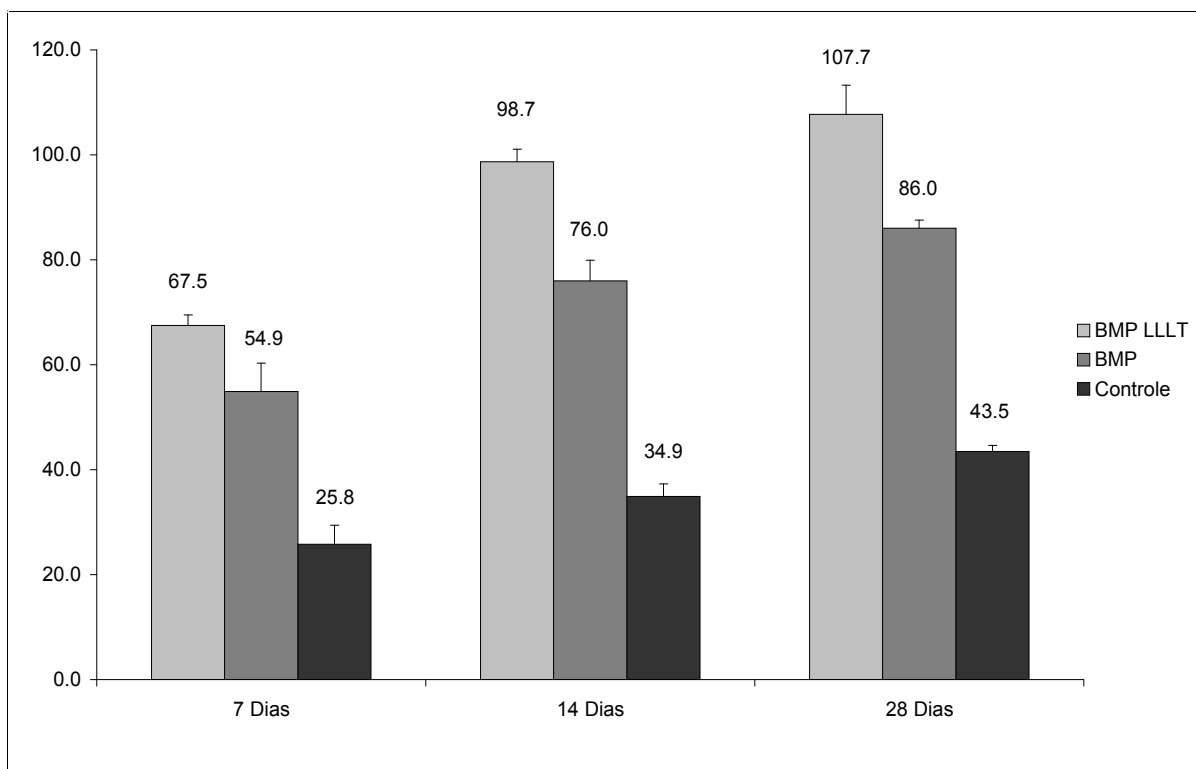


Figura 9: Comparação dos valores de neoformação óssea, intra e intergrupos nos períodos de 7, 14 e 28 dias. Valores expressos em média e desvio padrão. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

5.1 Análise Histopatológica

• Aos 7 dias após a lesão

Grupo com defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) associado à aplicação de laser - na área do defeito observa-se presença de tecido conjuntivo fibroso com neoformação de vasos, áreas de tecido ósseo neoformado e grande concentração de osteócitos com evidentes canalículos.

Grupo com defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) sem aplicação de laser - na área do defeito ósseo houve presença de tecido

conjuntivo fibroso com neoformação de vasos, e algumas escassas áreas de tecido ósseo neoformado, além da presença de osteócitos.

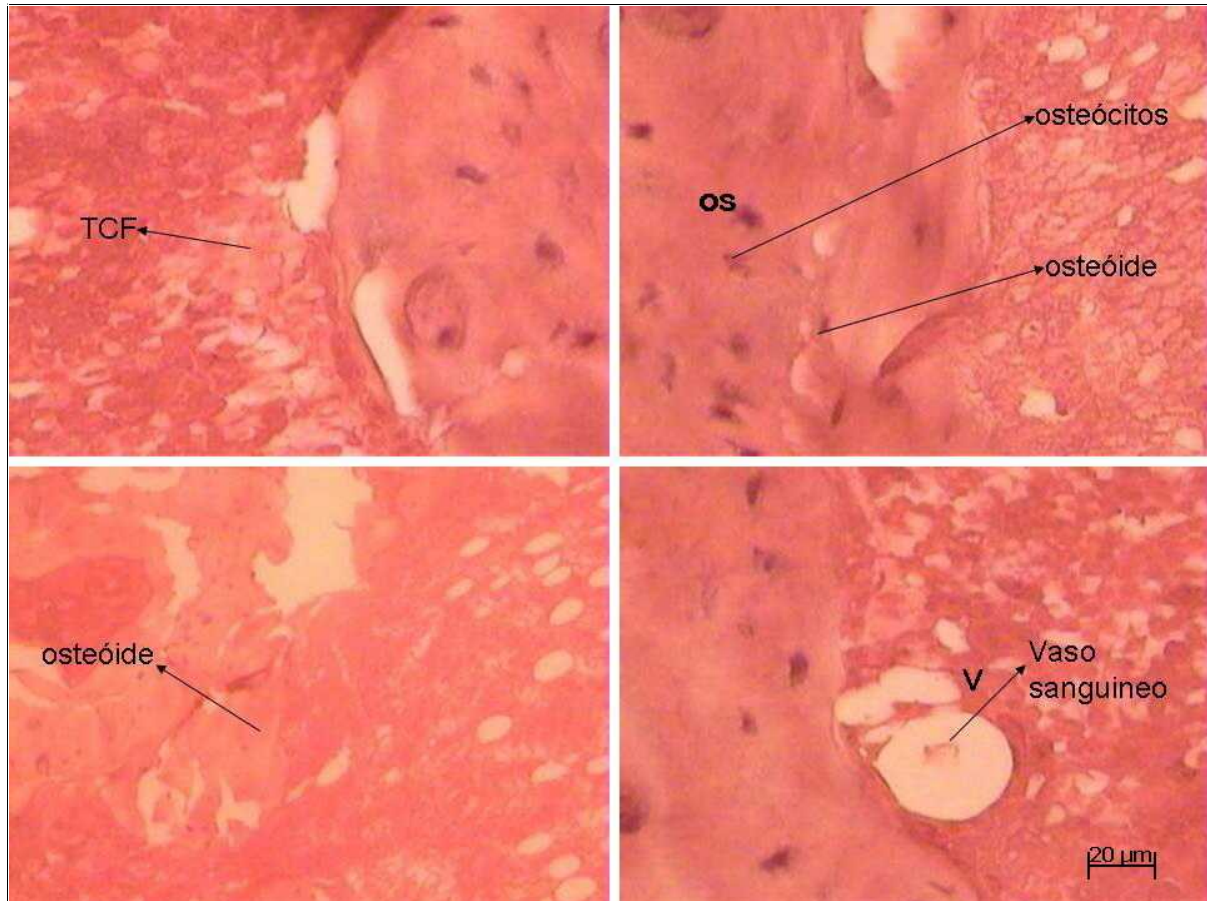


Figura 10: Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) associado à aplicação de laser de baixa potência (BMP+Laser) aos 7 dias - observa-se a presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) com neoformação de vasos (V), e algumas escassas áreas de tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos (os). Barra de escala 20μm.

Grupo com defeito sem preenchimento de substância osteoindutora (BMP) e sem aplicação de laser (grupo controle) – presença de área medular preenchida com material fibroso e escassas áreas de tecido ósseo neoformado.

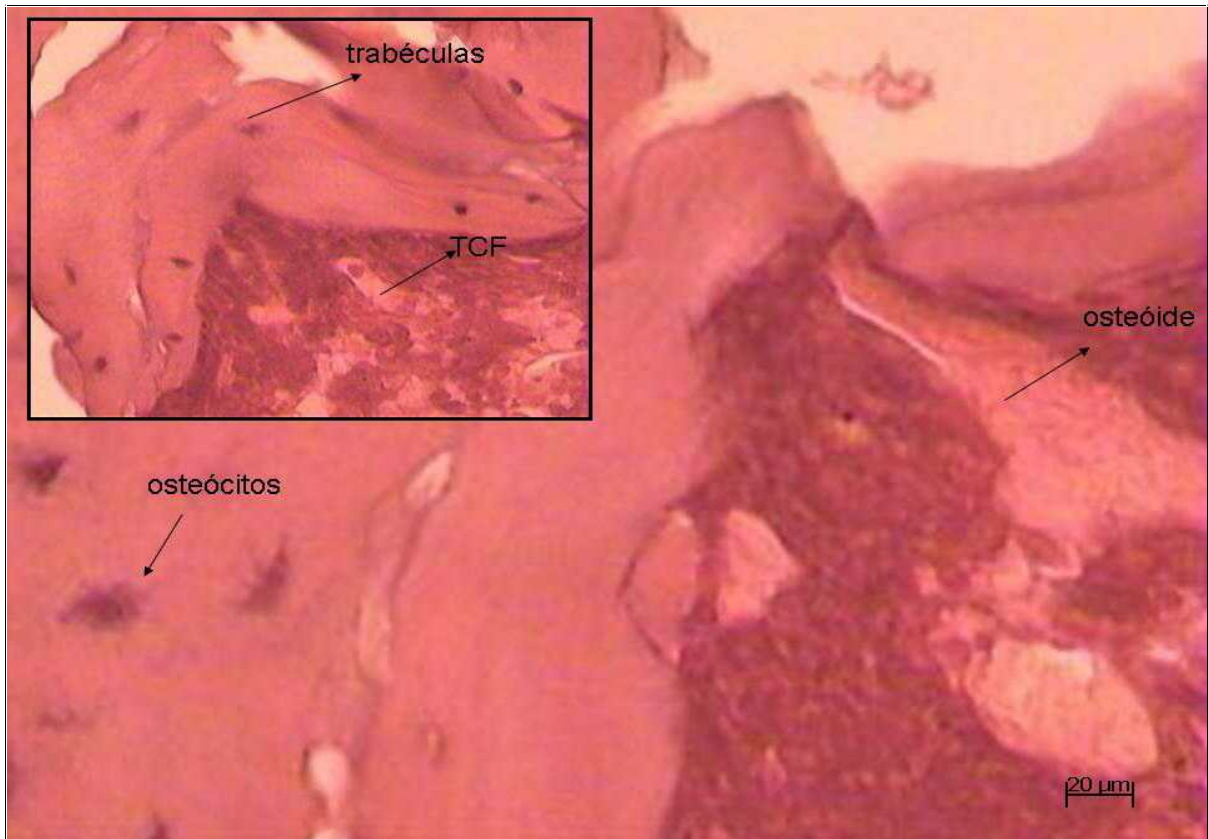


Figura 11: Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) aos 7 dias - observa-se a presença de tecido conjuntivo fibroso (TCF) algumas escassas áreas de tecido ósseo neoformado, presença de osteócitos (os). Barra de escala 20μm.

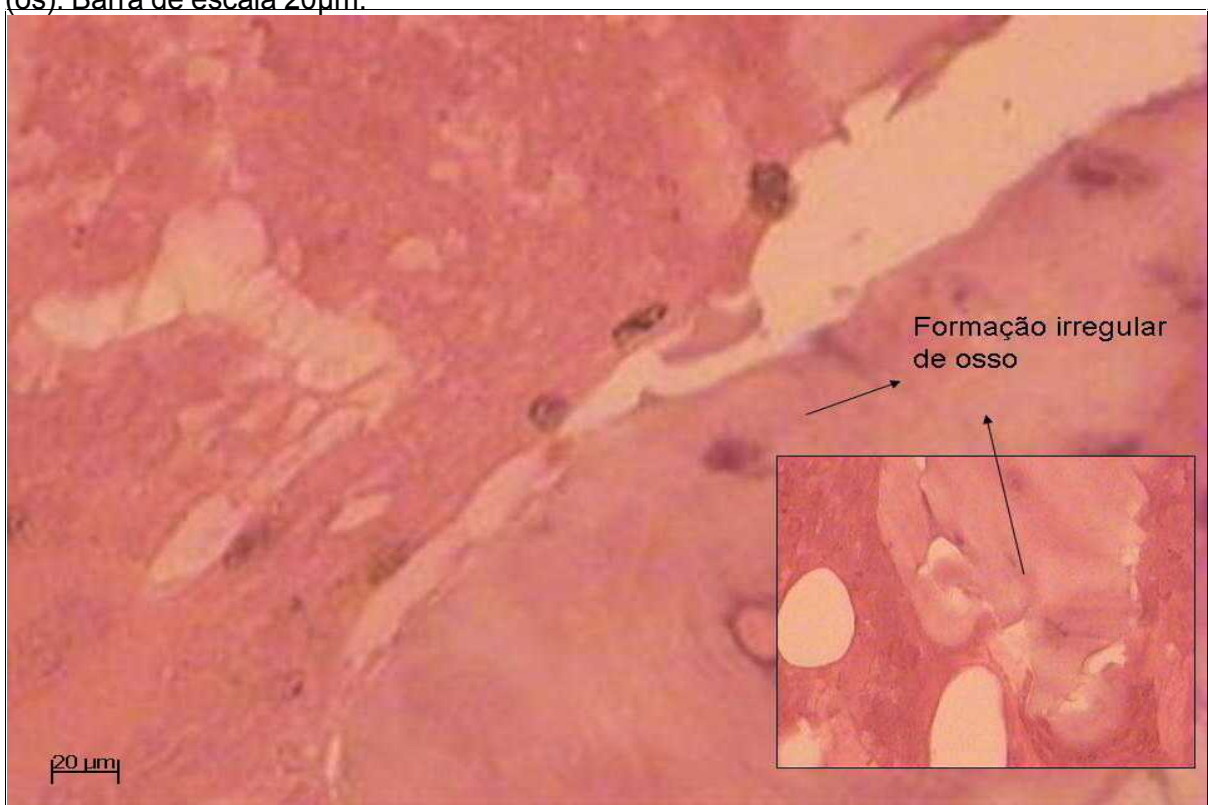


Figura 12: Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo grupo controle aos 7 dias - observa-se a formação de tecido ósseo irregular. Barra de escala 20μm.

- *Aos 14 dias após a lesão*

Grupo com defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) associado à aplicação de laser - apresenta trabéculas ósseas neoformadas exibindo numerosos osteoblastos alinhados em sua periferia, intensa presença de neoformação de vasos.

Grupo com defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) sem aplicação de laser - mostra a presença de tecido de preenchimento e de trabéculas ósseas neoformadas, numerosos osteoblastos não alinhados e presença de células gigantes.

Grupo com defeito ósseo sem nenhum tratamento (grupo controle) - lesão cavitária evidente presença de neovascularização, menor concentração de osteoblastos quando comparada aos outros grupos.

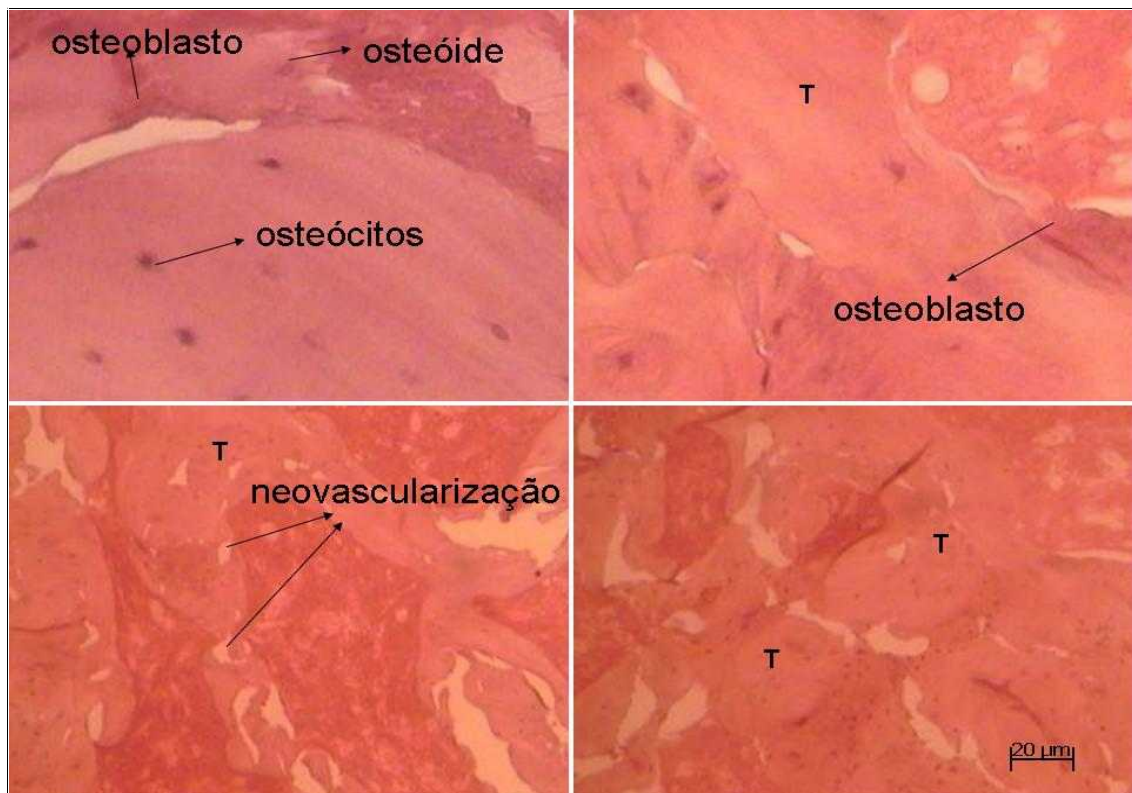


Figura 13: Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) e aplicação de laser aos 14 dias - observa-se trabéculas ósseas neoformadas (T), numerosos osteoblastos alinhados em sua periferia, intensa presença de neovascularização. Barra de escala 20μm.

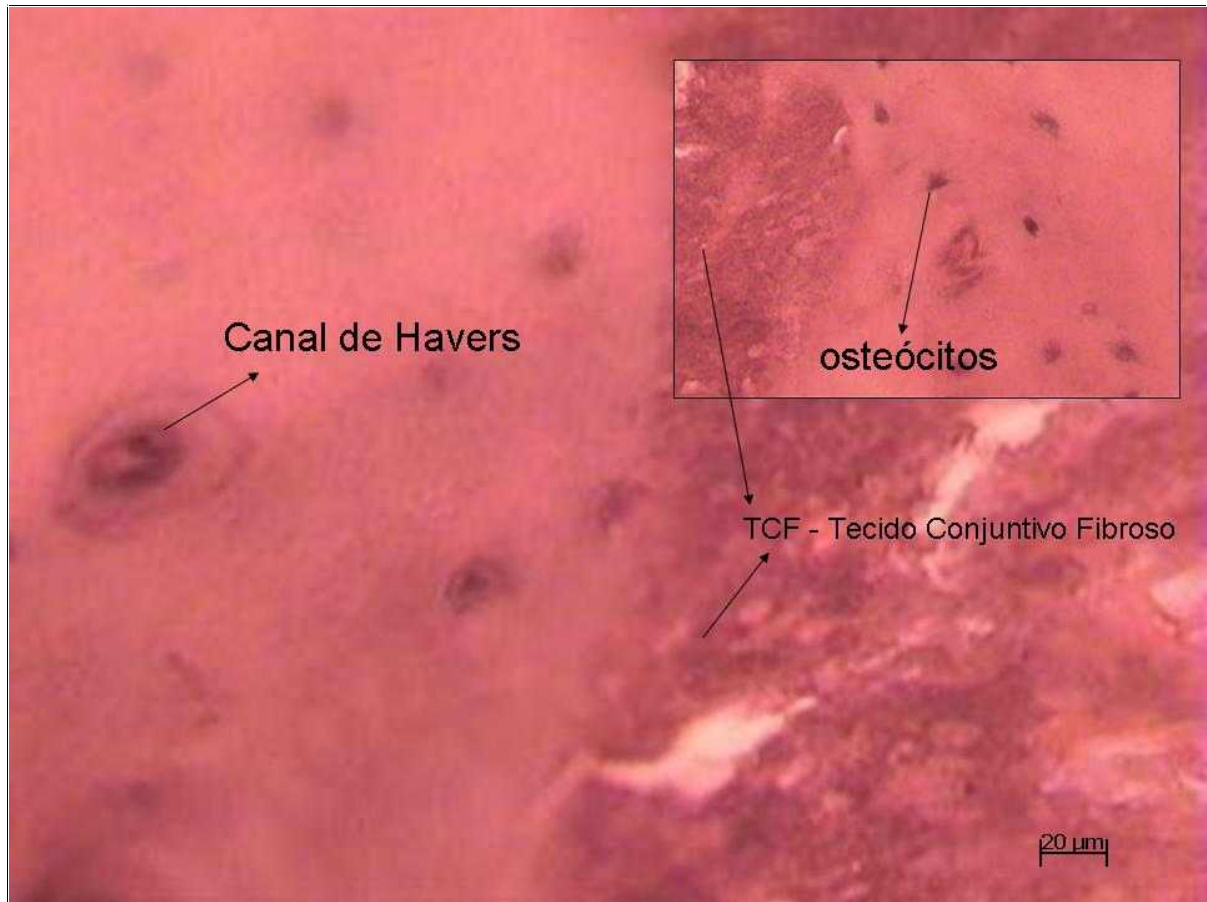


Figura 14: Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo sem preenchimento com BMP e aplicação de laser (Grupo Controle) aos 14 dias - observa-se presença de tecido fibroso (TCF), canal de havers e pequena proliferação de osteócitos. Barra de escala 20μm.

- *Aos 28 dias após a lesão*

Grupo com defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) associado à aplicação de laser - presença de trabéculas ósseas densas com aspecto de osso lamelar e fragmentos do biomaterial envoltos por tecido ósseo neoformado. Observa-se reconstituição do espaço medular.

Grupo com defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) sem aplicação de laser - presença de osteoblastos e osteócitos alinhados tanto na periferia como dentro da trabécula, respectivamente. Observa-se canal medular mal definido e de pequena dimensão.

Grupo com defeito ósseo sem nenhum tratamento (grupo controle) - presença de área cavitária com proliferação de células ósseas neoformadas e tecidos conectivos.

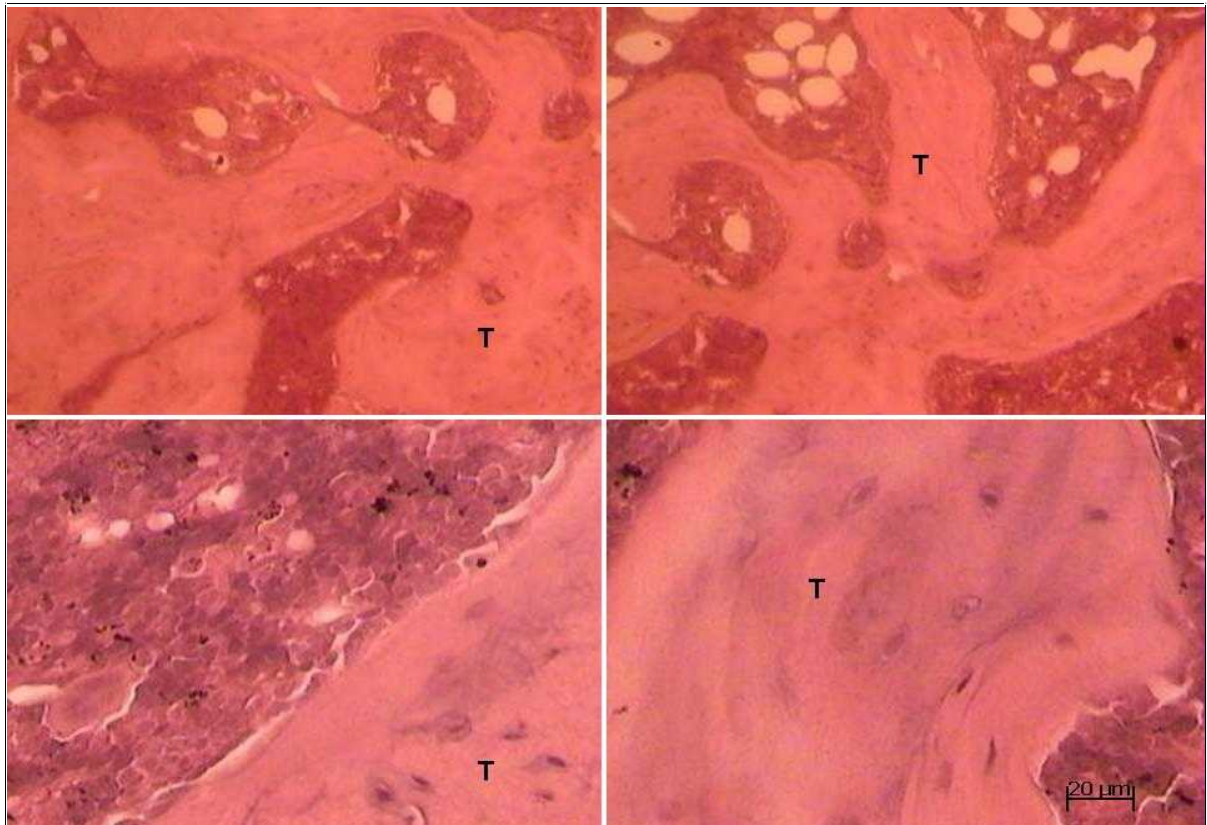


Figura 15: Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) e aplicação de laser aos 28 dias - observa-se presença de trabéculas ósseas (T) densas com aspecto de osso lamelar. Barra de escala 20µm.

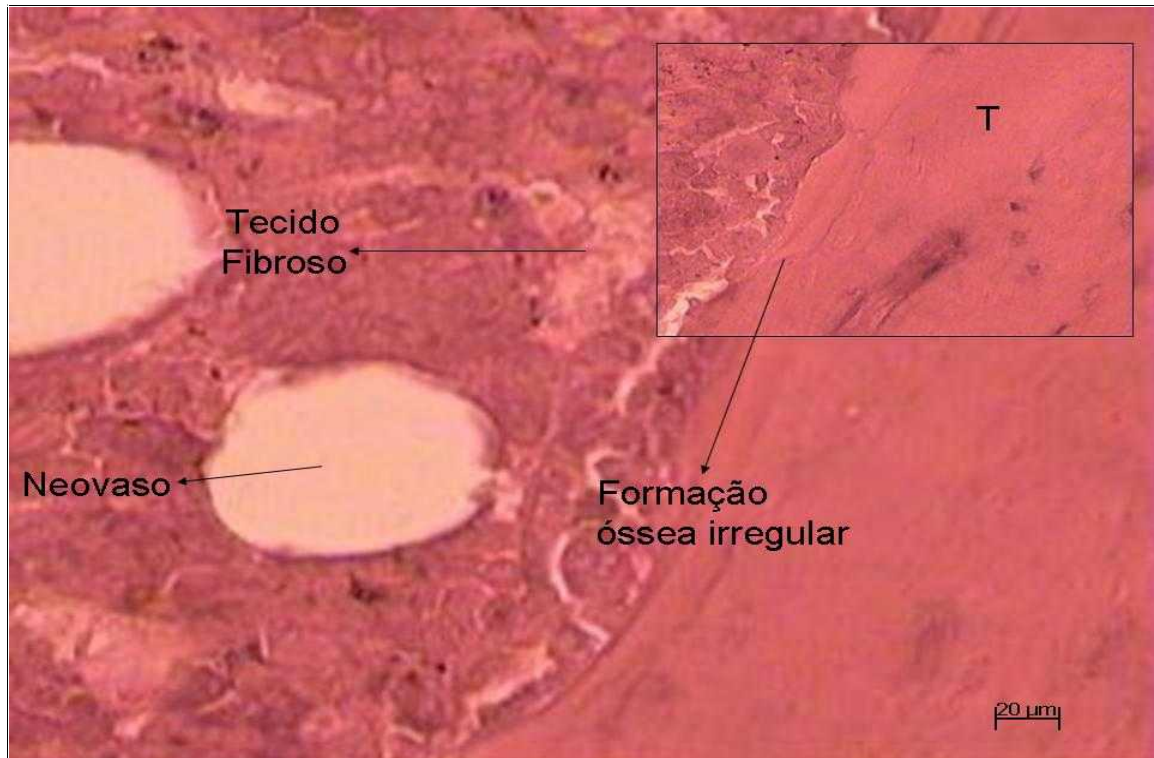


Figura 16: Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo preenchido com substância osteoindutora (BMP) sem aplicação de laser aos 28 dias - observa-se a presença de tecido fibroso, neoformação de vasos e áreas de formação óssea irregular e trabéculas ósseas (T). Barra de escala 20μm.

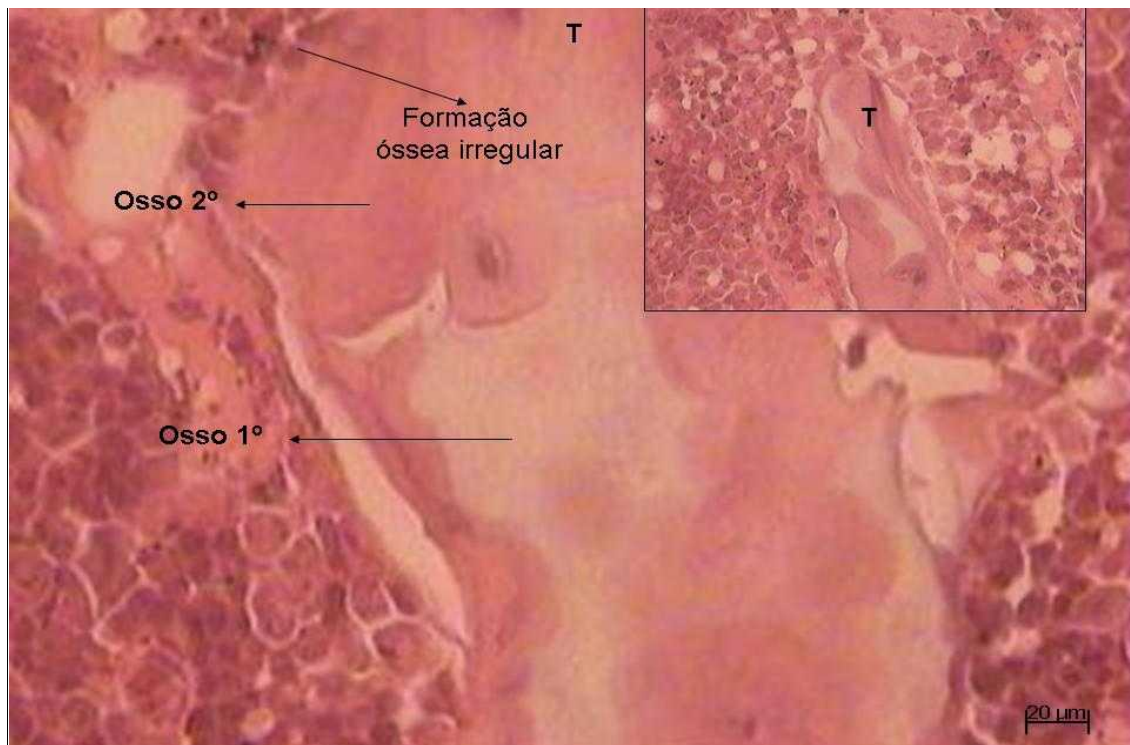


Figura 17: Montagem de fotomicrografia de lâmina do defeito ósseo sem preenchimento com BMP e aplicação de laser (Grupo Controle) aos 28 dias - observa-se presença proliferação de células ósseas neoformadas ainda de forma irregular e trabéculas ósseas (T). Observar a diferença na formação de osso primário e secundário. Barra de escala 20μm.

6. DISCUSSÃO

A opção pela utilização de ratos neste estudo ocorreu devido a maior facilidade de trabalho em laboratório, além dos recentes estudos tanto com foco nas proteínas morfogenéticas do osso, como na terapia com laser de baixa potência ou ambos associados estarem citando e observando resultados favoráveis com este modelo animal.

Mussano *et al.* (2007), realizaram uma revisão sistemática dos estudos controlados e randomizados, para avaliar a eficácia clínica do uso das BMPs na regeneração óssea. Os dezessete estudos selecionados em humanos, foram divididos pelo segmento ósseo tratado (10 em vértebras lombares, 1 em vértebra cervical, 3 em tíbia, 1 em fíbula e 2 em processo alveolar), tamanho da série (7 estudos com 30 pacientes, 6 envolveram entre 30 e 100 pacientes e 4 analisaram mais de 100 pacientes) e tipo de BMP. E concluíram que estas divisões mostraram claramente a falta de uniformidade entre os estudos publicados e evidencia a dificuldade em sumariar os resultados. Nota-se então a necessidade de maiores estudos na área.

Neste estudo foi utilizado o protocolo já testado e usado por Carvalho *et al.* (2006) em estudo semelhante a este presente experimento.

A análise estatística dos grupos descartou a hipótese de nulidade, demonstrando a existência de diferença significativa entre os grupos com $p < 0,0001$ (valor de decisão $p < 0,05$), sendo que o grupo tratado com associação da BMP com o laser de baixa potência, obteve maiores valores de neoformação óssea quando

comparado com os outros dois grupos (só BMP e grupo controle). Estes valores maiores foram comprovados no três dias de pós-operatório (7º, 14º e 28º).

- Eutanásia no 7º dia de pós-operatório

Observou-se que as lâminas dos animais com defeito ósseos tratados com BMP + Laser apresentaram tecido conjuntivo fibroso com neoformação de vasos na área do defeito, bem como áreas de tecido ósseo neoformado e grande concentração de osteócitos com evidentes canalículos. Estes resultados corroboram o estudo realizado por Nicolau *et al.* (2003), que estudaram a atividade das células ósseas após a utilização da terapia do laser de baixa potência (AsGaAl) no local do ferimento ósseo. Os animais foram avaliados no 2º, 4º, 6º e 8º dias após a cirurgia e verificou-se que a atividade e o volume do osso eram mais elevados no grupo irradiado.

No grupo tratado somente com BMP observou-se tecido conjuntivo fibroso com neoformação de vasos e algumas escassas áreas de tecido ósseo neoformado. Ciani *et al.* (2006), utilizando um modelo animal diferente do presente estudo, avaliaram o uso de um *pool* de proteína osteoindutora de origem bovina na regeneração de defeitos ósseos segmentares empregando-se coelhos e observaram no grupo controle ponte óssea unindo as extremidades ósseas seccionadas em quatro animais; entretanto, o osso neoformado apresentava baixa radiopacidade e ocupava em torno de 80% da falha. Já nos membros tratados aos 60 dias de pós-operatório havia nítido limite do defeito, com pequeno crescimento ósseo na borda

proximal apenas em dois coelhos. Representando a osteoindução causada pela BMP, mesmo com modelos animais diferentes.

Já o grupo sem nenhum tratamento apresentou área medular preenchida com material fibroso e escassas áreas de tecido ósseo neoformado, resultado também obtido por Carvalho *et al.* (2006) e por Gerbi *et al.* (2008) que observaram, além disso, tecido necrótico e reação inflamatória severa.

- Eutanásia no 14º dia de pós-operatório

No presente estudo, o grupo tratado com BMP + Laser apresentava trabéculas ósseas neoformadas, exibindo numerosos osteoblastos alinhados em sua periferia, intensa presença de neoformação de vasos. Estes resultados confirmam e reforçam as conclusões de Pretel (2005) que observou no 15º dia após a cirurgia que o leito do defeito ósseo já estava totalmente preenchido pelo biomaterial, com a presença de muitas células, vasos sanguíneos e osteoblastos, presença de tecido ósseo neoformado e ausência de inflamação.

Os resultados obtidos por este experimento no grupo tratado somente com BMP, mostraram a presença de tecido de preenchimento e de trabéculas ósseas neoformadas, numerosos osteoblastos não alinhados e presença de células gigantes. Estes resultados mostram que o tratamento com BMP induz a consolidação do tecido ósseo lesado, mesmo em curto período. Resultados semelhantes foram apresentados em estudos com BMP, como o realizado por Burkus; Dorchak e Sanders em 2003, que investigaram 42 pacientes humanos

submetidos a cirurgia lombar anterior. Todos os pacientes que receberam a BMP mostraram a evidência radiográfica de osteoindução, sendo que 10 pacientes do grupo controle apresentaram formação óssea fora da região lesada, o que não aconteceu no grupo tratado com BMP. E ainda Oakes, Lee e Lieberman em 2003 concluíram que oito dos 48 defeitos tratados com matriz óssea em ratos mostraram total cicatrização em 16 semanas, já no grupo sem implantes nenhum dos defeitos apresentaram esse resultado.

No grupo controle, a lesão provocada ainda apresentava-se cavitária, com a presença de neovascularização, menor concentração de osteoblastos quando comparada aos outros grupos. O que demonstra e confirma outros estudos que afirmam que tanto a aplicação da BMP isolada como associada ao laser de baixa potência produz aceleração da neoformação e da neovascularização de acordo com autores como Gerbi *et al.* (2008); Pretel (2005); Carvalho *et al.*, (2006) e Pinheiro *et al.*, (2003b), entre outros.

- Eutanásia no 28º dia de pós-operatório

O grupo tratado com BMP + Laser deste estudo mostrou a presença de trabéculas ósseas densas com aspecto de osso lamelar e fragmentos do biomaterial envoltos por tecido ósseo neoformado e observou-se reconstituição do espaço medular. Resultado que demonstra a eficiência do laser sobre a BMP acentuando sua ação osteoindutora, além do biomaterial já estar sendo absorvido pelo organismo, provando a eficiência do tratamento. Tal eficiência já foi também citada

por Pinheiro *et al.* (2003b) em um estudo com 24 ratos onde se observou a presença de grandes quantidades de fibras de colágeno no grupo irradiado. Este resultado pode representar um efeito adiantado da terapia com laser de baixa potência (LLLT) no reparo ósseo, pois outros estudos também demonstraram aumento da produção do colágeno depois da aplicação do laser. Como o colágeno é um componente importante da matriz extracelular do osso e as quantidades aumentadas, como vistas neste estudo, podem indicar um efeito positivo da terapia com laser de baixa potência (LLLT) na cicatrização óssea.

Os resultados observados no grupo tratado com BMP sem aplicação do laser de baixa potência só reforçam que o laser acelera a atuação da BMP, pois o processo de recuperação da fratura neste grupo encontra-se menos evoluído do que o grupo BMP + Laser, mostrando a presença de osteoblastos e osteócitos alinhados tanto na periferia como dentro da trabécula, respectivamente. Observa-se canal medular mal definido de pequena dimensão. Khadra *et al.* (2004b), utilizando somente laser de baixa potência no 28º dia concluíram que os animais do grupo experimental apresentavam significativamente mais cálcio, fósforo e proteína do que o controle. E Lima (2004), estudando a BMP isolada concluiu que somente no 30º dia de pós-operatório ocorreu maior porcentagem de restabelecimento cortical na fratura tratada com biomaterial. O que demonstra que o laser de baixa potência também possui outras finalidades benéficas para o tratamento ósseo, principalmente associado a outros fatores facilitadores.

No grupo sem nenhum tratamento as laminas que foram avaliadas mostraram a presença ainda de área cavitária com proliferação de células ósseas neoformadas e tecidos conectivos. Mostrando que neste experimento ocorreu um retardo do processo cicatricial em relação aos outros dois grupos, como também foi constatado

por Khadra *et al.* (2004a) que estudaram dois grupos: um irradiado com laser de baixa potência e outro controle, os autores obtiveram resultado favorável para o grupo irradiado onde a análise histomorfométrica sugeriu que o grupo irradiado teve maior formação óssea, além de maior porcentagem de cálcio e fósforo evidenciando o processo de maturação óssea mais avançado do que o grupo controle. E ainda Boden; Zdeblick e Sandhu (2000) trabalhando somente com BMP concluíram que os resultados esperados da artrodese ocorreram mais confiantemente dentro do grupo tratado com BMP.

7. CONCLUSÃO

A ação osteoindutora da BMP é acentuada com a aplicação do laser de baixa potência. O laser de baixa potência acelerou ainda mais o processo de reparação óssea, além de conter a neoformação de células limitadamente no local de lesão evitando prejuízos futuros para o osso.

8. Referências Bibliográficas

1. BIASE, P.; CAPANNA, R. Bone Morphogenetic Proteins and Growth Factors: emerging Role in Regenerative Orthopaedic Surgery. **J. Orthopaed Traumatol**, v. 8, p.43-48, Mar/2007.
2. BARUSKA, O. et al. Effect of Low-Energy Laser (He-Ne) Irradiation on the Process of Bone Repair in the Tibia. **Bone**, v.16, p. 47-55, 1995.
3. BAX, B. E.; WOZNEY, J. M.; ASHHURST, D. E. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. **Calci. Tissue Int.**, v. 65, p. 83-89, 1999.
4. BODEN, S.D.; ZDEBLICK, T.A.; SANDHU, I.I.S. The Use of rhBMP-2 in Interbody Fusion Cages. **Spine**, v.25, p.376-381, 2000.
5. BOUXSEIN, M. L. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 83, n. 8, p. 1219-1230, 2001.
6. BURKUS, J.K.; DORCHAK, J.D.; SANDERS D.L. Radiographic Assessment of Interbody Fusion Using Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein Type 2. **Spine**, v. 28, p.372-377, 2003.
7. CANOVA, G.C. **Influência da membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada no processo de reparo após pulpotomia em dentes de cães: análise microscópica e radiográfica**. 2003. 99 f. Dissertação de Mestrado em Endodontia – Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.
8. CARVALHO, P.S.P. et al. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomaterias. **Implant news**, São Paulo, n.3, p.255-260, Mai-Jun/2004.
9. CARVALHO, P.T.C.; SILVA, I.S.; REIS, F.A.; BELCHIOR, A.C.G.; FACCO, G.G.; GUIMARÃES, R.N.; FERNANDES, G.H.C.; DENADAI, A.S. Effect of 650nm Low-Power Laser on Bone Morphogenetic Protein in Bone Defects Induced in Rat Femors. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, sup. 4, p. 63-68, 2006.

10. 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 Coelho. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.58, n.1, p. 59-67, 2006.

11. CROCI, A.T.; CAMARGO, O.P.; BITAR, G.; PEREIRA, S.L.B.; MOREIRA, M.; FREITAS JR, S. Efeito do Concentrado de Plasma em Falhas Ósseas Provocadas em Fêmures de Camundongos como Estimulação de Formação Óssea. Estudo Experimental. **Acta Ortop. Bras.**, v.11, p.230-239, Out-Dez/2003.

12. DAVID, R.; NISSAN, M.; COHEN, I.; SOUDRY, M. Effect of low-power He- Ne laser on fracture healing in rats. **Lasers Surg Méd.**, v. 19, p. 458-464, 1996.

13. FERRIGNO, C.R.A.; NINA, M.I.D.; FANTONI, D.T. Estudo comparativo entre as osteossínteses com placas e osteossínteses com placas associadas a enxertos de proteína morfogenética óssea (Gen- Tech[®]) em fraturas distais de rádio-ulna em cães com menos de 6 quilos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.27, n.2, p. 65-69, Fev/2007.

14. FORELL, E.B; STRAW, R.C. Bone morphogenetic proteins and bone derived growth factors. **Vet. Comp. Orthop.Traumatol.**, v. 6, p. 166-70, 1994.

15. FREITAS, I.G.F. **Ação do laser de HeNe na osteogênese**. 2001. 83 f. Tese de doutorado em engenharia elétrica – Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

16. FUJIKI, E.N.; HONDA, E.K.; FUKUSHIMA, W.Y.; CHIKUDE, T.; MENEZES JR, D.R.; OLIVEIRA, C.A.P.; TELLES, D.F. Enxerto Liofilizado Homólogo em Artroplastia de Revisão em Quadril. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 40, n.5, p.280-287, Mai/2005.

17. GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia**. 2^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 456 p., 2003.

18. GAZZERRO, E.; GANGJI, V.; CANALIS, E. Bone Morphogenetic Proteins Induce the Expression of Noggin, Which Limits Their Activity in Cultured Rat Osteoblasts. **Journal Clin. Invest.**, v.102, n.12, p.2106-2114, Dec/1998.

19. GERBI, M.E.M.; MARQUES, A.M.C.; RAMALHO, L.M.P.; PONZI, E.A.C.; CARVALHO, C.M.; SANTOS, R.C.; OLIVEIRA, P.C.; NÓIA, M.; PINHEIRO, A.L.B. Infrared Laser Light Further Improves Bone Healing When Associated With Bone Morphogenetic Proteins: Na *in Vivo* Study in a Rodent Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.26, n.1, p. 55-60, 2008.
20. GIORDANO, V.; KNACKFUSS, I.G.; GOMES, R.C.; GIORDANO, M.; MENDONÇA, R.G.; COUTYNHO, F. Influência do Laser de Baixa Energia no Processo de Consolidação de Fratura de Tíbia: Estudo Experimental em Ratos. **Ver. Bras. Ortop.**, v. 36, n.5, p.174-178, Mai/2001.
21. GONÇALVES, E.A.L. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 12, n. 3, p. 299-304, Jul-Set/1998.
22. GROENEVELD, E. H. J.; BURGER, E. H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. **Eur. J. Endocrinol.**, n. 142, p. 9-21, 2000.
23. GUIZZARDI, S. et al. Implants of Heterologous Desmineralized Bone Matrix for Induction of Posterior Spinal Fusion in Rats. **Spine**, v.17, p.701-707, 1992.
24. HOFFMANN, A.; WEICH, H.A.; GROSS, G.; HILLMANN, G. Perspectives in the Biological Function, the Technical and Therapeutic Application of Bone Morphogenetic Proteins. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.57, p.294-308, Aug/2001.
25. HOSSEINKHANI, H.; HOSSEINKHANI, M.; KHADEMHOSEINI, A.; KOBAYASHI, H. Bone Regeneration Through Controlled Release of Bone Morphogenetic Protein-2 From 3-D Tissue Engineered Nano-Scaffold. **J. of Controlled Release**, v. 117, p.380-386, 2007.
26. KARU, T. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultured in vitro. **J. Photochem Photobiol. B.**, v.27, n.3, p.219-223, Mar/1995.
27. KHADRA, M.; RENOLD, H.J.; LYGSTADAAS, S.P.; ELLINGSEN, J.E.; HAANAES, H.R. Low-Level Laser Therapy Stimulates Bone-implant Interaction: an Experimental Study in Rabbits. **Clin. Oral Impl. Res.** v.15, p. 325-332, 2004a.
28. KHADRA, M.; KASEM, N.; HAANAES, H.R.; ELLINGSEN, J.E.; LYGSTADAAS, S.P. Enhancement of Bone Formation in Rat Calvarial Bone

- Defects Using Low-Level Laser Therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathology**, v.97, n.6, p.693-700, Jun/2004b.
29. KIRKER-HEAD, C.A. Recombinant bone morphogenetic protein: novel substances for enhancing bone healing. **Vet. Surg.**, v.24, p.408-419, 1995.
 30. KIRKER-HEAD, C.A. Development and Application of Bone Morphogenetic Proteins for the Enhancement of Bone Healing. **Journal Orthopaed Traumatology**, v. 6, p. 1-9, 2005.
 31. KREBSBACH, P.H.; ROBEY, P.G. Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Therapeutics for Craniofacial Regeneration. **J. of Dental Education**, v.66, n.6, p.766-773, Jun/2002.
 32. KUGIMIYA, F.; OHBA, S.; NAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, H.; CHUNG, U. Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. **J. Bone Miner Metab.**, v.24, p. 95-99, 2006.
 33. LIMA, A.F.M.; RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; MAMPRIM, M.J.; VULCANO, L.C.; CORREIA, M.A. Aspectos radiográficos e densitométricos na consolidação de fraturas tratadas por proteínas morfogenéticas óssea em rádio de coelhos. **Braz. J. Veter. Res. Anim. Sci.**, v.41, n.6, p. 416-422, 2004.
 34. LIMA, A.F.M.; RAHAL, S.C.; VOLPI, R.S.; GRANJEIRO, J.M; TAGA, R.; CESTARI, T.M. Effect of Bovine Bone Morphogenetic Proteins on Radius Fracture Healing in Rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, n. 4, p.259-263, 2007.
 35. LIND, M. Growth Factor Stimulation of Bone Healing. **Acta Orthop. Scand**, v.69, p.1-37, 1998.
 36. LIRANI, A.P.R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Evidências da Ação de Agentes Físicos sobre o Metabolismo do Tecido Ósseo e Seus Potenciais Usos Clínicos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 49, n.6, p.891-896, Dez/2005.
 37. LIRANI, A.P.R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato**. 2004. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

38. LOURENÇO, E.J.V. **Avaliação da osteogênese com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs): análise em defeitos na calvária e ao redor de implantes de titânio em coelhos.** 2002. Tese de doutorado em periodontia – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2002.
39. LUCA, F.; BARNES, K.M.; UYEDA, J.A.; DE-LEVI, S.; ABAD, V.; PALESE, T.; MERICQ, V.; BARON, J. Regulation of Growth Plate Chondrogenesis by Bone Morphogenetic Protein-2. **Endocrinology**, v.142, p. 430-436, 2001.
40. LUDWIG, S.C.; KOWALSKI, J.M.; BODEN, S.D. Osteoinductive bone graft substitutes. **Eur. Spine.**, v.9, supl. 1, p.119-125, 2000.
41. LUYTENT, F.P.; YU, Y.M.; YANAGISHITA, M.; VUKICEVIC, S.; HAMMONDS, G.; REDDI, A.H. Natural Bovine Osteogenin and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2B are Equipotent in the Maintenance of Proteoglycans in Bovine Articular Cartilage Explant Cultures. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.3691-3696, 1999.
42. MASTROCINQUE, S.; TATARUNAS, A.C.; ZERWES, M.B.C.; QUEIROZ, G.F.; SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M.; FERRIGNO, C.R.A. Proteínas ósseas morfogenéticas e outros fatores de crescimento ósseo. **Semina**, v. 25, n. 2, p. 139-150, Abr-Jun/2004.
43. MILLIS, D.L. Bone and non-bone – Derived Growth Factors and Effects on Bone Healing. **Veterinary Clinics of North America**, v.29, p.1221-1246, 1999.
44. MINAMIDE, A. et al. Evaluation of Carriers of Bone Morphogenetic Protein for Spinal Fusion. **Spine**, v.26, p. 850, 2001.
45. MUSSANO, F.; CICCONE, G.; CECCARELLI, M.; BALDI, I.; BASSI, F. Bone Morphogenetic Proteins and Bone Defects. **Spine**, v.32, n.7, p.821-830, 2007.
46. NAKASE, T.; YOSHIKAWA, H. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. **J. Bone Miner Metab.**, v.24, p.425-433, 2006.
47. NICOLAU, R.A.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M.T.T.; REIS, L.M.; ZÂNGARO, R.A. Effect of Low-Power GaAlAs Laser (660nm) on Bone

- Structure and Cell Activity: an Experimental Animal Study. **Lasers Med. Science**, v.18, p. 89-94, 2003.
48. NUNES, F.D. O uso das proteínas morfogenéticas do osso em odontologia. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v. 53, n.4, p.300, Jul-Ago/1999.
 49. OAKES, D.A.; LEE, C.C.; LIEBERMAN, J.R. An Evaluation of Human Demineralized Bone Matrices in a Rat Femoral Defect Model. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.413, p-281-290, 2003.
 50. PADULA, E.O.C.; ANDRADE, M.L.; GIORDANO, V.; RAMALHO, M.V. Aspectos Morfológicos do Processo de Consolidação de Fratura em Ratos Diabéticos. **Rev. Bras. Ortop.**, v.38, n.3, p.127-136, Mar/2003.
 51. PINHEIRO A.L.B. Low-level laser therapy in management of disorders of the maxillofacial region. **J Clin. Laser Med. Surg.**, v. 15, p. 181-183, 1997.
 52. PINHEIRO, A.L.B.; LIMEIRA JÚNIOR, F.A.; GERBI, M.E.M.; RAMALHO, L.M.P.; MARZOLA, C.; PONZI, E.A.C.; SOARES, A.O.; CARVALHO, L.C.B.; LIMA, H.C.V.; GONÇALVES, T.O. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **J. Clin. Laser Medicine & Surgery**, v.21, n.6, p. 383-388, 2003a.
 53. PINHEIRO, A.L.B.; LIMEIRA JÚNIOR, F.A.; GERBI, M.E.M.; RAMALHO, L.M.P.; MARZOLA, C.; PONZI, E.A.C. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz. Dent J.**, v.14, n.3, p.177-181, 2003b.
 54. PRETEL, H. **Ação de biomateriais e Laser de intensidade na reparação tecidual óssea. Estudo histológico em ratos.** 2005. 165 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Odontológicas - Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara-SP, 2005.
 55. REIS, F.B; HUNGRIA NETO, J.S.; PIRES, R.E.S. Pseudoartrose. **Ver. Bras. Ortop.**, v.40, n.3, p.79-88, Mar/2005.
 56. RENGACHARY, S.S. Bone Morphogenetic Proteins: Basic Concepts. **Neurosurg Focus**, v.13, p.1-6, Dec/2002.

57. REZENDE, M.R.; MESQUITA, I.V.; RIBAK, S.; DALAPRIA, R.; TOLEDO, C.S.; ANDRADE, D. Nova Técnica para Obtenção de Enxerto Ósseo Esponjoso. **Rev. Bras. Ortop.**, v.31, n.5, p.419-423, Mai/1996.
58. RILEY, E.H. et al. Bone Morphogenetic Protein-2. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 324, p.39-46, 1996.
59. RIZZO, D.; DEL CARLO, R.J.; SILVA, A.S.A.; VILORIA, M.I.V.; SOUZA, B.M.; MARCHES, D.R. Matriz Óssea Homóloga Desmineralizada na União Vertebral Dorsolateral Lombar em Coelhos. **Rev. Bras. Ortop.**, v.40, n.3, p.119-129, Mar/2005.
60. SAKOU, T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. **Bone**, v. 22, n. 6, p. 591-603, 1998.
61. SALGADO, J.F.M. **Avaliação da velocidade do processo de regeneração óssea primária, conjugando a técnica de regeneração óssea guiada com membrana de colágeno aniônico e terapia laser de baixa potência. 2002.** Dissertação de Mestrado – Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Paraíba, 2002.
62. 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 Ortop. Bras.**, v.13, p.194-195, 2005.
63. SELLERS, R.S. et al. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 82, n.2, p. 151-160, Feb/2000.
64. SILVA JUNIOR, A.N.; PINHEIRO, A.L.B.; OLIVEIRA, M.G.; WEISMANN, R.; RAMALHO, L.M.; NICOLAU, R.A. Computerized morphogenetic assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J Clin Laser Med Surg**, v.20, p.83-87, 2002.
65. SOLHEIM, E. Growth Factors in Bone. **International Orthopaedics (SICOT)**, v.22, p. 410-416, 1998.
66. TEIXEIRA, C.R.; RAHAL, S.C.; LIMA, A.F.M.; CORREA, M.A.; QUEIROZ, P.; VULCANO, L.C. Haste Intramedular de Polipropileno, combinada ou não a Biomateriais, no Tratamento de Fraturas Induzidas no Úmero de Pombos. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.1, p.67-72, 2004.

67. TERMAAT, M.F.; DEN BOER, F.C.; BAKKER, F.C.; PATKA, P. HAARMAN, H.J.M. Bone Morphogenetic Proteins - Development and Clinical Efficacy in the Treatment of Fractures and Bone Defects. **Journal of Bone Joint Surgery American**, v.87, p.1367-1378, 2005.
68. TUOMINEN, T.; JÄMSÄ, T.; TUUKKANEN, J.; MARTTINEN, A.; LINDHOLM, T.S.; JALOVAARA, P. Bovine Bone Implant With Bovine Bone Morphogenetic Protein in Healing a Canine Ulnar Defect. **International Orthopaedics (SICOT)**, v.25, p.5-8, Feb/2001.
69. YASKO, A. W.; LANE, J.M.; FELLINGER, E.J.; ROSEN, V.; WOZNEY, J.M.; WANG, E.A. The healing of segmental defects, induced by recombinant human morphogenetic protein (rhBMP-2). **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 74, n. 5, p. 659-670, 1992.

Anexo A – Aprovação no comitê de ética

Protocolo de nº 131/2006