

PEDRO COSTA MERGULHÃO

**UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS MORFOGÉNICAS DO
OSSO EM CIRURGIA ORTOPÉDICA DE PEQUENOS
ANIMAIS**

Orientador – Doutor Nuno Cardoso

Co-Orientador – Dr. Rafael Lourenço

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

PEDRO COSTA MERGULHÃO

**UTILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS MORFOGÉNICAS DO
OSSO EM CIRURGIA ORTOPÉDICA DE PEQUENOS
ANIMAIS**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Orientador – Doutor Nuno Cardoso

Co-Orientador – Dr. Rafael Lourenço

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

Agradecimentos

Ao Doutor Nuno Cardoso, por ter aceite ser orientador desta dissertação de mestrado e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

Ao Dr. Rafael Lourenço, do Centro de Cirurgia Veterinária de Loures, por ter sido um pilar fundamental na minha formação em traumatologia e ortopedia, e por ter aceite participar na elaboração desta dissertação.

Ao Doutor Pedro Faisca pela disponibilidade e ajuda prestada na correção final da tese.

A toda a equipa do Hospital Veterinário Canis de Girona, em especial aos Doutores Jordi Cairó e Josep Font, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança que depositaram em mim. Ainda um obrigado ao Doutor Jordi Cairó, por ter sugerido este tema para a minha tese de mestrado e pelos bons momentos passados na sala de cirurgia.

Aos internos do Hospital Veterinário Canis, em especial à Ester, pela amizade e por me ter ajudado a integrar na equipa, e a todos os colegas de medicina veterinária que estagiaram comigo.

Aos amigos e colegas que me acompanharam durante a faculdade, por todos os momentos passados durante este período duplamente trabalhoso e boémio.

À Filipa Bastos, por ter sido durante os últimos três anos a minha companheira nesta fase da vida tão especial, e por sempre me ter apoiado nos bons e nos maus momentos.

À minha família, pelo apoio incondicional.

Resumo

As Proteínas Morfogénicas do Osso (BMPs) são um grupo de citocinas da vasta família do fator de crescimento transformador-beta (TGF- β). Estas possuem actividade em vários tecidos e desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário, organogénese, homeostasia e regeneração tecidual.

Dentro das características que as tornam um dos factores de crescimento mais estudados para aplicação clínica está o seu forte potencial osteoindutor. As BMPs têm a capacidade de estimular a diferenciação de células mesenquimatosas indiferenciadas em osteoblastos e condroblastos, assim como de estimularem a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, tornando-as assim moléculas valiosas para estimular a cicatrização de fraturas e áreas onde a formação e/ou cicatrização óssea seja desejável.

Esta dissertação apresenta uma revisão dos conceitos básicos das BMPs e as suas principais funções no organismo, dando especial ênfase ao seu papel na regeneração do tecido ósseo, aos seus mecanismos de acção e regulação e às suas potenciais aplicações clínicas.

Nesta dissertação será também apresentada uma série de casos clínicos registados durante o período de estágio curricular no Hospital Veterinário Canis, em Girona, onde se utilizaram estes agentes para estimular a cicatrização óssea em diversas ocasiões. Os resultados obtidos foram positivos, uma vez que foi atingida união óssea em todos os casos clínicos. No entanto, a não existência de grupos de controlo enfraquece o valor científico dos resultados.

Palavras-chave: Proteínas morfogénicas do osso (BMPs); Cicatrização de fraturas; Factores de crescimento; Citocinas.

Abstract

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are a group of cytoquines from the vast family of the Transforming Growth Factor-beta (TGF- β). They have activity in various tissues and play an important role in embryonic development, organogenesis, homeostasis and tissue regeneration.

Among the characteristics that make them one of the most studied growth factors for clinical application is their strong osteoinductive potential. BMPs have the capacity to stimulate the differentiation of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts and chondroblasts as well as stimulating the differentiation of osteoprogenitor cells in osteoblasts, making them valuable molecules to stimulate the healing of fractures and whenever bone formation and/or bone healing is desirable.

This paper presents a review of the basic concepts of BMPs and their main functions in the body with particular emphasis on their role in bone tissue regeneration, action and regulation mechanisms and potential clinical applications.

It will also be presented a series of cases registered during the traineeship at the Canis Veterinary Hospital, in Girona, where these agents were used to stimulate bone healing in several occasions. The results were positive since bone union was reached in all clinical cases. However the lack of control groups weakens the scientific results.

Keywords: Bone morphogenetic proteins (BMPs); Fracture healing; Growth factors; Cytoquines.

Abreviaturas e Símbolos

BMP – Proteína morfogénica óssea

BMPR – Receptor das proteínas morfogénicas ósseas

Co-Smad – Smad co-mediadora

GS – Glicina-serina

I-Smad – Smad inibitória

Kg – Quilogramas

LC-DCP – *Limited contact dynamic compression plate*

LC-LCP – *Limited contact locking compression plate*

Mm – Milímetros

PMN – Leucócito polimorfonuclear

R-Smad – Smad regulada por receptores

rhBMP – Proteína morfogénica óssea recombinante humana

Runx2 – *Runt-related transcription factor 2*

SRD – Sem raça definida

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

TTA – *Tibial tuberosity advancement*

Índice Geral

Agradecimentos.....	2
Resumo.....	3
Abstract.....	4
Abreviaturas e Símbolos.....	5
Índice Geral.....	6
Índice de Tabelas.....	8
Índice de Figuras.....	9
1. Introdução.....	10
1.1. História.....	10
1.2. Membros da Família das BMPs.....	11
1.3. Estrutura das BMPs.....	14
1.4. Generalidades do Tecido Ósseo.....	14
1.4.1. Células.....	14
1.4.2. Histologia.....	15
1.4.3. Anatomia dos Ossos Longos.....	17
1.4.4. Formação Óssea.....	17
1.5. Cicatrização de Fraturas.....	17
1.5.1. Cicatrização Óssea Secundária.....	18
1.5.1.1. Fase Inflamatória.....	19
1.5.1.2. Fase de Reparação.....	20
1.5.1.3. Fase de Remodelação.....	23
1.5.2. Cicatrização Óssea Primária.....	23
1.5.2.1. Cicatrização por Lacunas.....	24
1.5.2.2. Cicatrização por Contacto.....	24
1.5.3. Conclusão.....	25
1.6. Expressão de BMPs durante a Cicatrização de Fraturas.....	26
1.6.1. Funções e Expressão das BMPs durante a Cicatrização de Fraturas.....	26
1.7. Vias de Sinalização das BMPs.....	28
1.7.1. Sinalização pela Via Smad.....	29
1.8. Aplicações Clínicas das BMPs.....	31
1.8.1. Aplicações em Medicina Humana.....	32

1.8.2. Aplicações em Medicina Veterinária.....	33
1.9. BMPs Disponíveis em Medicina Veterinária.....	37
1.10. Objetivos.....	39
2. Materiais e Métodos.....	40
2.1. Critérios de Inclusão.....	40
3. Resultados.....	41
3.1. Caso nº 1.....	41
3.2. Caso nº 2.....	42
3.3. Caso nº 3.....	44
3.4. Caso nº 4.....	45
3.5. Caso nº 5.....	46
3.6. Caso nº 6.....	47
4. Discussão.....	48
5. Conclusões.....	54
6. Referências Bibliográficas.....	55

Índice de Tabelas

Tabela 1: Membros das BMPs em humanos e as suas principais funções fisiológicas.....	12
--	----

Índice de Figuras

Figura 1: Ilustração da estrutura do osso secundário/compacto.....	16
Figura 2: Fase inflamatória.....	20
Figura 3: Fase de reparação (formação do calo fibrocartilaginoso).....	22
Figura 4: Fase de reparação (formação do calo ósseo).....	22
Figura 5: Fase de remodelação.....	23
Figura 6: Cicatrização óssea primária após estabilização rígida do foco de fratura..	25
Figura 7: Sinalização pela via Smad.....	31
Figura 8: Apresentação comercial do <i>TruScient</i> ®.....	38
Figura 9: Caso clínico nº 1.....	42
Figura 10: Caso clínico nº 2.....	43
Figura 11: Caso clínico nº 3.....	44
Figura 12: Caso clínico nº 4.....	45
Figura 13: Caso clínico nº 5.....	46
Figura 14: Caso clínico nº 6.....	47

1. Introdução

Vários factores de crescimento participam na formação, homeostasia e cicatrização óssea. Os factores chave envolvidos nestas funções são as proteínas morfogénicas ósseas (BMPs), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Kloen *et al.*, 2003; Westerhuis, 2005).

As BMPs são um grupo de citocinas da vasta família do fator de crescimento transformador beta e possuem actividade em vários tecidos, desempenhando um papel importante no desenvolvimento embrionário, organogénese, homeostasia e regeneração tecidual (Westerhuis, 2005; Bessa *et al.*, 2008a; Sieber *et al.*, 2009).

Dentro das características que as tornam um dos factores de crescimento mais estudados para potencial aplicação clínica está a sua capacidade em estimular a diferenciação de células mesenquimatosas indiferenciadas em osteoblastos e condroblastos e a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (Schmitt *et al.*, 1999; Phillips, 2005; Meyer & Wiesmann, 2006), tornando-as moléculas valiosas para estimular a cicatrização de fraturas e áreas onde a formação e/ou cicatrização óssea seja desejável (Westerhuis, 2005).

1.1. História

Há mais de um século que Nicholas Senn descobriu, num dos seus estudos, que osso descalcificado asséptico era o melhor substituto de enxertos ósseos para o restabelecimento de perdas de tecido ósseo (Senn, 1889). Nos anos 30, Levander observou pela primeira vez que extractos de osso bruto induziam a formação de tecido ósseo ectópico após a sua injeção em músculos (Solheim, 1998; Rengachary, 2002; Bessa *et al.*, 2008a).

A descoberta chave da capacidade da matriz óssea desmineralizada em induzir a formação de osso foi feita por Marshall Urist em 1965. O seu trabalho demonstrou que a implantação de extractos de osso descalcificado no músculo induziam a sua ossificação e descobriu que o composto ativo responsável pela regeneração óssea eram um misto de proteínas contidas no extracto, as quais denominou posteriormente de *bone morphogenetic proteins* (BMPs, proteínas morfogénicas do osso) (Urist, 1965; Urist & Strates, 1971; Bessa *et al.*, 2008a; Gruskin *et al.*, 2012). No entanto, a sua pesquisa apresentava algumas limitações, como o facto de não haver nenhum ensaio reprodutível para as proteínas e por não

ter sido determinado, de forma conclusiva, que as proteínas identificadas tinham sido as responsáveis pela indução da formação óssea ectópica (Rengachary, 2002). Estas limitações foram ultrapassadas por Sampath e Reddi que desenvolveram um ensaio altamente reprodutível para a formação ectópica de tecido ósseo (Sampath & Reddi, 1981; Rengachary, 2002; Bessa *et al.*, 2008a). Estes também demonstraram que quando o componente proteico era dissociado da matriz esta não induzia a formação de tecido ósseo, provando assim que era o conteúdo proteico da matriz o responsável pela formação óssea ectópica (Sampath & Reddi, 1981; Rengachary, 2002).

Durante as décadas de 80 e 90, vários genes das BMPs foram sequenciados e clonados e as proteínas produzidas por tecnologia recombinante mostraram ser biologicamente eficazes (Solheim, 1998; Bessa *et al.*, 2008a).

Seguiram-se muitos estudos sobre a utilização de BMPs recombinantes (rhBMPs) para aplicações clínicas, como fusões espinhais, cicatrização de fraturas e engenharia do tecido dentário (Bessa *et al.*, 2008a).

Atualmente, as BMPs humanas são produzidas por tecnologia recombinante (Rengachary, 2002; Bessa *et al.*, 2008a) o que permite a sua produção em maiores quantidades e a sua aplicação sem risco de infecção ou de reação alérgica (Rengachary, 2002).

A introdução das rhBMPs no mercado ocorreu após a *Food and Drug Administration* ter aprovado, nos Estados Unidos da América (EUA), dois produtos contendo rhBMP-7 e rhBMP-2, para serem usados com uma esponja de colagénio absorvível em situações de não-união de ossos longos e fusões espinhais, respectivamente (Rengachary, 2002; McKay *et al.*, 2007; Bessa *et al.*, 2008a).

Em 2005, Reddi propôs a designação de BMPs como *body morphogenetic proteins* (proteínas morfogénicas corporais) devido às suas ações extra-ósseas (Reddi, 2005).

1.2. Membros da Família das BMPs

As funções biológicas das BMPs relacionam-se sobretudo com a formação óssea e cartilaginosa, no entanto estas possuem diversas ações extra-ósseas (Reddi, 2005; Xiao *et al.*, 2007; Bessa *et al.*, 2008a).

Com base em diversos estudos são as BMPs -2, -4, -6, -7 e -9 que apresentam um evidente papel osteoindutor durante a formação de tecido ósseo (Kang *et al.*, 2004; Bessa *et al.*, 2008a; Kopf *et al.*, 2012).

As BMPs -12, -13 e -14 são consideradas *cartilage-derived morphogenetic proteins* (CDMPs, proteínas morfogénicas derivadas da cartilagem), uma vez que estas induzem apenas fenótipos condrogénicos (Reddi, 1998; Reddi, 2001; Reddi, 2003; Bessa *et al.*, 2008a).

As BMPs -8b, -10, -15, -16, -17 e -18 não têm funções conhecidas a nível ósseo ou cartilágneo, no entanto desempenham papéis importantes noutros tecidos (Bessa *et al.*, 2008a).

As BMPs -3 e -3b opõem-se à diferenciação ventral do embrião ao induzirem a formação, respectivamente, da cauda e da cabeça e são possíveis inibidores ou reguladores negativos da osteogénese, uma vez que diminuem a expressão de fosfatase alcalina nas células ósseas (Hino *et al.*, 2004; Bessa *et al.*, 2008a).

A BMP-1 não é um membro da superfamília TGF- β (Sakou, 1998; Groeneveld & Burger, 2000; Kirker-Head, 2000; Reddi, 2001; De Biase & Capanna, 2005; Bessa *et al.*, 2008a; Kim & Choe, 2011; Lissenberg-Thunnissen *et al.*, 2011), tratando-se de uma metaloprotease envolvida na clivagem de pro-colagénios e desenvolvimento cartilágneo (Xiao *et al.*, 2007; Bragdon *et al.*, 2011) e na clivagem do antagonista das BMPs *chordin* (Bragdon *et al.*, 2011).

As principais funções das BMPs humanas no organismo estão sintetizadas na Tabela 1, tendo por base os estudos elaborados por Bessa *et al.* (2008a) e Bragdon *et al.* (2011).

Tabela 1: Membros das BMPs em humanos e as suas principais funções fisiológicas (Bessa *et al.*, 2008a; Bragdon *et al.*, 2011).

BMP	Principais funções fisiológicas
<u>Proteínas morfogénicas ósseas</u>	
BMP-2	Morfogénese óssea e cartilágnea / formação do coração
BMP-3 / BMP-3b	Reguladores negativos da morfogénese óssea
BMP-4	Morfogénese óssea e cartilágnea / formação renal
BMP-5	Desenvolvimento dos membros / morfogénese óssea e cartilágnea

Tabela 1: Membros das BMPs em humanos e as suas principais funções fisiológicas (Bessa *et al.*, 2008a; Bragdon *et al.*, 2011).

BMP	Principais funções fisiológicas
BMP-6	Hipertrofia cartilágnea / morfogénese óssea / desenvolvimento do sistema nervoso / mediador do estrogénio
BMP-7	Morfogénese óssea e cartilágnea / formação renal / formação ocular / desenvolvimento do sistema nervoso
BMP-8a	Morfogénese óssea / espermatogénese
BMP-9	Morfogénese óssea / desenvolvimento de neurónios colinérgicos / metabolismo da glucose
BMP-11	Padronização do esqueleto axial (<i>Axial skeleton patterning</i>) / desenvolvimento ocular / desenvolvimento pancreático / formação renal
<u>Proteínas morfogénicas derivadas da cartilagem</u>	
BMP-12	Desenvolvimento de tendões e ligamentos / desenvolvimento de neurónios sensoriais
BMP-13	Desenvolvimento e hipertrofia cartilágnea
BMP-14	Condrogénese / angiogénese
<u>Outras</u>	
BMP-8b	Espermatogénese
BMP-10	Morfogénese cardíaca
BMP-15	Desenvolvimento de oócitos e folículos
BMP-16	Padronização embrionária (<i>Embryonic patterning</i>)
BMP-17 / BMP-18	Padronização embrionária

1.3. Estrutura das BMPs

As BMPs são sintetizadas sob a forma de grandes moléculas precursoras e são dissociadas por clivagem proteolítica de modo a formarem a proteína madura (Groeneveld & Burger, 2000; Bessa *et al.*, 2008a).

A maioria das BMPs maduras consistem em dois monómeros covalentemente ligados por uma ponte dissulfídica. As BMPs encontram-se na forma homodimérica quando os dois monómeros pertencem à mesma BMP (e.g. BMP-2, BMP-3), enquanto que quando os dois monómeros são derivados de diferentes BMPs estas encontram-se sob a forma heterodimérica (e.g. BMP-2/5, BMP-4/7) (Guo & Wu, 2012). As BMPs são biologicamente ativas em ambas as formas, no entanto as BMPs na conformação heterodimérica têm uma maior capacidade de ativação da sinalização (Sieber *et al.*, 2009; Guo & Wu, 2012).

1.4. Generalidades do Tecido Ósseo

Para compreender o papel que as BMPs desempenham na cicatrização de fraturas é necessário estar a par da estrutura e função normais do osso, assim como do processo de cicatrização óssea.

1.4.1. Células

As células que estão directamente envolvidas na integridade estrutural do osso são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (Weisbrode, 2007). Os osteoblastos, derivados das células mesenquimatosas indiferenciadas, são células que se dispõem nas superfícies ósseas e são responsáveis pela produção da parte orgânica da matriz óssea (osteóide), iniciando a mineralização desta última pela deposição de hidroxapatite (Junqueira & Carneiro, 2004; Weisbrode, 2007). Além disso, iniciam também a reabsorção da matriz em resposta a estímulos fisiológicos e após ligação com a paratormona (PTH) (Weisbrode, 2007). Os osteócitos são osteoblastos que foram rodeados pela matriz óssea mineralizada. Estes situam-se em pequenas lacunas no interior da matriz das quais partem canaliculos que permitem aos osteócitos comunicar através dos seus prolongamentos citoplasmáticos com osteoblastos ou outros osteócitos (Junqueira & Carneiro, 2004; Weisbrode, 2007; Rochefort *et al.*, 2010). A sua função consiste em detectar alterações na carga (força aplicada ao osso) e

tensão (deformação estrutural em resposta à carga) do osso e de as sinalizar aos osteoblastos para que estes iniciem a formação ou reabsorção de osso (Weisbrode, 2007). Os osteoclastos derivam das células tronco hematopoiéticas e são responsáveis pela reabsorção óssea (Junqueira & Carneiro, 2004; Weisbrode, 2007).

1.4.2. Histologia

As superfícies ósseas internas e externas são revestidas por células osteoprogenitoras e tecido conjuntivo que constituem, respectivamente, o endóstio e o perióstio (Junqueira & Carneiro, 2004). A camada superficial do perióstio (*stratum fibrosum*) contém essencialmente fibras de colagénio e fibroblastos, enquanto que a sua camada interna (*stratum cambium*) contém as células osteoprogenitoras (Liebich & König, 2002; Junqueira & Carneiro, 2004). Estas multiplicam-se por mitose e diferenciam-se em osteoblastos, desempenhando um papel importante no crescimento do osso e na cicatrização de fraturas. O endóstio é constituído por células osteoprogenitoras e reveste as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os canais de Volkmann. Em suma, as funções do perióstio e do endóstio consistem na nutrição do tecido ósseo e fornecimento de células osteoprogenitoras para o crescimento e cicatrização ósseas (Junqueira & Carneiro, 2004).

Histologicamente, existem dois tipos de tecido ósseo, o imaturo ou primário e o maduro, secundário ou lamelar. Estes apresentam a mesma constituição celular e os mesmos constituintes da matriz, no entanto diferem do ponto de vista cronológico e na sua organização estrutural.

O tecido primário apresenta fibras de colagénio dispostas sem organização definida, menor quantidade de minerais e uma maior proporção de osteócitos em relação ao tecido secundário. Além disso, surge primeiro e é de carácter temporário, sendo substituído progressivamente por tecido secundário (Junqueira & Carneiro, 2004).

O tecido ósseo secundário apresenta fibras de colagénio organizadas em lamelas que se dispõem paralelamente umas em relação às outras ou em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers ou ósteons que constituem a unidade estrutural básica deste tipo de tecido ósseo. Cada sistema de Havers é um cilindro longo de orientação paralela ao eixo longitudinal do osso e com um canal central (canal de Havers). Os canais de Havers são revestidos de endóstio, contêm vasos e nervos e comunicam-se entre si com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio dos canais de Volkmann

(Figura 1) (Junqueira & Carneiro, 2004).

O osso que se encontra entre os sistemas de Havers é denominado de lamela intersticial, enquanto que as camadas de osso orientadas paralelamente às circunferências interna e externa do osso (situadas subjacente ao periósteo e endósteo) são chamadas de lamelas circunferenciais (Weisbrode, 2007, 2007).

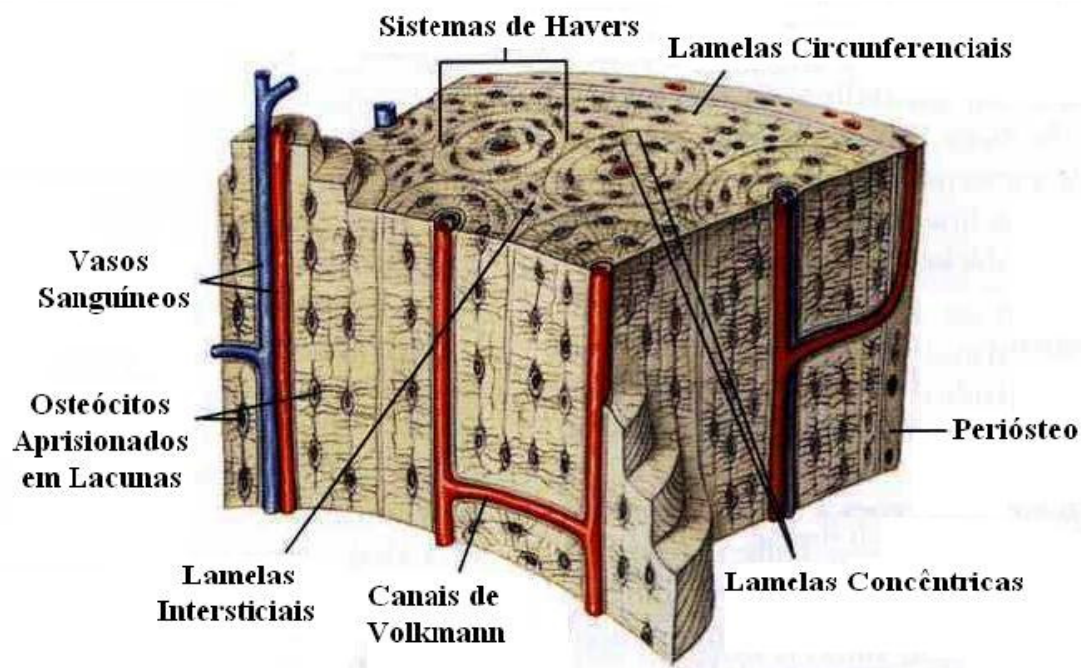


Figura 1: Ilustração da estrutura do osso secundário/compacto (Adaptado de Weisbrode, 2007).

Quanto à estrutura macroscópica, podemos classificar os ossos em compacto, caso não sejam visíveis cavidades, ou esponjoso, que por ser constituído por numerosas trabéculas entrelaçadas permite que se visualizem várias cavidades comunicantes (Junqueira & Carneiro, 2004). O osso compacto do córtex e das regiões subcondrais (subjacentes às superfícies articulares) está organizado em sistemas de Havers. Já no osso esponjoso, encontrado na cavidade medular, a orientação das trabéculas reflete uma adaptação ao stress mecânico a que o osso é sujeito e as lamelas, dentro das trabéculas, apresentam uma disposição paralela à superfície trabecular, não estando por isso organizadas em sistemas de Havers (Weisbrode, 2007).

1.4.3. Anatomia dos Ossos Longos

Os ossos longos do esqueleto apendicular estão anatomicamente divididos em epífises, placas de crescimento metafisárias (fises), metáfises e diáfises (Weisbrode, 2007). As extremidades ou epífises são formadas por osso esponjoso que se encontra superficialmente revestido por uma fina camada de osso compacto (Liebich & König, 2002; Junqueira & Carneiro, 2004; Weisbrode, 2007). As metáfises localizam-se no extremo das diáfises e o seu interior é preenchido por osso esponjoso (Liebich & König, 2002). A diáfise constitui a porção mais longa do osso e, situada entre as metáfises, é constituída maioritariamente de osso compacto. Esta apresenta também uma pequena quantidade de osso esponjoso na sua porção mais profunda, ou seja, em torno da cavidade medular (Junqueira & Carneiro, 2004). Nos animais em crescimento é a placa de crescimento metafisária (fise) a principal responsável pelo alongamento dos ossos. Quando o crescimento cessa, a placa é totalmente substituída por osso (Weisbrode, 2007).

1.4.4. Formação Óssea

O tecido ósseo pode ser formado por um processo de ossificação intramembranosa ou por ossificação endocondral. Na ossificação intramembranosa ocorre diferenciação das células mesenquimatosas em osteoblastos, produzindo-se diretamente osso, não estando envolvidos percursores cartilagíneos. A ossificação endocondral inicia-se sobre um modelo cartilaginoso que é posteriormente reabsorvido e substituído por tecido ósseo (Junqueira & Carneiro, 2004; Weisbrode, 2007). Em ambos os tipos de ossificação, o tecido ósseo formado em primeiro lugar é do tipo primário e vai sendo substituído gradualmente por tecido secundário (Junqueira & Carneiro, 2004). Estes processos vão ser descritos com maior pormenor na secção da cicatrização de fraturas.

1.5. Cicatrização de Fraturas

A cicatrização óssea é um processo único porque o resultado final é uma reposição completa da anatomia e o retorno às funções normais do osso, contrariamente aos tecidos moles cuja cicatrização leva à formação de tecido cicatricial (Sfeir *et al.*, 2005).

Geralmente, a cicatrização óssea está completa entre 6 a 8 semanas após a lesão

inicial (Sfeir *et al.*, 2005).

Esta pode ser dividida em duas categorias: a cicatrização primária (direta, cortical) e a secundária (indireta, espontânea). Ambos os processos são complexos, uma vez que envolvem uma cascata de eventos biológicos perfeitamente coordenados (Sfeir *et al.*, 2005).

1.5.1. Cicatrização Óssea Secundária

Este é o método mais comum de cicatrização óssea e caracteriza-se pela cicatrização espontânea da fratura na ausência de imobilização rígida do foco de fratura (Sfeir *et al.*, 2005). Esta instabilidade leva à formação de um calo previamente à formação de osso, sendo a quantidade de calo produzida dependente do grau de estabilidade (Griffon, 2005; Denny & Butterworth, 2006).

No calo vão-se formar tecidos progressivamente mais resistentes em termos mecânicos de modo a ultrapassar a instabilidade decorrente da ausência de imobilização rígida do foco de fratura, ocorrendo assim uma diminuição gradual da mobilidade dos fragmentos ósseos. Este evento é importante pois a formação de tecido ósseo só pode ocorrer em ambientes mecanicamente estáveis. O tecido ósseo apresenta uma tolerância de apenas 2% à extensão e de 0,5° à dobragem, não havendo possibilidade deste se formar caso as forças mecânicas exercidas ultrapassem os seus limites de elasticidade (Autefage, 1997a).

O calo vai então ser inicialmente constituído por tecido de granulação, que apresenta uma tolerância de 100% à extensão e de 40° à dobragem, ao qual se segue o tecido cartilágneo, apresentando este uma tolerância de 10% à extensão e 5° à dobragem. A formação destes tecidos assegura uma estabilidade crescente do foco de fratura até que hajam condições mecânicas para a formação de tecido ósseo (Autefage, 1997a).

O organismo dispõe ainda de outros mecanismos “estabilizadores” do foco de fratura, como a contração dos músculos adjacentes à zona de fratura e a reabsorção das margens de fratura com alargamento dos topos ósseos (Autefage, 1997a; Griffon, 2005).

A cicatrização óssea secundária pode ser cronologicamente dividida em 3 fases: a fase inflamatória; a fase de reparação que inclui ossificação intramembranosa, condrogénese e ossificação endocondral; e a fase de remodelação. Cada uma delas é caracterizada pela presença de diferentes características celulares e componentes extracelulares da matriz. Estas fases ocorrem ininterruptamente e sobrepõem-se umas às outras, formando um processo de cicatrização contínuo (Sfeir *et al.*, 2005).

1.5.1.1. Fase Inflamatória

Uma lesão que leve a uma fratura óssea lesiona não só as células, vasos sanguíneos e a matriz óssea, mas também os tecidos adjacentes, como os músculos e nervos. Imediatamente após o trauma, desencadeia-se uma resposta inflamatória (Figura 2) que atinge um pico em 48 horas e tem a duração aproximada de uma semana. Esta reação inflamatória ajuda a imobilizar a fratura de duas formas: através da dor, que faz com que o animal se proteja da lesão; e pela presença de tumefação que impede hidrosticamente a fratura de se mover. No foco de fratura a lesão do endotélio vascular leva à ativação do sistema de complemento, agregação plaquetária e libertação dos fatores de crescimento a partir dos grânulos α , que desencadeiam sinais quimiotáticos. As plaquetas são responsáveis pela cascata de coagulação, levando à homeostasia e mediação de sinais através da libertação de factores de crescimento quimiotáticos. Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs), linfócitos, monócitos e macrófagos são atraídos para a lesão e são estimulados a libertarem citocinas que estimulam a angiogénese (Sfeir *et al.*, 2005), fazendo com que em poucas horas esteja estabelecido um suprimento sanguíneo extra-ósseo à zona de fratura proveniente dos tecidos moles circundantes (Griffon, 2005).

Caracteristicamente, o ambiente inicial do foco de fratura é hipóxico e ácido, o que favorece a actividade dos PMNs e dos macrófagos. O sangue acumulado durante a hemorragia vai coagular, dando origem a um hematoma que se vai localizar entre as margens do foco de fratura, dentro do canal medular e por debaixo do periosteio e músculos elevados/desinseridos. A sua formação serve como um “tampão” hemostático de modo a limitar a hemorragia e a tornar-se uma rede de fibrina que providenciará as vias para a migração celular. O hematoma também é uma fonte de moléculas sinalizadoras que iniciam eventos celulares essenciais para a cicatrização das fraturas. Todo este processo leva à formação de um granuloma referido como calo (Sfeir *et al.*, 2005), que apresenta uma componente externa (derivada do periosteio) e interna (derivada do endosteio) (Denny & Butterworth, 2006).

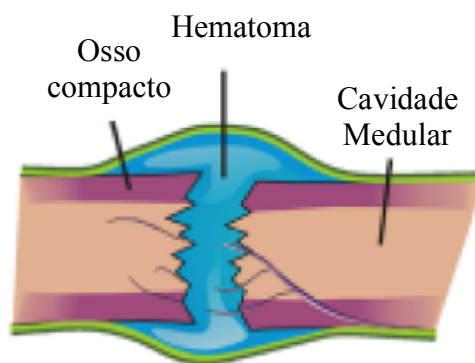


Figura 2: Fase inflamatória: A lesão do endotélio vascular leva à formação do hematoma, ao início da cascata do sistema de complemento e à cascata de coagulação com a consequente acumulação de leucócitos PMNs, linfócitos, plaquetas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, osteoclastos e células indiferenciadas (Adaptado de Sfeir *et al.*, 2005).

1.5.1.2. Fase de Reparação

Esta fase inicia-se nos últimos dias da fase inflamatória e prolonga-se por várias semanas. O resultado final desta fase será a formação de um calo dentro e em torno do foco de fratura que será eventualmente substituído por osso. O papel deste calo é de proporcionar estabilidade mecânica ao foco de fratura, uma vez que é este que o vai suportar (Sfeir *et al.*, 2005). A cicatrização secundária não é homogênea ao longo do calo. A ossificação endocondral inicia-se em zonas mecanicamente menos estáveis, ou seja, na parte externa do perióstio e nas regiões imediatamente adjacentes ao foco de fratura. Já a ossificação intramembranosa ocorre na parte interna do perióstio e leva à formação de um calo duro. A formação de uma ponte de calo duro ao longo do foco de fratura providenciará a estabilização inicial e o retorno à função biomecânica do osso (Fazzalari, 2011).

Os osteócitos localizados na margem do foco de fratura acabam por morrer devido a carências nutricionais, podendo este acontecimento ser observado através da presença de lacunas vazias que se estendem desde o foco. O perióstio lesado e as células da medula óssea assim como a de outros tecidos adjacentes podem também morrer e contribuir para o tecido necrótico (Sfeir *et al.*, 2005).

Enquanto estes tecidos são reabsorvidos, existem células mesenquimatosas indiferenciadas que proliferam e se diferenciam em células como fibroblastos, condroblastos e osteoblastos (Sfeir *et al.*, 2005). Estas células têm origem na camada profunda do perióstio, endóstio, medula óssea, tecidos moles adjacentes (Griffon, 2005; Sfeir *et al.*, 2005) ou a partir de vasos sanguíneos (Sfeir *et al.*, 2005).

Durante esta fase, o calo pode ser constituído por tecido conectivo fibroso, vasos sanguíneos, cartilagem, osso imaturo e osteóide. À medida que a cicatrização progride o pH torna-se gradualmente neutro e depois ligeiramente alcalino, tornando-se o meio óptimo para a actividade da enzima fosfatase alcalina e para o seu papel na mineralização do calo. A taxa de cicatrização, assim como a composição do tecido cicatricial, pode variar em função da localização da fratura no osso, da extensão de lesão dos tecidos moles e da estabilidade mecânica do foco de fratura (Sfeir *et al.*, 2005).

Esta fase foca-se essencialmente na ossificação intramembranosa, condrogénese e ossificação endocondral (Sfeir *et al.*, 2005).

A ossificação intramembranosa inicia-se nos primeiros dias após a fratura e as atividades proliferativas parecem cessar antes de duas semanas pós fratura. A formação óssea nesta zona ocorre por diferenciação direta das células precursoras em osteoblastos sem haver a formação intermediária de cartilagem. A região, no calo externo, onde se dá este tipo de ossificação é geralmente referida como calo duro (Sfeir *et al.*, 2005).

Simultaneamente à ossificação intramembranosa, ocorre também condrogénese na periferia do calo onde existe uma menor tensão de oxigénio. Células indiferenciadas ou mesenquimatosas do perióstio e tecidos moles adjacentes estão também presentes no tecido de granulação do foco de fratura. Estas células vão-se tornando maiores, começam a assemelhar-se a cartilagem e iniciam a síntese de uma matriz basofílica avascular semelhante à encontrada na zona de proliferação das placas de crescimento. Esta zona de tecido fibroso e de cartilagem recém-formada é referida como calo mole. A cartilagem, eventualmente, acabará por substituir todo o tecido fibroso (Sfeir *et al.*, 2005).

Na segunda semana de cicatrização existe uma abundância de cartilagem sobre o foco de fratura e o processo de calcificação inicia-se através da ossificação endocondral. Este processo é bastante similar ao observado nas placas de crescimento. Os condrócitos hipertróficos inicialmente libertam proteoglicanos neutros que vão degradar glicosaminoglicanos, uma vez que níveis elevados deste último inibem a mineralização. Em seguida, estas mesmas células, e mais tarde os osteoblastos, libertam na matriz vesículas derivadas da membrana celular contendo complexos de fosfato de cálcio. Estas vesículas também contêm protéases neutras e enzimas de fosfatase alcalina que degradam a matriz rica em proteoglicanos e hidrolisam ésteres de fosfato de modo a providenciarem iões de fosfato para se precipitarem com o cálcio, depositando-se estes na matriz extracelular onde vão iniciar a formação de depósitos minerais. À medida que o processo de ossificação prossegue o

calo calcifica, torna-se mais rígido e o foco de fratura pode ser considerado imobilizado internamente (Sfeir *et al.*, 2005).

Os Capilares sanguíneos provenientes do osso adjacente invadem e calcificam a cartilagem, aumentando a tensão de oxigénio. A isto segue-se uma invasão de osteoblastos que formam um tecido esponjoso primário consistindo em cartilagem e osso imaturo. Eventualmente, o calo torna-se exclusivamente constituído de osso imaturo e vai conectar as duas margens da fratura, iniciando-se assim o processo de remodelação (Sfeir *et al.*, 2005).

As Figuras 3 e 4, apresentadas em seguida, são representações esquemáticas desta fase.

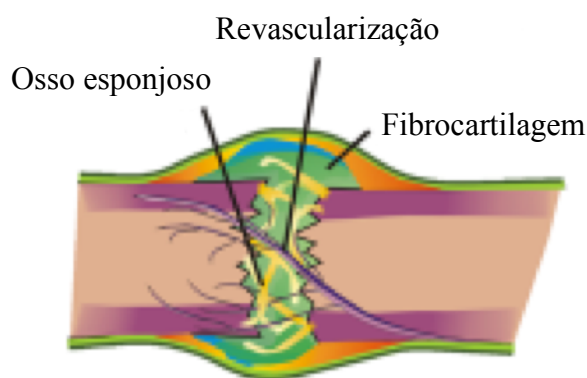


Figura 3: Fase de reparação (formação do calo fibrocartilaginoso): inicia-se a formação de tecido fibroso e cartilágneo assim como a revascularização (Adaptado de Sfeir *et al.*, 2005).

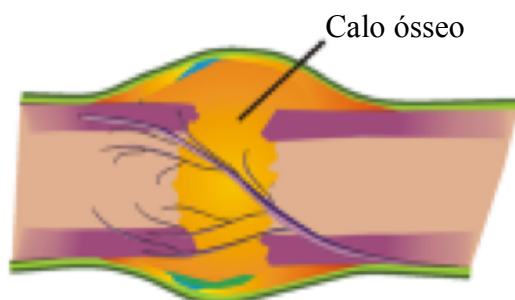


Figura 4: Fase de reparação (formação do calo ósseo): processos de ossificação intramembranosa e endocondral estão a decorrer de modo a haver deposição de osso imaturo (Adaptado de Sfeir *et al.*, 2005).

1.5.1.3. Fase de Remodelação

Esta é a fase final da cicatrização óssea e inicia-se com a substituição do osso imaturo por osso lamelar e com a reabsorção do calo em excesso (Figura 5) (Sfeir *et al.*, 2005). A remodelação, após a substituição de todo o osso imaturo, consiste na reabsorção pelos osteoclastos de trabéculas mal localizadas e pela formação de osso ao longo de linhas de stress (Sfeir *et al.*, 2005). O resultado desta fase é uma modificação gradual da zona fraturada sob a influência de cargas mecânicas até se atingir uma estabilidade ótima, sendo a arquitetura do córtex similar àquela que possuía antes de ocorrer a fratura (Sfeir *et al.*, 2005). A remodelação do calo interno permite o restabelecimento de uma cavidade medular contínua na diáfise óssea (Griffon, 2005).

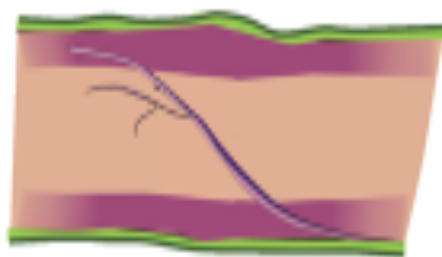


Figura 5: Fase de remodelação: Substituição de osso não lamelar por osso lamelar e reabsorção do excesso de calo. A modificação gradual da zona de fratura leva à reposição da arquitetura óssea normal (Adaptado de Sfeir *et al.*, 2005).

1.5.2. Cicatrização Óssea Primária

Este tipo de cicatrização requer estabilização rígida com ou sem compressão das margens de fratura. Esta imobilização rígida, ao contrário da cicatrização óssea secundária, suprime a formação de um calo tanto em osso cortical como esponjoso (Sfeir *et al.*, 2005), uma vez que parece haver uma supressão dos sinais biológicos que atraem células osteoprogenitoras responsáveis, em parte, pela formação do calo desde os tecidos moles adjacentes (Griffon, 2005). Este tipo de cicatrização óssea é raro uma vez que a maioria das fraturas não são tratadas ou então são tratadas através de métodos que permitem algum grau de movimento como é o caso de bandagens, fixação externa ou fixação intramedular. Apesar desta cicatrização já ter sido considerada como um objetivo a atingir na resolução de fraturas parece não haver vantagens relativamente à cicatrização secundária (Sfeir *et al.*, 2005).

Na prática existem pontos de contacto separados por zonas onde os fragmentos se encontram separados por pequenas lacunas, uma vez que é impossível atingir congruência total das margens ósseas (Griffon, 2005). Como tal, este tipo de cicatrização pode ser dividido em cicatrização por lacunas e cicatrização por contacto, sendo ambos capazes de atingir a união óssea sem a formação de calo externo, tecido fibroso ou cartilágneo (Sfeir *et al.*, 2005). Na cicatrização por contacto a formação óssea e a remodelação ocorrem em simultâneo enquanto que na cicatrização por lacunas estas etapas são sequenciais (Sfeir *et al.*, 2005).

1.5.2.1. Cicatrização por Lacunas

Este tipo de cicatrização dá-se entre margens ósseas separadas a menos de 800 μm a 1mm e com uma tensão interfragmentária inferior a 2% (Griffon, 2005). Esta ocorre em duas fases e inicia-se com o preenchimento ósseo ao qual se segue a remodelação (Sfeir *et al.*, 2005). Na primeira fase a largura do espaço é preenchida através de formação direta de tecido ósseo. Inicialmente, é depositada uma matriz de osso imaturo, seguindo-se a formação de osso lamelar como suporte. Nesta fase o osso recém formado está orientado transversalmente em relação ao osso lamelar original, não existindo tecido conectivo ou fibrocartilagem no espaço precedendo a formação de osso (Sfeir *et al.*, 2005). Na segunda fase, que ocorre 3 a 8 semanas depois (Griffon, 2005), uma remodelação longitudinal dos canais de Havers reconstrói as margens necróticas do foco de fratura, assim como do osso recém formado de modo a que a zona fraturada seja substituída por sistemas de Havers de orientação original (Sfeir *et al.*, 2005). O resultado final é o retorno da estrutura óssea ao que era antes da lesão (Sfeir *et al.*, 2005).

1.5.2.2. Cicatrização por Contacto

Contrariamente à cicatrização por lacunas, a cicatrização por contacto ocorre quando os fragmentos ósseos estão em contacto direto ou quando a distância entre os topos ósseos é inferior a 0,01mm e a tensão interfragmentária é inferior a 2% (Griffon, 2005), permitindo assim aos sistemas de Havers crescer ao longo do foco de fratura, paralelamente ao eixo axial, sem serem precedidos pela formação de osso transversal ao eixo axial entre as margens de fratura (Sfeir *et al.*, 2005). Nestas condições, os osteoclastos, localizados nas extremidades dos sistemas de Havers mais próximos à fratura, iniciam uma resposta de reabsorção em túnel

e formam cones penetrantes que atravessam a linha de fratura (Sfeir *et al.*, 2005). A parte posterior destes cones é formada por osteoblastos que possibilitam a ocorrência simultânea de união óssea e remodelação haversiana (Griffon, 2005). A cavidade que se forma com esta reabsorção permite a penetração de capilares e eventualmente o estabelecimento de novos sistemas de Havers. Estes vasos sanguíneos são acompanhados de células endoteliais e osteoprogenitoras que levam à produção de sistemas de Havers ao longo da fratura. Este tipo de cicatrização também poderá levar a um restauro da arquitetura óssea normal (Sfeir *et al.*, 2005).

A figura 6 apresenta uma representação esquemática dos processos de cicatrização óssea primários.

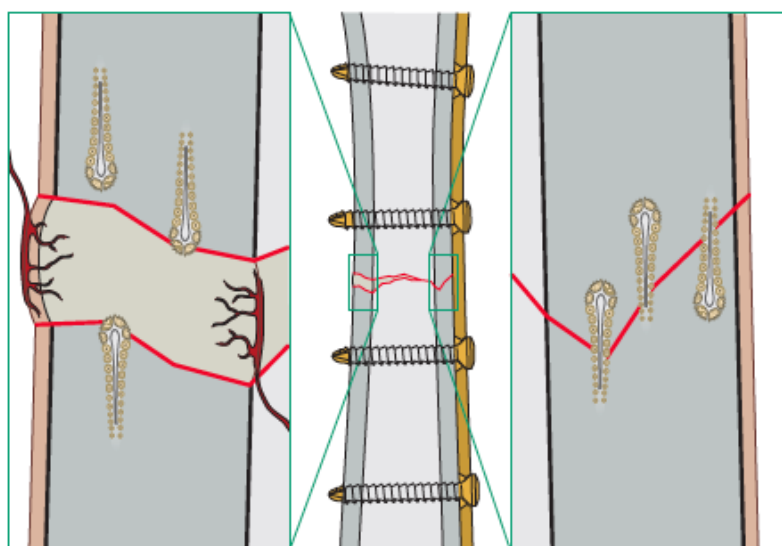


Figura 6: Cicatrização óssea primária após estabilização rígida do foco de fratura: No córtex subjacente à placa ocorre cicatrização por contacto através de remodelação direta dos sistemas de Haver. No córtex oposto à placa existe uma pequena lacuna entre os topos ósseos que cicatrizará em duas fases: deposição de osso imaturo com orientação perpendicular ao eixo axial do osso; e substituição do osso imaturo por sistemas de Havers com orientação original, ou seja, paralelos ao eixo axial do osso, através dos cortes penetrantes formados pelos osteoclastos (Adaptado de Griffon, 2005).

1.5.3. Conclusão

A biologia da cicatrização óssea é um processo complexo que culmina com a regeneração da arquitetura óssea normal. A cicatrização óssea primária ocorre quando existe estabilização rígida do foco de fratura e quando é inibida a formação de calo. A cicatrização por contacto e a cicatrização de lacunas são ambas consideradas processos de cicatrização

primários. Já a cicatrização secundária ocorre quando não existe estabilização rígida do foco de fratura levando ao desenvolvimento de um calo. Este processo é um pouco mais complexo e consiste nas fases inflamatória, de reparação e de remodelação

1.6. Expressão de BMPs durante a Cicatrização de Fraturas

Tal como foi descrito anteriormente, o processo de cicatrização de fraturas pode ser dividido em três fases distintas: inflamação, reparação e remodelação. Durante estas fases ocorrem interações entre células diferentes através de fatores de crescimento, citocinas, receptores e moléculas de sinalização intermediárias.

Dentro dos fatores de crescimento e proteínas da matriz mais estudadas encontram-se: o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β); fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs); fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs); fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs); proteínas morfogénicas ósseas (BMPs); osteonectina, osteocalcina, osteopontina e fibronectina; receptores das proteínas morfogénicas ósseas (BMPRs); Smads; interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6); fator estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF); fator estimulante de colónias de macrófagos (M-CSF); e vários isótopos de colagénio (Sfeir *et al.*, 2005).

1.6.1. Funções e Expressão das BMPs durante a Cicatrização de Fraturas

Durante a cicatrização óssea as BMPs são produzidas por células mesenquimatosas, condrócitos e osteoblastos. As Diferentes BMPs interagem entre si e com outros membros da família TGF- β de forma cooperativa ou independente de modo a desencadarem uma cascata de eventos que promova a formação de cartilagem e osso (Al-Alq, 2008). Os processos estimulados pelas BMPs incluem quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células mesenquimatosas, angiogénese e síntese de matriz extracelular (Sakou, 1998; Reddi, 2001; Al-Alq, 2008).

Com base em diversos estudos são as BMPs -2, -4, -6, -7 e -9 que apresentam um evidente papel osteoindutor durante a formação de tecido ósseo (Chen *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004; Bessa *et al.*, 2008a; Kopf *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por Cho *et al.* (2002) teve como objetivo examinar a expressão temporal de algumas BMPs durante a cicatrização de fraturas. A BMP-2 foi expressa desde o dia 1 com expressão máxima ao fim das primeiras 24 horas, registando um segundo aumento mais tardio durante o pico da osteogénese. Esta parece ser induzida com grande intensidade imediatamente após as fraturas, isto é, durante o período de recrutamento de células mesenquimatosas indiferenciadas ao foco de fratura e na fase inicial da condrogénese. Neste contexto, é possível especular que a BMP-2 pode servir de indutor da cascata de cicatrização e de regulador da expressão de outras BMPs envolvidas no processo de cicatrização óssea.

Esta hipótese é suportada por outros estudos, entre os quais o realizado por Tsuji *et al.* (2006). Neste estudo foram criadas fraturas em ratos incapazes de produzirem BMP-2 nos ossos constituintes dos membros de forma a avaliar o processo de cicatrização óssea a nível celular e molecular. Na ausência de BMP-2 as fases iniciais do processo de cicatrização não ocorriam, permanecendo indiferenciadas as células mesenquimatosas no foco de fratura. Estas células apresentavam níveis elevados de receptores de BMPs, o que indicava que tinham potencial para se diferenciarem mas faltava-lhes o estímulo adequado para tal. Embora na fase inicial do processo existissem níveis normais das BMPs -4 e -7, possuidoras de um potente papel osteogénico, o organismo não conseguia compensar a falta de BMP-2. Com o decorrer do processo de cicatrização também não havia uma produção contínua das BMPs -4 e -7 devido à não diferenciação das células mesenquimatosas em osteoblastos ou condrócitos. Este estudo permitiu identificar a BMP-2 como um componente essencial para o processo de cicatrização óssea. Um outro estudo *in vitro* levado a cabo por Edgar *et al.* (2007) demonstrou que a BMP-2 é um mediador inicial da diferenciação de células mesenquimatosas em osteoblastos e que controla a sua própria expressão assim como a de outras BMPs.

Ainda no estudo de Cho *et al.* (2002) as BMPs -3, -4, -7 e -8 tiveram uma expressão restrita ao período de maior atividade osteogénica, nomeadamente entre os dias 14 e 21.

A expressão elevada de BMP-3 durante este período vai ao encontro do que se pensa ser a sua função, principalmente no seu papel regulador das BMPs osteogénicas (Bahamonde & Lyons, 2001; Cho *et al.*, 2002).

O padrão de expressão das BMPs -7 e -8 foi consistente com as atividades de desenvolvimento que lhes são atribuídas, uma vez que foram expressas na fase osteogénica da cicatrização óssea quando a formação de osso é máxima e a reabsorção da cartilagem calcificada está a decorrer, promovendo nesta fase o recrutamento de células da linhagem osteoblástica.

As BMPs -3b, -5 e -6 foram expressas continuamente desde o dia 3 e permaneceram elevadas durante todo o período de cicatrização. A BMP-3b apresentou um aumento da expressão durante os dias 7 e 21, o que sugere um papel regulador da condrogénese e da ossificação intramembranosa.

As BMPs -5 e -6 foram expressas de forma contínua, sugerindo a sua participação como agonistas ou antagonistas de outras BMPs de expressão temporal mais restrita em várias funções fisiológicas durante o processo de cicatrização óssea. Estas parecem estar envolvidas na regulação da condensação das células mesenquimatosas, progressão da ossificação endocondral e estimulação da maturação dos condrócitos.

A BMP-9 apesar de possuir uma actividade osteogénica elevada (Kang *et al.*, 2004; Bessa *et al.*, 2008a; Lauzon *et al.*, 2012) necessita de uma maior investigação, uma vez que continua desconhecido o seu surgimento durante a cicatrização de fraturas (Lauzon *et al.*, 2012). Num estudo recente, descobriu-se que esta BMP está presente nas plaquetas e é libertada após ativação das mesmas (Osada *et al.*, 2012). Uma vez que a desgranulação plaquetária ocorre durante as primeiras fases da ossificação através da formação do hematoma, é possível que esta proteína seja parte constituinte do complexo inicial de citocinas que estimulam o processo de cicatrização (Lauzon *et al.*, 2012).

1.7. Vias de Sinalização das BMPs

As BMPs possuem efeitos precisos na proliferação e diferenciação celular que se iniciam com a ligação destas a dois receptores do tipo cinases de serina-treonina presentes na superfície celular, nomeadamente a um receptor tipo I (T β RI) e a outro tipo II (T β RII) (ten Dijke *et al.*, 1996; Kretschmar & Massagué, 1998; Miyazono, 1999; Massagué & Gomis, 2006; Sieber *et al.*, 2009; Miyazono *et al.*, 2010; Ehrlich *et al.*, 2011; Heining *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Huang & Chen, 2012; Kopf *et al.*, 2012), desencadeando-se vias de sinalização intracelulares específicas que ativam e influenciam a transcrição de genes (Bessa *et al.*, 2008a; Guo & Wu, 2012).

Ambos os receptores são necessários para a transdução dos sinais das BMPs (ten Dijke *et al.*, 1996; Miyazono, 1999; Miyazono *et al.*, 2005; Bessa *et al.*, 2008a; Sieber *et al.*, 2009; Miyazono *et al.*, 2010), encontrando-se presentemente descritos três receptores tipo I (ActR-IA (Alk-2), BMPR-IA (Alk-3) e BMPR-IB (Alk-6)) e três receptores tipo II (BMPR-II, ActR-IIA e ActR-IIB) (Nohe *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007; Guo & Wu, 2012).

Os receptores tipo II encontram-se constitutivamente ativos, enquanto que os receptores tipo I são ativados através da transfosforilação dos seus domínios ricos em glicina-serina (GS) pelos receptores tipo II. Após a ativação, os receptores tipo I vão desencadear vários mecanismos de sinalização intracelular. A especificidade dos sinais intracelulares é então maioritariamente determinada pelos receptores tipo I, uma vez que estes atuam como um componente subsequente dos receptores tipo II (Miyazono *et al.*, 2005; Miyazono *et al.*, 2010).

Na superfície celular os receptores podem apresentar-se sob a forma de complexos heteroméricos, ou seja, complexos preformados de receptores tipo I e II ou sob a forma homomérica, em que a ligação do ligando (BMP) se faz preferencialmente ao receptor tipo I (maior afinidade), ao qual se junta no seguimento do processo um receptor tipo II e se forma um complexo heteromérico (Nohe *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007; Sieber *et al.*, 2009).

As BMPs tendem-se a ligar com maior afinidade aos complexos heteroméricos preformados (ten Dijke *et al.*, 1996; Massagué, 1998; Kloen *et al.*, 2003), desencadeando-se a via de sinalização das proteínas Smad (Kloen *et al.*, 2003).

No entanto, a interação dos ligandos com os receptores pode induzir vias de sinalização alternativas às Smads. A título de exemplo temos a BMP-2 que caso se ligue a complexos preformados de receptores heteroméricos induz a via de sinalização Smad, enquanto que a sua ligação a receptores homoméricos com a subsequente formação de complexos heteroméricos resulta na ativação da via MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) (Wu *et al.*, 2007; Bessa *et al.*, 2008a; Zeng *et al.*, 2010).

Estas diferentes combinações dos ligandos com os receptores tipo I e II são a chave para se desencadarem sinais distintos e específicos que resultarão em diferentes efeitos a nível celular, uma vez que para a família das BMPs são conhecidos mais ligandos que receptores (Bessa *et al.*, 2008a).

Nesta dissertação será apenas descrita a principal via de sinalização das BMPs, a via Smad.

1.7.1. Sinalização pela Via Smad

As proteínas Smad são os principais transdutores dos sinais dos receptores de serina-treonina (Miyazono *et al.*, 2005; Bessa *et al.*, 2008a; Miyazono *et al.*, 2010).

Estas podem ser classificadas em três classes: R-Smads (Smads reguladas por receptores), Co-Smads (Smads co-mediadoras) e I-Smads (Smads inibitórias). As Smads 1, 2, 3, 5 e 8 constituem as R-Smads, embora as únicas ativadas pelos receptores tipo I das BMPs sejam as Smads 1, 5 e 8. A Smad4 é a única Co-Smad conhecida e as Smads 6 e 7 constituem as I-Smads (Kretzschmar & Massagué, 1998; Miyazono, 1999; Nohe *et al.*, 2004; Miyazono *et al.*, 2005; Sieber *et al.*, 2009; Miyazono *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2010).

Após a ativação, os receptores tipo I fosforilam as R-Smads que por sua vez se libertam dos receptores (Miyazono, 1999; Nohe *et al.*, 2004; Miyazono *et al.*, 2005; Miyazono *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012). Duas R-Smads fosforiladas formam um complexo heterotrimérico com uma Co-Smad (Bessa *et al.*, 2008a), sendo o complexo translocado para o núcleo onde vai modular a transcrição de genes em cooperação com fatores de transcrição e com co-ativadores ou co-repressores de transcrição (Figura 7) (Miyazono *et al.*, 2005; Bessa *et al.*, 2008a; Miyazono *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2010). Um exemplo de um fator de transcrição envolvido é o Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*) que participa juntamente com as Smads na transcrição de genes essenciais para a formação óssea e diferenciação das células em osteoblastos (Harada & Rodan, 2003; Miyazono *et al.*, 2010; Nishimura *et al.*, 2012;).

A regulação negativa da transdução de sinais Smad induzidos pelas BMPs a nível intracelular é modulada pelas I-Smads. Estas atuam através da ligação a receptores do tipo I ativados, prevenindo assim a interação destes com as R-Smads. As I-Smads atuam também através da interação com R-Smads ativadas pelos receptores, prevenindo a formação de complexos entre estas e as Co-Smads (Miyazono, 1999; Derynck & Zhang, 2003; Nohe *et al.*, 2004; Miyazono *et al.*, 2005; Miyazono *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2010;). A Smad 6 inibe preferencialmente a sinalização das BMPs, enquanto que a Smad 7 não é específica para estas (Nohe *et al.*, 2004; Miyazono *et al.*, 2005; Miyazono *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2010).

Existem ainda várias outras moléculas que participam na regulação intracelular das BMPs e, apesar de atuarem de formas diferentes, têm todas o objetivo comum de limitar a atividade ou expressão das BMPs (Giannoudis *et al.*, 2007).

A nível extracelular existem também antagonistas das BMPs que atuam de modo a regular a sua sinalização. Estes antagonistas são moléculas extracelulares que se ligam às BMPs e impedem a sua interação com os receptores (Nohe *et al.*, 2004; Rosen, 2006; Bessa *et al.*, 2008a; Sieber *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2010).

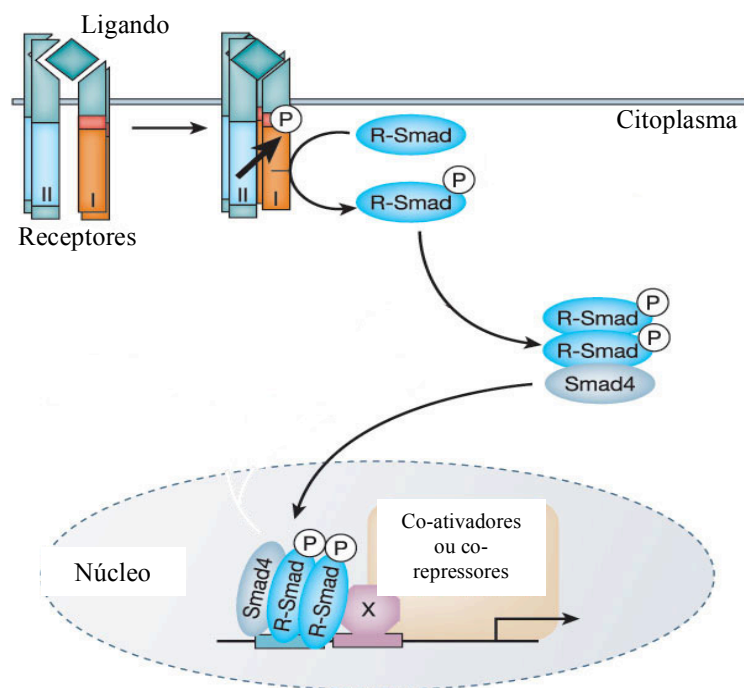


Figura 7: Sinalização pela via Smad: Na superfície celular os ligandos ligam-se preferencialmente a um complexo heteromérico preformado de receptores do tipo cinases de serina-treonina (tipo I e II), induzindo a fosforilação (P) do domínio GS do receptor tipo I pelo receptor tipo II; Os receptores tipo I após ativação fosforilam R-Smads que por sua vez se associam a uma Co-Smad de modo a formarem um complexo que se translocará para o núcleo. No núcleo o complexo associa-se a fatores de transcrição (X), como é o caso do Runx2, e a co-ativadores ou co-repressores de transcrição (Derynck & Zhang, 2003).

1.8. Aplicações Clínicas das BMPs

Para que a cicatrização óssea ocorra com sucesso é necessário que haja estabilidade mecânica e um microambiente biológico favorável no foco de fratura (Virk & Lieberman, 2012). Este é um processo complexo e bem orquestrado que ocorre ininterruptamente, no entanto existem situações clínicas que podem beneficiar da utilização de agentes potenciadores deste processo (Argintar *et al.*, 2011).

O enxerto ósseo autólogo colhido da crista ilíaca é atualmente o *gold standard* para o tratamento da maioria das situações em que é necessária regeneração óssea, uma vez que possui características osteoindutoras, osteocondutoras e osteogênicas (Giannoudis *et al.*, 2005; Nauth *et al.*, 2011;). No entanto, este apresenta uma série de limitações nas quais se incluem a morbilidade de uma segunda incisão, a quantidade limitada de enxerto que se pode obter e as possíveis complicações associadas com a colheita, nomeadamente infecção, hematoma, lesão neurológica e fratura. Para além disto, este apresenta também uma taxa de insucesso significativa em defeitos ósseos extensos (Nauth *et al.*, 2011). Em resposta a estas

limitações e face à crescente frequência com que se realizam procedimentos de colheita óssea com fins regenerativos, foram realizadas extensas pesquisas baseadas na aplicação terapêutica de fatores de crescimento como alternativa ao enxerto ósseo (Nauth *et al.*, 2011).

Dentro das vantagens decorrentes da utilização de factores de crescimento em detrimento do enxerto ósseo encontram-se a ausência de morbidade, complicações e tempo cirúrgico associados com a recolha do mesmo. Outra das vantagens advém do facto da tecnologia recombinante permitir a produção dos fatores de crescimento em larga escala, eliminando assim os potenciais problemas com a quantidade limitada de enxerto ósseo que se pode obter (Nauth *et al.*, 2011).

As BMPs são um destes agentes alternativos e atualmente são dos fatores de crescimento mais estudados em cirurgia ortopédica (Axelrad *et al.*, 2007).

Estas possuem fortes propriedades osteoindutoras (Fitch *et al.*, 1997; Giannoudis *et al.*, 2005; Bessa *et al.*, 2008a) e são administradas ao paciente num implante (e.g. esponja absorvível de colagénio) que tem como principal objetivo reter as BMPs no local de lesão durante um período prolongado de tempo, providenciando assim um suporte inicial para a adesão celular e conseqüente formação de tecido regenerativo (Bessa *et al.*, 2008b).

1.8.1. Aplicações em Medicina Humana

Nesta área o destaque vai para as BMPs recombinantes -2 e -7 (Virk & Lieberman, 2012), uma vez que são as únicas proteínas da sua família comercialmente disponíveis para uso clínico (Argintar *et al.*, 2011; Nauth *et al.*, 2011).

No entanto, estas BMPs apresentam um leque limitado de indicações para as quais estão aprovadas. De forma sucinta, a rhBMP-2 está aprovada como alternativa ao enxerto ósseo autólogo em certos tipos de cirurgia espinhal, tratamento de fraturas abertas da diáfise tibial, estabilizadas com pino intramedular num prazo de 14 dias após a ocorrência do trauma, e certos procedimentos maxilofaciais. A rhBMP-7 recebeu aprovação como alternativa ao enxerto ósseo autólogo em determinados procedimentos espinhais e para o tratamento de não-uniões refractárias de ossos longos em que o uso de enxerto ósseo esteja desaconselhado e os tratamentos alternativos tenham fracassado (Harvard Pilgrim Health Care, 2007).

Ambas as rhBMPs têm também sido aplicadas de forma “off label” em diversas situações, nomeadamente para o tratamento de fraturas agudas, defeitos ósseos, uniões retardadas e não uniões (Schmidmaier *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos nos estudos, que reportam a utilização de rhBMP-2 e -7 em situações clínicas específicas, demonstraram de uma forma geral que estas BMPs têm uma acção comparável ou superior à do enxerto ósseo (Bishop & Einhorn, 2007). Todavia, estes resultados ficaram à quem das expectativas, uma vez que não se verificaram as mesmas respostas robustas e impressionantes como as que se obtiveram em modelos animais após a aplicação de rhBMPs (Westerhuis *et al.*, 2005; Bishop & Einhorn, 2007; Gautschi *et al.*, 2007).

Várias são as hipóteses que podem explicar esta disparidade de resultados obtidos: o facto do *turnover* ósseo, assim como o recrutamento de células osteogénicas, ser diferente entre roedores, pequenos animais (cães) e mamíferos superiores (primatas não humanos e humanos); a dosagem pode ainda não estar otimizada, uma vez que as doses atualmente utilizadas são supra-fisiológicas; cada fratura ou não união são potencialmente diferentes pelo que a população celular local pode variar, podendo este facto ter impacto na dosagem e no resultado; e o facto dos humanos apresentarem uma expressão elevada de antagonistas das BMPs nos locais de fratura ou de não uniões, ou das quantidades supra-fisiológicas de BMPs administradas estimularem a produção excessiva de antagonistas através do normal mecanismo de feedback negativo. Para além do mais, ainda se desconhece qual a BMP ideal para induzir a regeneração óssea em fraturas e não-uniões e se o ideal seria a utilização de uma combinação de várias BMPs (Westerhuis *et al.*, 2005).

Existem assim demasiadas variáveis que podem potencialmente influenciar o resultado final (De Biase & Capanna, 2005), sendo necessário continuar a investigar novos métodos que permitam aumentar a capacidade de resposta do organismo às BMPs (Bishop & Einhorn, 2007).

1.8.2. Aplicações em Medicina Veterinária

Em medicina veterinária já existem vários estudos que reportam a utilização de rhBMPs em diversas situações clínicas. Uma vez que esta dissertação está inserida no contexto dos pequenos animais será dada especial atenção a estudos realizados no cão e no gato.

Em seguida serão apresentados breves resumos de estudos que foram publicados em alguns dos principais jornais de medicina veterinária:

Schmoekel *et al.* (2005) reportaram a aplicação de rhBMP-2 não glicosilada numa matriz de fibrina para o tratamento de 11 não uniões-ósseas, 1 defeito ósseo resultante de uma osteotomia corretiva, 21 panartrodeses carpais, 4 artrodeses parciais do tarso e 4 artrodeses totais do tarso em cães e gatos. Os resultados obtidos foram positivos pois a união óssea ocorreu sem problemas em 37 casos (90%). De entre as complicações reportadas, houve uma artrodese pancarpal e uma não união tibial que necessitaram de uma segunda aplicação do composto para se atingir união óssea; um caso de não união metacárpica deixou de ter seguimento às 7 semanas, altura em que ainda não evidenciava união óssea; num caso de artrodese pancarpal a placa foi removida devido a suspeita de infecção, tendo sido a articulação estabilizada apenas com uma bandagem; uma artrodese parcial não cicatrizou pelo que na cirurgia de revisão foi aplicado um enxerto esponjoso autólogo que levou a união óssea; e uma não união femoral infectada não apresentou sinais de união após duas aplicações do composto, no entanto este animal havia sido previamente submetido a 4 cirurgias de revisão com colocação de novos implantes e aplicação de enxerto ósseo autólogo. Na perspectiva dos autores, este composto pode substituir com sucesso o enxerto ósseo autólogo em cães e gatos.

Arnault *et al.* (2011) reportaram o tratamento de uma fratura distal de rádio e ulna altamente cominutiva causada por arma de fogo num gato através de redução fechada e montagem de um fixador externo circular. Às 28 semanas após a intervenção cirúrgica foi diagnosticada uma não união óssea, tendo sido realizada uma cirurgia para a aplicação de rhBMP-2 numa matriz absorvível de colagénio. Os resultados obtidos foram positivos, uma vez que 8 semanas após a aplicação da rhBMP-2 (36 semanas após a primeira intervenção) era evidente uma boa progressão da cicatrização óssea nas radiografias. Nesta fase foi notada instabilidade do fixador externo, procedendo-se assim à sua remoção e aplicação de uma tala a ser trocada semanalmente até o processo de cicatrização ter terminado. A união óssea foi atingida 44 semanas após a primeira intervenção. Segundo os autores, a aplicação de rhBMP-2 numa matriz de colagénio é uma opção viável para o tratamento de não uniões em gatos, referindo também que são necessários mais estudos para avaliar este tipo de produtos.

Bernard *et al.* (2008) apresentaram o caso de um cão com osteopénia extrema do rádio secundária a diversas intervenções cirúrgicas realizadas aos longo de vários meses, tendo este sido tratado com enxerto ósseo autólogo a fim de se aumentar o volume radial. Pelo facto deste tratamento ter fracassado optou-se pela aplicação de rhBMP-2 numa matriz de colagénio absorvível. Os resultados foram positivos pois dois meses após a aplicação da

rhBMP-2 confirmou-se radiograficamente a mineralização óssea. As radiografias realizadas posteriormente revelaram uma completa remodelação óssea. Para os autores, os resultados sugerem que a rhBMP-2 é um agente a ter em conta no manejo de fraturas osteoporóticas em raças toy e miniatura, no entanto são necessários mais estudos para confirmarem estes resultados e para determinarem qual a dose ideal de rhBMP a aplicar e qual o implante ideal para administrar a rhBMP.

Milovancev *et al.* (2007) reportaram a aplicação de rhBMP-2 numa matriz de fosfato de cálcio para os tratamentos de uma não união de uma fratura altamente cominutiva da diáfise femoral, união retardada de uma osteotomia corretiva do rádio e uma não união de uma fratura cominutiva espiralada do úmero, assim como a aplicação de rhBMP-2 numa matriz de colagénio absorvível para o tratamento de uma artrodese total do tarso falhada, que teve de ser repetida e que cursava com uma fratura do terceiro osso metatarsiano. Os resultados obtidos foram positivos, uma vez que todos os animais atingiram união óssea. Dentro das complicações decorrentes da aplicação de rhBMP-2 constam a mineralização ortotópica e heterotópica excessivas nos 4 casos e agravamento transitório da claudicação com duração aproximada de duas semanas em 2 casos. Os autores, com base nestes casos, concluíram que a administração de rhBMP-2 é um método eficaz para o tratamento de uniões retardadas e não uniões.

Schmökel *et al.* (2004) reportaram a utilização de rhBMP-2 não glicosilada aplicada numa matriz de fibrina no tratamento de não uniões ósseas em 5 cães e 3 gatos. Com exceção de dois casos, onde apenas se aplicou o agente osteoindutor, o tratamento consistiu também em revisão cirúrgica da zona de fratura. Os resultados foram positivos, uma vez que em 7 casos foi atingida união óssea, tendo apenas um animal requerido uma cirurgia de revisão e uma nova aplicação de rhBMP-2 não glicosilada por ter sofrido novo trauma na zona afectada. Um dos gatos que apresentava uma não união atrófica metatarsiana não apresentou sinais de regeneração óssea nas 7 primeiras semanas e o seguimento do animal perdeu-se, pois o proprietário recusou realizar mais tratamentos. Para os autores, este estudo mostrou um efeito benéfico na aplicação de rhBMP-2 não glicosilada no tratamento de não uniões no cão e no gato.

Boudrieau *et al.* (2004) reportaram o tratamento de uma cadela com severa má oclusão mandibular secundária a uma intervenção realizada para excisão, por hemimandibulectomia parcial, de um carcinoma das células escamosas na mandíbula esquerda. A reconstrução mandibular foi estabilizada com uma mini placa e uma placa de

reconstrução mandibular no lado direito, e com uma mini placa e uma placa de reconstrução mandibular bloqueada no lado esquerdo. Esta intervenção deixou, no entanto, um defeito ósseo com 1,5 cm de comprimento no ramo horizontal direito, enquanto que na mandíbula esquerda gerou-se um defeito com 7 cm. Ambos os defeitos foram preenchidos com rhBMP-2 administrada numa matriz combinada de colagénio e fosfato tricálcico. Devido à extensão do defeito mandibular esquerdo e de modo a proteger o agente osteoindutor durante o período pós-operatório inicial, foi colocado subjacentemente à gengiva um enxerto monocortical proveniente da costela. A evolução clínica do paciente foi positiva e aos três meses já haviam evidências de formação óssea nas radiografias e na palpação dos defeitos assim como sinais de proliferação óssea nos tecidos moles adjacentes. Aos 6 e 12 meses aferiu-se a viabilidade e revascularização do enxerto através de cintigrafia, tendo os resultados obtidos sido consistentes com remodelação óssea ativa associada ao processo de cicatrização óssea. Neste estudo apenas se reportaram duas pequenas complicações associadas aos dentes e à presença de uma tumefação pós-operatória dos tecidos moles na mandíbula esquerda. Segundo os autores, a ausência de maiores complicações e a rápida cicatrização observada devem tornar a abordagem utilizada e a aplicação da rhBMP-2 uma opção no tratamento de defeitos mandibulares extensos.

Spector *et al.* (2007) reportaram o tratamento de um odontoma mandibular complexo num cão. A fim de se proceder à exérese da massa, foi realizada um mandibulectomia parcial que gerou um defeito ósseo com 5 cm de comprimento, tendo a mandíbula sido estabilizada através da aplicação de duas placas de reconstrução bloqueadas, ao qual se seguiu o preenchimento do defeito ósseo através da aplicação de rhBMP-2 numa matriz de colagénio absorvível contendo grânulos de hidroxiapatite/fosfato tricálcico. A evolução clínica do paciente foi positiva e aos 2 meses já haviam evidências radiográficas de formação óssea. Aos 5 meses era evidente uma robusta formação de osso cortical nas radiografias e à palpação. Aos 26 meses o animal apresentava oclusão perfeita e osso cortical remodelado ao longo de todo o defeito ósseo. Neste estudo apenas foram reportadas pequenas complicações. Segundo os autores, as técnicas de reconstrução empregues, neste caso, constituem uma alternativa a situações clínicas, como a remoção de tumores, que apresentam como única solução disponível a mandibulectomia ou a radioterapia.

Apesar destes estudos apresentarem resultados positivos é necessário ter em conta que a não existência de grupos de controlo enfraquece o valor científico dos resultados obtidos, havendo a possibilidade, entre outras, da cicatrização óssea ser apenas o resultado de

uma boa técnica cirúrgica e de uma osteosíntese bem executada em termos biomecânicos (Westerhuis *et al.*, 2005).

Diversos estudos apresentam também resultados promissores decorrentes da aplicação de rhBMPs em vários modelos animais, entre os quais cães (Boyce *et al.*, 2009; Schaefer *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2007), cabras (Welch *et al.*, 1998), cavalos (Perrier *et al.*, 2008), coelhos (Bouxsein *et al.*, 2001; Luppen *et al.*, 2002), primatas (Seeherman *et al.*, 2006) e ratos (Lee *et al.*, 2002; Einhorn *et al.*, 2003).

Todavia, estes estudos não mimetizam de forma representativa as situações clínicas reais, uma vez que estes animais não são sujeitos a cirurgias prévias, não apresentam geralmente doenças concomitantes nem de lesões prévias dos tecidos moles e não sofreram meses de apoio limitado do membro traumatizado na sequência de uma cicatrização óssea falhada. Nestes estudos também se usam mais comumente animais jovens, o que torna o significado clínico mais limitado dado o seu alto potencial de cicatrização (Gautschi *et al.*, 2007; Moghaddam *et al.*, 2010). Por estes motivos não serão apresentados resultados de estudos realizados em modelos animais.

1.9. BMPs Disponíveis em Medicina Veterinária

Em medicina humana estão disponíveis no mercado fórmulas comerciais de rhBMP-2 e rhBMP-7 para aplicação em várias especialidades cirúrgicas (Milovancev *et al.*, 2007; Bessa *et al.*, 2008a; Lissenberg-Thunnissen *et al.*, 2011). Segundo a pesquisa realizada na elaboração da tese, em medicina veterinária a única rhBMP disponível no mercado tem a denominação de “TruScient® 0,66 mg kit para implante para cães” e é um medicamento comercializado pela empresa *Pfizer*.

O *TruScient*® tem como princípio ativo a dibotermína alfa, análogo sintético da BMP-2 produzido por tecnologia recombinante, e foi desenvolvido tendo por base o produto aprovado para medicina humana *InductOs* (European Medicines Agency, 2011a). Este medicamento recebeu aprovação para o “tratamento complementar do procedimento padrão na redução aberta de fraturas diafisárias em cães” e é fornecido na forma de um kit composto por: um frasco de liofilizado contendo a dibotermína alfa (rhBMP-2); um frasco de solvente; duas esponjas de colagénio absorvíveis; e três seringas que permitem a reconstituição do solvente no liofilizado e a subsequente aplicação da solução nas esponjas de colagénio (Figura 8) (European Medicines Agency, 2011a,b).



Figura 8: Apresentação comercial do *TruScient*® (adaptado de http://s355685463.onlinehome.fr/detail_medicament.php?id=2416).

Após a aplicação do *TruScient*® sobre as duas esponjas de colagénio absorvíveis, deverá existir um período de repouso antes da sua implantação no animal de pelo menos 15 minutos sem ultrapassar as duas horas (European Medicines Agency, 2011a,b).

A implantação das esponjas no animal deverão obedecer a vários requisitos, entre os quais: assegurar a redução definitiva da fratura, a sua estabilização e hemóstase; o foco de fratura deverá estar o mais seco possível; as esponjas pré-preparadas deverão ser cortadas ou dobradas de modo a que as suas dimensões se ajustem à zona de implantação; deverá ser utilizada apenas a quantidade necessária à cobertura da zona afetada do osso; a sua colocação deverá ser feita de maneira a envolver a zona de fratura e a estabelecer bom contato com os principais fragmentos proximal e distal; e não deverão ser colocadas sobre placas de osso para não dificultar a remoção desta caso venha a ser necessário (European Medicines Agency, 2011b).

Após a sua implantação na fratura não se deverá proceder à irrigação da ferida, uma vez que estas proteínas são hidrossolúveis (Kirker-Head, 2000; Rengachary, 2002), sendo também importante obter uma cobertura completa da esponja com tecidos moles (European Medicines Agency, 2011b).

Os efeitos secundários decorrentes da aplicação do *TruScient*® com maior prevalência são a claudicação, a tumefação evidente nas 3 primeiras semanas do pós-operatório que vai desaparecendo gradualmente ao longo de vários meses e a tumefação ligeira que desaparece em 3 semanas. Este medicamento não deverá ser utilizado em cães

com hipersensibilidade à diboterminalfa ou a qualquer outro componente do medicamento, em cães esqueléticamente imaturos, em cães que tenham uma infecção ativa no local da cirurgia e em cães com fraturas patológicas ou qualquer malignidade ativa (European Medicines Agency, 2011a,b).

Em medicina humana são frequentemente colocadas questões relativas às doses, sistemas de administração e vias de administração de forma a otimizar a utilização e eficácia das BMPs. Estas questões abrangem o *TruScient*® visto que este é baseado num produto aprovado para medicina humana, não obstante o facto de este ser um medicamento devidamente aprovado.

Atualmente, o *TruScient*® tem como sistema de administração da rhBMP-2 as esponjas de colagénio, no entanto a sua utilização apresenta inconvenientes como o facto de ser necessário abrir o foco de fratura ou o defeito ósseo em causa e a possibilidade de ocorrência de reações adversas dada a origem bovina do colagénio. Além disso, a incorreta implantação das esponjas pode levar à ossificação heterotópica de tecidos adjacentes como é o caso dos músculos, nervos e vasos sanguíneos, embora este fenómeno seja limitado pelo facto de se tratar de uma implantação local (Schmidmaier *et al.*, 2008). Existem também estudos cinéticos que demonstram que quando se utilizam esponjas de colagénio metade da dose é perdida na primeira hora e dois terços nos primeiros 4 dias. De momento existem vários sistemas de administração de BMPs em estudo (Bessa *et al.*, 2008b), no entanto a via injetável parece ser a mais promissora e inovadora (Schmidmaier *et al.*, 2007). Estes sistemas injetáveis ainda estão em fase de investigação e caso venham a ser aprovados podem trazer benefícios, como a possibilidade de administra-las em fraturas tratadas de forma conservadora e por técnicas minimamente invasivas, ou seja, passa a não ser necessário realizar um acesso ao foco de fratura para a implantação das BMPs (Bishop & Einhorn, 2007; Schmidmaier *et al.*, 2007). Outra das questões prende-se com o facto da dose atualmente utilizada ser supra-fisiológica e não se conhecerem os potenciais efeitos secundários a longo termo (Virk & Lieberman, 2012).

1.10. Objetivos

Aplicação da rhBMP-2 comercializada pela *Pfizer* sob a designação de “*TruScient*® 0,66 mg kit para implante para cães” em casos clínicos ortopédicos e traumatológicos selecionados.

2. Materiais e Métodos

Durante o período de estágio curricular no Hospital Veterinário Canis, em Girona, registaram-se 6 casos clínicos onde se aplicou a rhBMP-2 produzida pela empresa *Pzifer*. A sua aplicação foi possível devido à cedência gratuita do medicamento pela sucursal responsável pela libertação dos lotes para o mercado veterinário. Esta cedência foi facilitada pelo facto desta se encontrar sedeada na mesma região do Hospital Veterinário Canis.

Durante este período de tempo, procedeu-se ao acompanhamento, monitorização e registo de dados de todos os animais envolvidos.

Nesta série de casos a preparação e aplicação do *TruScient*® fez-se sempre de acordo com as instruções do fabricante.

Todas as cirurgias foram realizadas com o mesmo protocolo anestésico, que consistia numa pré-medicação com diazepam (0,1 mg/kg) e metadona (0,3 mg/kg), indução com tiopental e manutenção com uma mistura de oxigénio e isoflurano.

A anti-sepsia das zonas intervencionadas foi feita através de três lavagens com água e sabão líquido à base iodopovidona, seguida de secagem da zona e aplicação de uma solução cutânea de iodopovidona e álcool.

2.1 Critérios de Inclusão

Durante o período de estágio a rhBMP-2 foi aplicada sempre que os cirurgiões, face à complexidade do caso clínico apresentado, determinaram que a sua utilização poderia ser benéfica para a regeneração do tecido ósseo.

3. Resultados

Uma vez que aplicação do medicamento foi feita de forma experimental não existem grupos de controlo. Assim, os resultados serão apresentados sob a forma de casos clínicos individuais.

3.1. Caso nº 1

Um canídeo sem raça definida (SRD), com 5 anos e 29 kg de peso, foi admitido para o tratamento de uma fratura de fémur cominutiva no seguimento de um atropelamento (Figuras 9A e 9B). A cirurgia consistiu em redução aberta através de uma abordagem crânio-lateral à diáfise femoral e em fixação interna com uma placa bloqueada de contacto limitado (*limited contact locking compression plate, LC-LCP*) de 3,5 mm (Figuras 9C e 9D). Decorridos 47 dias de pós-operatório a placa partiu-se e foi realizada nova cirurgia (Figura 9E). Na reintervenção procedeu-se à substituição do implante por uma placa de compressão dinâmica de contacto limitado (*limited contact dynamic compression plate, LC-DCP*), à ostectomia das margens de fratura e à aplicação no foco de fratura de duas esponjas de colagénio absorvíveis impregnadas com rhBMP-2 (Figuras 9F e 9G). Após a realização da segunda intervenção, as radiografias de acompanhamento realizadas aos 21 (Figuras 9H e 9I), 35 (Figuras 9J e 9K) e 56 dias (Figuras 9L e 9M) evidenciaram uma abundante proliferação óssea no foco de fratura, tendo a união óssea sido atingida no último controlo. As radiografias realizadas nos dias 133 e 196 evidenciaram remodelação do calo ósseo e também reabsorção óssea na zona do calo (Figuras 9N e 9O), levando o cirurgião a optar pela remoção da placa ao dia 207 (Figura 9P).

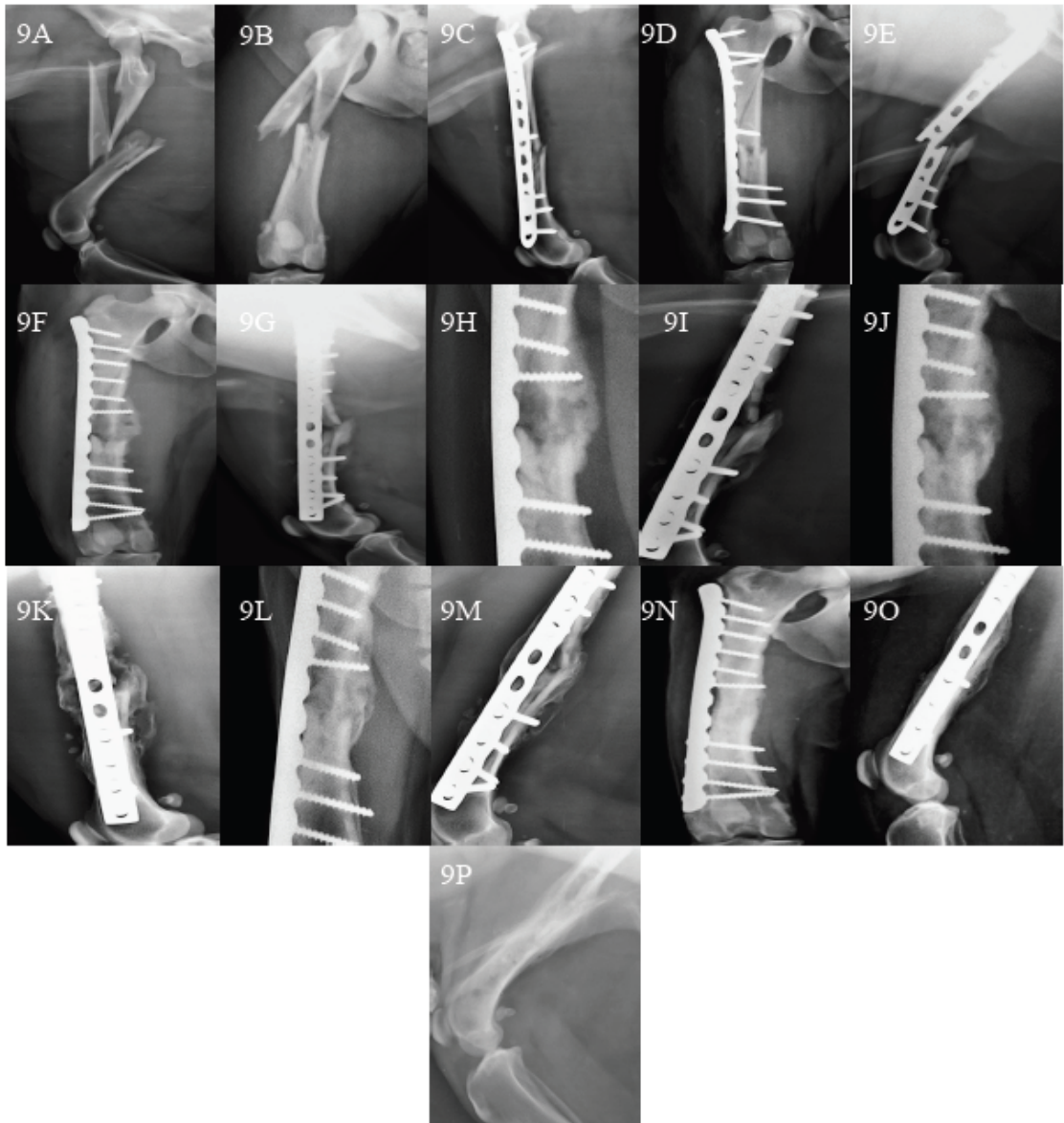


Figura 9: Caso clínico nº 1. **9A:** Fratura cominutiva do fêmur, vista latero-lateral (LL); **9B:** Fratura cominutiva do fêmur, vista antero-posterior (AP); **9C:** Pós-operatório imediato, vista LL; **9D:** Pós-operatório imediato, vista AP; **9E:** Falha do implante, vista LL; **9F:** Cirurgia de revisão com aplicação de rhBMP-2, vista AP; **9G:** Cirurgia de revisão com aplicação de rhBMP-2, vista LL; **9H:** 21 dias de pós-operatório, vista AP; **9I:** 21 dias de pós-operatório, vista LL; **9J:** 35 dias de pós-operatório, vista AP; **9K:** 35 dias de pós-operatório, vista LL; **9L:** 56 dias de pós-operatório, vista AP; **9M:** 56 dias de pós-operatório, vista AP; **9N:** 196 dias de pós-operatório, vista LL; **9O:** 196 dias de pós-operatório, vista LL; **9P:** Remoção da placa aos 207 dias, vista LL.

3.2. Caso nº 2

Um canídeo SRD, com 2 anos e 17 kg de peso, foi admitido para o tratamento de uma fratura oblíqua curta da tíbia no seguimento de um atropelamento (Figuras 10A e 10B). A cirurgia consistiu em redução aberta através de uma abordagem medial à diáfise tibial e em

fixação interna com uma placa LC-LCP de 3,5 mm (Figuras 10C e 10D). Passado 14 dias a placa partiu-se e foi realizada nova cirurgia (Figuras 10E e 10F). Na reintervenção procedeu-se à colocação de um fixador externo de Meynard sem se remover a placa partida e à aplicação no foco de fratura de duas esponjas de colagénio absorvíveis impregnadas com rhBMP-2, através de um acesso cirúrgico limitado (Figuras 10G e 10H). Posteriormente, controlos radiográficos realizados nos dias 31 (Figuras 10I e 10J) e 40 (Figura 10K) evidenciaram progressão do calo ósseo (Figura 17). Ao dia 48 o calo ósseo apresentava uma ponte entre os fragmentos proximal e distal pelo que se procedeu à remoção do fixador externo (Figuras 10L, 10M, 10N e 10O).

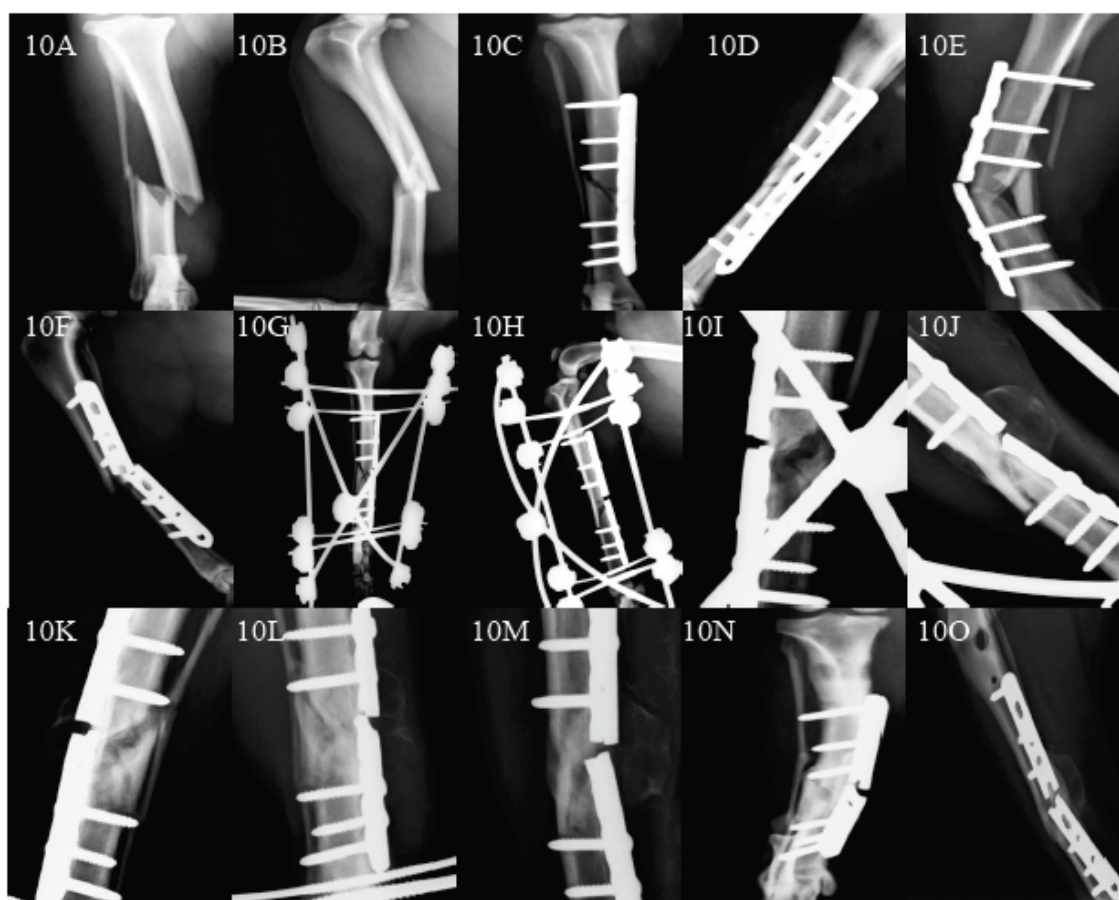


Figura 10: Caso clínico nº 2. **10A:** Fratura oblíqua curta da tíbia, vista AP; **10B:** Fratura oblíqua curta da tíbia, vista LL; **10C:** Pós-operatório imediato, vista AP; **10D:** Pós-operatório imediato, vista oblíqua; **10E:** Falha do implante, vista AP; **10F:** Falha do implante, vista LL; **10G:** Cirurgia de revisão com aplicação de rhBMP-2, vista AP; **10H:** Cirurgia de revisão com aplicação de rhBMP-2, vista oblíqua; **10I:** 31 dias de pós-operatório, vista AP; **10J:** 31 dias de pós-operatório, vista LL; **10K:** 40 dias de pós-operatório, vista AP; **10L:** União óssea aos 48 dias de pós-operatório, vista AP; **10M:** União óssea aos 48 dias de pós-operatório, vista oblíqua; **10N:** União óssea e remoção do fixador externo aos 48 dias de pós-operatório, vista AP; **10O:** União óssea e remoção do fixador externo aos 48 dias de pós-operatório, vista LL.

3.3. Caso n° 3

Um canídeo cruzado de podengo, com 4 anos e 10 kg de peso, foi admitido para o tratamento de uma fratura exposta de rádio e ulna na sequência do ataque de um javali (Figura 11A). A cirurgia consistiu em desbridamento dos tecidos contaminados e desvitalizados, redução aberta da fratura através da ferida, fixação externa linear do rádio e fixação intramedular da ulna (Figuras 11B e 11C). Aos 51 dias do pós-operatório foi diagnosticada uma não união (Figura 11D). A cirurgia de revisão consistiu na extração do pino intramedular da ulna, na revisão do fixador externo do rádio e na aplicação de uma esponja de colagénio absorvível impregnada com rhBMP-2 (Figuras 11E e 11F). Num controlo radiográfico realizado 28 dias após a revisão era visível uma ligeira progressão da cicatrização (Figura 11G) e aos 49 dias o calo ósseo apresentava uma ponte entre os fragmentos proximal e distal, procedendo-se assim à remoção do fixador externo (Figuras 11H e 11I).

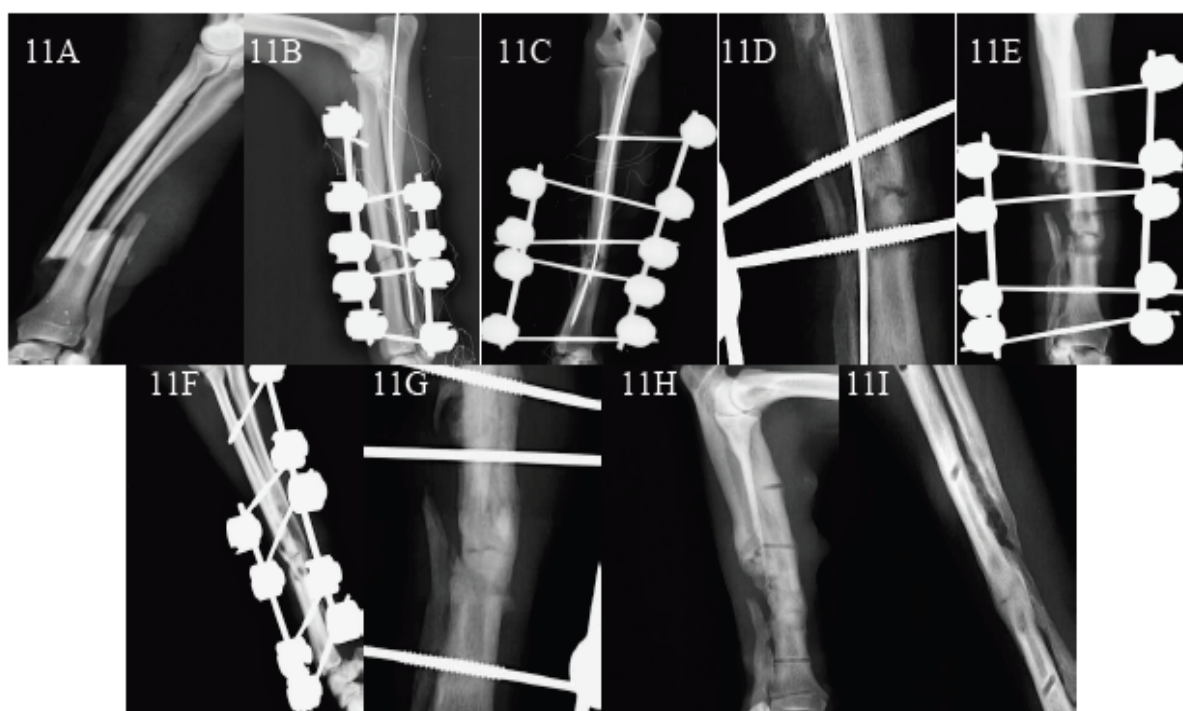


Figura 11: Caso clínico n° 3. **11A:** Fratura de rádio e ulna, vista LL; **11B:** Pós-operatório imediato, vista LL; **11C:** Pós-operatório imediato, vista AP; **11D:** Não união aos 51 dias de pós-operatório; **11E:** Cirurgia de revisão com aplicação de rhBMP-2, vista AP; **11F:** Cirurgia de revisão com aplicação de rhBMP-2, vista LL; **11G:** 28 dias de pós-operatório, vista AP; **11H:** União óssea e remoção do fixador externo aos 49 dias de pós-operatório, vista LL.

3.4. Caso nº 4

Um canídeo SRD, com 4 anos e 12 kg de peso, foi admitido para o tratamento de uma fratura cominutiva do úmero no seguimento de um atropelamento (Figuras 12A e 12B). A cirurgia consistiu em redução aberta da fratura através de uma abordagem crânio-lateral à diáfise umeral, colocação de um pino intramedular e montagem de um fixador externo tipo Ia. O fixador externo foi consolidado com o pino intramedular numa configuração *tie-in* (Figuras 12C e 12D). Após 3 dias, foi realizada uma nova cirurgia que consistiu na realização de um acesso cirúrgico limitado ao foco de fratura para a colocação de duas esponjas de colagénio absorvíveis impregnadas com rhBMP-2. Um controlo radiográfico realizado 38 dias após a colocação da rhBMP-2 mostrou progressão do calo ósseo (Figuras 12E e 12F) que ao dia 73 já fazia ponte entre os fragmentos ósseos, procedendo-se assim à remoção do fixador externo (Figuras 12G, 12H, 12I e 12J).



Figura 12: Caso clínico nº 4. **12A:** Fratura cominutiva do úmero, vista LL; **12B:** Fratura cominutiva do úmero, vista AP; **12C:** Pós-operatório imediato, vista AP; **12D:** Pós-operatório imediato, vista LL; **12E:** 38 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista AP; **12F:** 38 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista LL; **12G:** União óssea aos 73 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista AP; **12H:** União óssea aos 73 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista LL; **12I:** Remoção do fixador externo aos 73 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista LL; **12J:** Remoção do fixador externo aos 73 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista AP.

3.5. Caso n° 5

Um canídeo de raça Golden Retriever, com 5 anos e 31 kg de peso, foi admitido para o tratamento de uma fratura oblíqua longa da tíbia no seguimento de uma *tibial tuberosity advancement* (TTA) realizada 14 dias antes (Figuras 13A, 13B e 13C). No dia da admissão foi colocado um fixador externo linear tipo II em modo fechado para estabilização da fratura (Figuras 13D e 13E). No dia seguinte, o animal foi submetido a nova cirurgia para colocação de duas esponjas de colagénio absorvíveis impregnadas com rhBMP-2 através de um acesso cirúrgico limitado ao foco de fratura. Ainda nesta cirurgia foram removidos os parafusos placa de TTA uma vez que se encontravam soltos. Após a colocação da rhBMP-2, foram feitos controlos radiográficos nos dias 31 (Figura 13F), 43 (Figura 13G) e 57 (Figura 13H), nos quais se observou uma ligeira formação de calo ósseo. A progressão da cicatrização óssea tornou-se evidente ao dia 82 (Figura 13I) e no dia 92 pôde-se observar união dos fragmentos ósseos, altura em que se removeu o fixador externo (Figuras 13J e 13K).

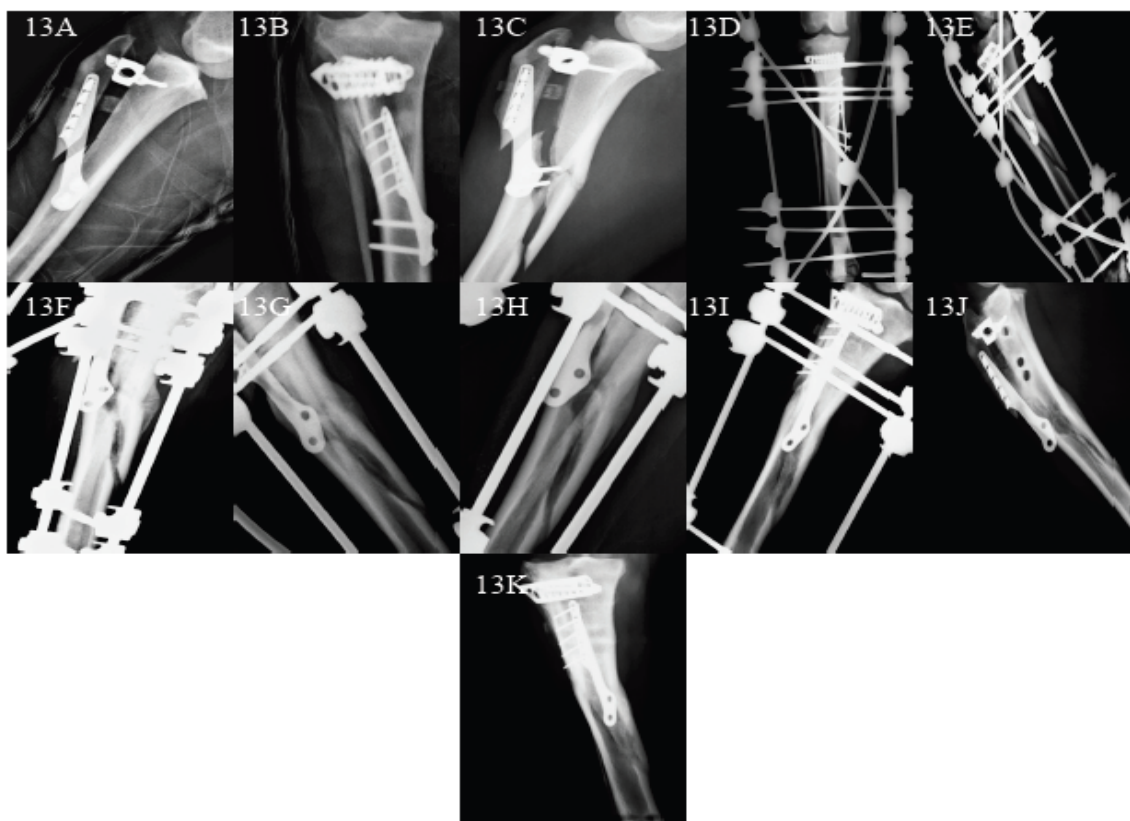


Figura 13: Caso clínico n° 5. **13A:** Pós-operatório imediato, vista LL; **13B:** Pós-operatório imediato, vista AP; **13C:** Fratura oblíqua longa aos 14 dias de pós-operatório; **13D:** Cirurgia de revisão, vista LL; **13E:** Cirurgia de revisão, vista LL; **13F:** 31 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista LL; **13G:** 43 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista LL; **13H:** 57 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista LL; **13I:** 82 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista LL; **13J:** União óssea aos 92 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista AP; **13K:** União óssea aos 92 dias pós-implantação da rhBMP-2, vista LL.

3.6. Caso n° 6

Um canídeo de raça Boxer, com 11 anos e 27 kg de peso, foi admitido para o tratamento de uma rutura de ligamento cruzado cranial. A técnica cirúrgica realizada para a estabilização da articulação do joelho foi a TTA (Figura 14A). No final da intervenção foram colocadas, de forma profilática, duas esponjas de colagénio absorvíveis impregnadas com rhBMP-2. Um controlo radiográfico realizado 53 dias após a cirurgia evidenciou sinais de progressão da ossificação, estando nesta fase o defeito criado pelo avanço da crista tibial parcialmente preenchido por tecido ósseo (Figura 14B). Controlos radiográficos aos dias 109 (Figura 14C) e 124 (Figura 14D) mostraram um preenchimento completo do defeito (Figura 30).

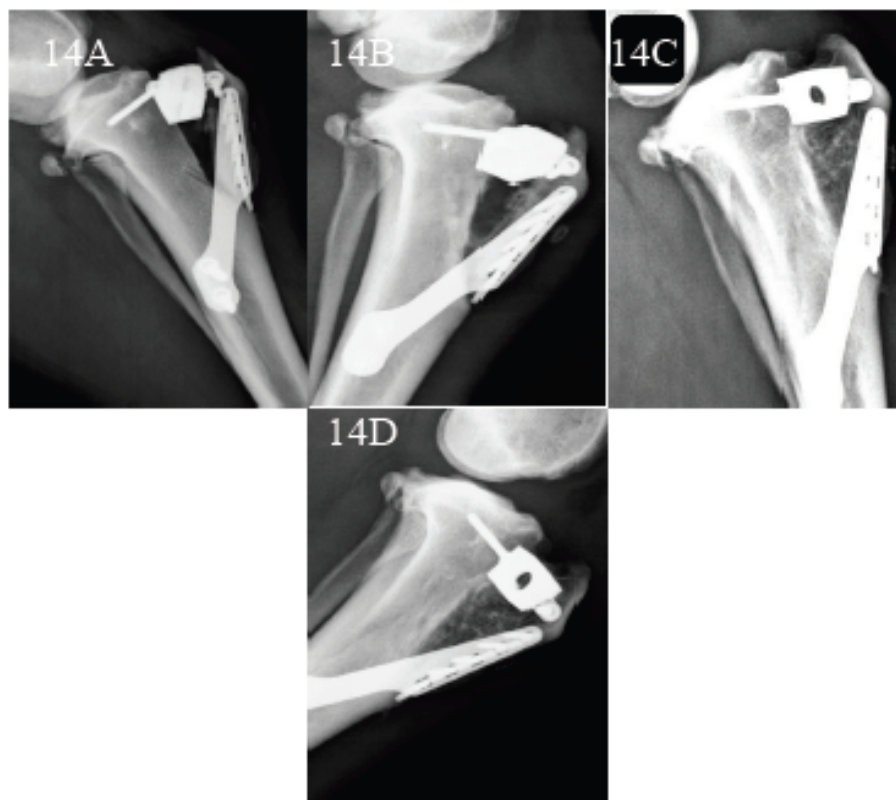


Figura 14: Caso clínico n° 6. **14A:** Pós-operatório imediato, vista LL; **14B:** 53 dias de pós-operatório, vista LL; **14C:** 109 dias de pós-operatório, vista LL; **14D:** 124 dias de pós-operatório, vista LL.

4. Discussão

Nos casos nº 1 e nº 2 foram aplicadas na primeira cirurgia placas LC-LCP. Estas fazem parte de uma nova geração de placas ósseas que exigem uma técnica cirúrgica adaptada e a aquisição de novos conhecimentos em relação aos conceitos comumente utilizados na fixação interna com placas (Gautier & Sommer, 2003). Após a avaliação dos princípios de aplicação das placas LC-LCP na literatura existente (Gautier & Sommer, 2003; Wagner & Frigg, 2006) e discussão com o cirurgião responsável pelo caso, não se tornou clara a falha do implante em ambos os casos.

Todavia, no caso nº 1 existem parafusos do tipo convencional (não bloqueados) que não atravessam completamente as duas corticais ósseas, o que poderá ter contribuído para a destabilização do sistema de fixação. Neste caso, a associação de um pino intramedular à placa LC-LCP ou a utilização de uma placa de 3,5 mm com um perfil mais largo (*3,5mm broad*) poderia eventualmente ter evitado a falha do implante, uma vez que estaríamos a aumentar a rigidez do sistema de fixação à flexão (Chao *et al.*, 2012).

No caso nº 2, a falha do sistema de fixação poderá ter ocorrido devido à ausência de redução anatómica dos fragmentos ósseos. Nesta situação é possível que se tenham gerado deformações reversíveis do implante que a dado momento se tornaram irreversíveis e levaram à sua rutura (Gautier & Sommer, 2003).

Nas situações de falha do sistema de fixação o cirurgião deve, além de planear uma osteosíntese que proporcione estabilidade mecânica, equacionar medidas que melhorem o ambiente de cicatrização da fratura, nomeadamente a remoção do tecido necrótico avascular na tentativa de melhorar o suprimento sanguíneo à região, e a aplicação de enxertos ósseos esponjosos ou fatores de crescimento para estimular a formação óssea (Budsberg, 2005). Neste seguimento de ideias optou-se pela aplicação de BMPs em ambos os casos.

Na cirurgia de revisão do caso nº 1 optou-se pela substituição do implante partido por uma placa LC-DCP. Os dois orifícios dos parafusos deixados vazios estão sobre o foco de fratura, local onde se procedeu à ostectomia das margens de fratura com auxílio de uma goiva a fim de reavivar o tecido ósseo e à aplicação de duas esponjas absorvíveis de colagénio com rhBMP-2.

Nos exames radiográficos de acompanhamento deste caso, realizados nos dias 21, 35 e 65, foi visível uma intensa proliferação óssea na zona de implantação da rhBMP-2. No entanto, ao dia 133 foi detetada reabsorção do osso recém formado subjacente à placa, sendo

a causa mais provável para esta ocorrência uma lesão do suprimento vascular ao osso provocada pelo implante (Perren, 2002; Koch, 2005), não obstante o facto desta placa apresentar um perfil de contato limitado. A placa foi posteriormente removida e não foram reportadas quaisquer complicações desde então.

No caso nº 1 a utilização da rhBMP-2 poderá ter sido benéfica, uma vez que permitiu a cicatrização do defeito ósseo existente no foco de fratura. A regeneração óssea neste caso foi exuberante, facto este que poderá eventualmente estar associado à aplicação da rhBMP-2 no foco de fratura.

Na cirurgia de revisão do caso nº 2 optou-se pela colocação de um fixador externo de Meynard juntamente com a realização de um acesso cirúrgico limitado ao foco de fratura para a implantação de duas esponjas de colagénio com rhBMP-2. A não remoção da placa partida teve por base evitar a realização de um novo acesso cirúrgico extenso, que poderia comprometer ainda mais a vascularização dos tecidos moles e dos fragmentos ósseos com potencial prejuízo para o processo de cicatrização.

Neste caso é possível especular que a rhBMP-2 desempenhou um papel importante na cicatrização óssea pelo facto da configuração do fixador externo ser pouco rígida, uma vez que devido à presença da placa não foi possível colocar cavilhas perto do foco de fratura que iriam conferir a estabilidade ideal a esta configuração de fratura. Segundo Latte (1997a) um fixador que seja composto apenas de duas cavilhas por fragmento e por cavilhas afastadas do foco de fratura é mecanicamente pouco estável.

No caso nº 3 foi diagnosticada uma não união por ausência de atividade osteogénica, após a estabilização de uma fratura exposta de rádio e ulna com um fixador externo e um pino intramedular. Esta não união ocorreu possivelmente devido à extensa lesão dos tecidos moles, que levou eventualmente a uma disrupção do suprimento sanguíneo à zona de fratura, sendo esta uma das causas mais frequentes de não união (Rovesti, 2005; Denny & Butterworth, 2006; Piermattei, Flo & DeCamp, 2006).

A fixação externa está indicada para fraturas abertas (Latte, 1997b; Denny & Butterworth, 2006), pois nestes casos existe um maior risco de infeção devido à potencial contaminação da ferida e à diminuição das defesas imunitárias do hospedeiro decorrentes da presença de material estranho, tecido necrótico desvitalizado e espaço morto (Piermattei, Flo & DeCamp, 2006).

Na cirurgia de revisão, além da remoção do pino intramedular, da remoção das duas

cavilhas mais próximas ao foco de fratura e da sua substituição por duas outras colocadas numa posição mais distante, foi colocada uma esponja de colagénio absorvível com rhBMP-2. Ao fim de 49 dias foi visível a formação de um calo ósseo a fazer a ponte dos dois fragmentos. Neste caso, é possível especular que a rhBMP-2 teve um papel importante na união óssea, uma vez que a cirurgia de revisão não alterou de forma significativa o ambiente mecânico no foco de fratura.

No caso nº 4 estabilizou-se uma fratura cominutiva de úmero mediante um fixador externo de Meynard associado a cavilha intramedular em modo *tie-in*. Dentro do sistema de Meynard são os quadros hemifixantes que apresentam menor rigidez, no entanto a anatomia do úmero torna necessária a sua utilização (Putod, 1997). O facto do úmero apresentar massas musculares volumosas torna também necessária a colocação da barra conectora numa posição mais distante do osso em relação ao que seria ideal, contribuindo assim para a diminuição da rigidez do sistema (Putod, 1997). De modo a compensar estes inconvenientes e, por conseguinte, aumentar a rigidez do fixador, optou-se pela colocação de um pino intramedular solidarizado ao quadro hemifixante. A sua função consiste essencialmente em neutralizar as forças de flexão, enquanto que as forças de tensão, compressão, torção e cizalhamento são bloqueadas pelo fixador (Latte, 1997c). A colocação de 2 quadros hemifixantes solidarizados em “V” poderia ter sido uma forma alternativa de contornar os inconvenientes acima referidos além da adotada (cavilha intramedular *tie-in*) (Latte, 1997d). As cavilhas de rosca positiva foram selecionadas devido ao facto de proporcionarem uma melhor ancoragem óssea comparativamente às lisas (Autefage, 1997b; Piermattei, Flo & DeCamp, 2006).

A decisão de se aplicar a rhBMP-2 nesta situação adveio de vários fatores: o fragmento distal acomodou apenas uma cavilha, o que do ponto de vista mecânico não proporciona a estabilidade ideal (Latte, 1997a; Piermattei, Flo & DeCamp, 2006); o pino intramedular não ficou ancorado no fragmento distal; e a redução dos fragmentos ósseos não foi satisfatória. Assim, foi realizada uma nova cirurgia para a aplicação de duas esponjas de colagénio absorvíveis com rhBMP-2 no foco de fratura. Esta intervenção ocorreu 3 dias após a estabilização da fratura e a união óssea foi atingida 73 dias depois da implantação da rhBMP-2. Neste caso é possível que a rhBMP-2 tenha tido um papel fulcral na cicatrização da fratura dada a existência de vários fatores que poderiam eventualmente levar a uma não-união óssea.

O caso nº 5 refere-se a uma fratura de tíbia após a realização de uma TTA (*tibial tuberosity advancement*). O paciente foi inicialmente admitido no hospital devido a uma rutura do ligamento cruzado cranial, patologia esta que leva a um movimento crânio-caudal anormal e a uma rotação interna excessiva da articulação do joelho, levando por sua vez à progressão da osteoartrite (Lafaver *et al.*, 2007). Perante esta situação, o cirurgião preconizou o tratamento desta patologia através da realização de uma TTA. Esta técnica estabiliza a articulação do joelho durante o apoio do membro ao neutralizar o movimento de gaveta cranial da tíbia em relação ao fémur. Este efeito estabilizador é atingido através da realização de uma osteotomia da crista tibial de modo a avançar o tendão patelar perpendicularmente ao *plateau* tibial (Lafaver *et al.*, 2007).

O animal foi admitido no hospital com claudicação do membro intervencionado 14 dias após a cirurgia, tendo-se detetado ao exame radiográfico uma fratura oblíqua longa da tíbia. A causa da fratura poderá ter sido a concentração de stress na curvatura distal da linha de osteotomia, uma vez que a angulação com que esta foi feita gerou um *stress riser* que pode ter predisposto à fratura (Botte, 2011). Dado que as fraturas oblíquas se produzem devido a uma combinação de cargas de flexão e compressão axial (McGuigan, 2010), é possível especular que estes componentes das forças cíclicas do apoio se tenham concentrado na zona distal da osteotomia e nos parafusos diafisários levando à fratura.

Perante esta situação, e uma vez que não se evidenciaram sinais de instabilidade de gaveta cranial ao exame físico, o cirurgião optou apenas pela colocação um fixador externo de Meynard fechado de modo a evitar a realização de um acesso cirúrgico extenso que contribuísse para a desvascularização da região. Devido ao defeito ósseo relativamente grande que se gerou após a estabilização da fratura, o cirurgião optou no dia seguinte pelo seu preenchimento com duas esponjas de colagénio reabsorvíveis com rhBMP-2, implantadas através de um acesso cirúrgico limitado. Nesta intervenção foram também removidos os parafusos da placa pois encontravam-se soltos.

A cicatrização óssea ocorreu 92 dias após a implantação da rhBMP-2, altura em que se observou um calo ósseo a fazer a ponte dos fragmentos proximal e distal. O animal não apresentou quaisquer sinais de instabilidade de gaveta cranial ao exame físico.

A utilização de rhBMP-2 neste caso poderá ter sido benéfica uma vez que houve cicatrização de um grande defeito ósseo sem complicações adicionais após a sua implantação.

O caso nº 6 refere-se à resolução cirúrgica de uma rutura de ligamento cruzado cranial mediante a realização de uma TTA. O cirurgião, dada a idade do animal e sabendo que o potencial de cicatrização óssea diminui com a idade, optou pela implantação de duas esponjas de colagénio com rhBMP-2 de forma preventiva, uma vez que nesta técnica é criada uma fratura da crista tibial.

O tempo médio de cicatrização do defeito criado por esta intervenção num estudo realizado por Lafaver *et al.* (2007) foi de 9,4 semanas, com um intervalo de cicatrização entre as 4 e as 20 semanas. Num outro estudo realizado por Hoffman *et al.* (2006), foi reportada uma cicatrização parcialmente completa do defeito entre as 7 e 8 semanas e uma cicatrização completa entre as 8 e 10 semanas.

Neste caso clínico aos 53 dias (entre 7 e 8 semanas) era visível um preenchimento parcial do defeito, resultado este que está em consonância com os dos estudos acima mencionados, enquanto que o preenchimento completo do defeito foi detetado aos 109 dias (entre 15 e 16 semanas), estando acima das médias referidas por estes autores. Todavia, neste caso não foram realizadas radiografias entre os dias 59 e 109, não permitindo assim determinar se o preenchimento completo do defeito ocorreu dentro do intervalo reportado nos estudos ou se efetivamente se tratou de uma consolidação tardia

Durante o período de acompanhamento dos casos clínicos não foram registadas complicações pós-cirúrgicas que pudessem eventualmente ser atribuídas em exclusivo à aplicação da rhBMP-2.

A não existência de um grupo de controlo e análise estatística deveu-se ao facto dos casos clínicos serem complexos. Estes casos ao serem pouco frequentes limitaram o tamanho da amostra e também tendem a ser bastante díspares entre si, tornando-os de certa forma incomparáveis devido à existência de diversos factores que podem afetar o potencial de cicatrização óssea e, por conseguinte, enviesar os resultados obtidos. Entre os fatores que influenciam a cicatrização encontram-se: o grau de dano vascular; a localização e conformação anatómica da fratura; o método de estabilização selecionado; e o potencial de cicatrização do próprio animal, que pode ser afetado por fatores como a idade (Denny & Butterworth, 2006). Em relação à localização anatómica da fratura, as zonas metafisárias e epifisárias apresentam maior potencial de cicatrização, uma vez que o osso esponjoso é mais vascularizado e apresenta maior atividade celular comparativamente ao osso cortical. Além disso, fraturas em zonas com maior envelope muscular também apresentam um maior

potencial de cicatrização (Denny & Butterworth, 2006). Todavia, os cirurgiões consideraram que ao ter sido atingida união óssea nestes casos sem nunca terem realizado uma colheita de enxerto ósseo mostra o potencial osteoindutor das BMPs, uma vez que as situações clínicas descritas eram complexas e iriam potencialmente requerer uma abordagem mais exigente para a sua resolução. Os cirurgiões também consideraram que os procedimentos de preparação e implantação da rhBMP-2 eram simples e rápidos, permitindo diminuir significativamente o tempo cirúrgico face à colheita de enxerto ósseo autólogo.

5. Conclusões

Os resultados obtidos foram considerados positivos pelos cirurgiões responsáveis pelos casos clínicos apresentados, uma vez que após a implantação das esponjas de colagénio com a rhBMP-2 foi sempre atingida união óssea.

Futuramente, deveria ser realizado um estudo de forma controlada, imparcial e com uma população abrangente com o objetivo de comparar a eficácia do *TruScient*® frente ao enxerto ósseo autólogo. Desta forma, seria possível saber qual dos métodos proporciona um maior potencial osteoindutor e qual apresenta maiores taxas de complicações.

A utilização de BMPs em ortopedia está ainda numa fase inicial e as evidências existentes sugerem um futuro promissor quanto ao desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas. No entanto, serão necessárias mais investigações de modo a determinar com maior eficácia variáveis como a dose, o sistema de administração, a via de administração e a eventual combinação com outros fatores de crescimento (White *et al.*, 2007), com a finalidade de standardizar e otimizar os tratamentos com BMPs (Schmidmaier *et al.*, 2007). No futuro, a aplicação das BMPs para fins regenerativos a outros tecidos esqueléticos, como a cartilagem, os tendões e os ligamentos (White *et al.*, 2007), e para o tratamento de patologias metabólicas e vasculares, assim como no tratamento do cancro (Kim & Choe, 2011), pode vir a ser uma realidade.

6. Referências Bibliográficas

Al-Aql, Z. S., Alagl, A. S., Graves, D. T., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*, 87(2), 107-118.

Argintar, E., Edwards, S., & Delahay, J. (2011). Bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Injury*, 42(8), 730-734.

Arnault, F., Maitre, P., Cachon, T., Carozzo, C., Fau, D., Genevois, J. P., & Viguier, E. (2011). Treatment of a nonunion, secondary to gunshot fracture, of the distal radius with circular external fixation and rhBMP-2 in a cat. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 24(4), 289-293.

Autefage, A. (1997a). Consolidation osseuse. In: Y. Latte & J. A. Meynard, Manuel de fixation externe: applications au chien et au chat (1^a ed., pp. 90-96). Paris, Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.

Autefage, A. (1997b). Broches de fixation externe. In: Y. Latte & J. A. Meynard, Manuel de fixation externe: applications au chien et au chat (1^a ed., pp. 56). Paris, Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.

Axelrad, T. W., Kakar, S., & Einhorn, T. A. (2007). New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury*, 38 Suppl 1, S49-62.

Bahamonde, M. E., & Lyons K. M. (2001). BMP3: to be or not to be a BMP. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A Suppl 1(Pt 1), S56-62.

Bernard, F., Furneaux, R., Adrega Da Silva, C., & Bardet, J. F. (2008). Treatment with rhBMP-2 of extreme radial bone atrophy secondary to fracture management in an Italian Greyhound. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 21(1), 64-68.

Bessa, P. C., Casal, M., & Reis, R. L. (2008a). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med*, 2(1), 1-13.

Bessa, P. C., Casal, M., & Reis, R. L. (2008b). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med*, 2(2-3), 81-96.

Bishop, G. B., & Einhorn, T. A. (2007). Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop*, 31(6), 721-727.

Boudrieau, R. J., Mitchell, S. L., & Seeherman, H. (2004). Mandibular reconstruction of a partial hemimandibulectomy in a dog with severe malocclusion. *Vet Surg*, 33(2), 119-130.

Bouxsein, M. L., Turek, T. J., Blake, C. A., D'Augusta, D., Li, X., Stevens, M., Seeherman, H. J., *et al.* (2001). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg*, 83(8), 1219-1230.

Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., & Nohe, A. (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*, 23(4), 609-620.

Budsberg, S. C. (2005). Implant failure. In: A. L. Johnson, J. E. F. Houlton & R. Vannini, *AO principles of fracture management in the dog and cat* (1^a ed., pp. 425-428). Estugarda, Georg Thieme Verlag.

Chao, P., Lewis, D. D., Kowaleski, M. P., & Pozzi, A. (2012). Biomechanical concepts applicable to minimally invasive fracture repair in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42(5), 853-872.

Chen, G., Deng, C., & Li, Y. P. (2012). TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*, 8(2), 272-288.

Cho, T. J., Gerstenfeld, L.C., & Einhorn, T. A. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*, 17(3), 513-520.

De Biase, P., & Capanna, R. (2005). Clinical applications of BMPs. *Injury*, 36 Suppl 3, S43-46.

Denny, H. R. & Butterworth, S. J. (2006). *Cirurgia ortopédica em cães e gatos* (4^a ed., pp. 3-13, 103, 119-121). São Paulo, Editora Roca Ltda.

Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425, 577-584.

Edgar, C. M., Chakravarthy, V., Barnes, G., Kakar, S., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2007). Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells. *Bone*, 40(5), 1389-1398.

Ehrlich, M., Horbelt, D., Marom, B., Knaus, P., & Henis, Y. I. (2011). Homomeric and heteromeric complexes among TGF-beta and BMP receptors and their roles in signaling. *Cell Signal*, 23(9), 1424-1432.

Einhorn, T. A., Majeska, R. J., Mohaideen, A., Kagel, E. M., Bouxsein, M. L., Turek, T. J., & Wozney J. M. (2003). A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg Am*, 85(8), 1425-1435.

European Medicines Agency (2011a). EPAR summary for the public. Acedido em 2 Setembro 2013 em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/002000/WC500119825.pdf.

European Medicines Agency (2011b). Annex I: summary of product characteristics. Acedido em 2 Setembro 2013 em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/veterinary/002000/WC500119824.pdf.

Fazzalari, N. L. (2011). Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int*, 22(6), 2003-2006.

Fitch, R., Kerwin, S., Sinibaldi, K. R., & Newman-Gage, H. (1997). Bone autografts and allografts in dogs. *Comp Contin Educ Pract Vet*, 19(5), 558-575.

Gautier, E., & Sommer, C. (2003). Guidelines for the clinical application of the LCP. *Injury*, 34, 63-76.

Gautschi, O. P., Frey, & S. P., Zellweger, R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg*, 77(8), 626-31.

Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury*, 36 Suppl 3, S20-27.

Giannoudis, P. V., Kanakaris, N. K., & Einhorn, T. A. (2007). Interaction of bone morphogenetic proteins with cells of the osteoclast lineage: review of the existing evidence. *Osteoporos Int*, 18(12), 1565-1581.

Griffon, D. J. (2005). Fracture Healing. In: A. L. Johnson, J. E. F. Houlton & R. Vannini, *AO principles of fracture management in the dog and cat* (1^a ed., pp. 73-91). Estugarda, Georg Thieme Verlag.

Groeneveld, E. H. J., & Burger, E. H. (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*, 142(1), 9-21.

Gruskin, E., Doll, B. A., Futrell, F. W., Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (2012). Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Adv Drug Deliv Rev*, 64(12), 1063-1077.

Guo, J., & Wu, G. (2012). The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 23(1-2), 61-67.

Harada, S., & Rodan, G. A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423, 349-355.

Harvard Pilgrim Health Care (2007). Medical policy: recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP) for bone fusion. Acedido em 5 Agosto 2013 em https://www.harvardpilgrim.org/pls/portal/docs/PAGE/PROVIDERS/MEDMGMT/STATEMENTS/RHBMP_FOR_BONE_FUSION_0613B.PDF

Heining, E., Bhushan, R., Paarmann, P., Henis, Y. I., & Knaus, P. (2011). Spatial segregation of BMP/Smad signaling affects osteoblast differentiation in C2C12 cells. *PLoS One*, 6(10), 1-13.

Hino, J., Kangawa, K., Matsuo, H., Nohno, T., & Nishimatsu, S. (2004). Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions. *Front Biosci*, 9, 1520-1529.

Hoffmann, D. E., Miller, J. M., Ober, C. P., Lanz, O. I., Martin, R.A., & Shires, P. K. (2006). Tibial tuberosity advancement in 65 canine stifles. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 19(4), 219-227.

Huang, F., & Chen, Y. G. (2012). Regulation of TGF-beta receptor activity. *Cell Biosci*, 2(9), 1-10.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. (10ª ed., pp. 93, 136-149). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.

Kang, Q., Sun, M. H., Cheng, H., Peng, Y., Montag, A. G., Deyrup, A. T., Jiang, W., *et al.* (2004). Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther*, 2004, 11(17), 1312-1320.

Kim, M., & Choe, S. (2011). BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep*, 44(10), 619-634.

Kirker-Head, C. A. (2000). Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, 43(1), 65-92.

Kloen, P., Di Paola, M., Borens, O., Richmond, J., Perino, G., Helfet, D. L., & Goumans, M. J. (2003). BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone*, 33(3), 362-371.

Koch, D. (2005). Screws and plates. In: A. L. Johnson, J. E. F. Houlton & R. Vannini, *AO principles of fracture management in the dog and cat* (1ª ed., pp. 46). Estugarda, Georg Thieme Verlag.

Kopf, J., Petersen, A., Duda, G. N., & Knaus, P. (2012). BMP2 and mechanical loading cooperatively regulate immediate early signalling events in the BMP pathway. *BMC Biol*, 10(37), 1-12.

Kretschmar, M., & Massagué, J. (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8(1), 103-111.

Botte, R. (2011). TTA pre-op planning guide. Guia apresentado no Kyon workshop on TTA pre-op planning. Kyon

Lafaver, S., Miller, N. A., Stubbs, W. P., Taylor, R. A., & Boudrieau, R. J. (2007). Tibial tuberosity advancement for stabilization of the canine cranial cruciate ligament-deficient stifle joint: surgical technique, early results, and complications in 101 dogs. *Vet Surg*, 36(6), 573-586.

Latte, Y. (1997a). Biomecanique du jam. In: Y. Latte & J. A. Meynard, Manuel de fixation externe: applications au chien et au chat (1^a ed., pp. 244-248). Paris, Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.

Latte, Y. (1997b). Indications generales. In: Y. Latte & J. A. Meynard, Manuel de fixation externe: applications au chien et au chat (1^a ed., pp. 144-145). Paris, Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.

Latte, Y. (1997c). Fixation externe associee a une fixation interne. In: Y. Latte & J. A. Meynard, Manuel de fixation externe: applications au chien et au chat (1^a ed., pp. 212). Paris, Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.

Latte, Y. (1997d). Bases mecaniques des fixateurs externes. In: Y. Latte & J. A. Meynard, Manuel de fixation externe: applications au chien et au chat (1^a ed., pp. 46). Paris, Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.

Lauzon, M. A., Bergeron, E., Marcos, B., & Fauchoux, N. (2012). Bone repair: new developments in growth factor delivery systems and their mathematical modeling. *J Control Release*, 162(3), 502-520.

Lee, F. Y., Storer, S., Hazan, E. J., Gebhardt, M. C., & Mankin, H. J. (2002). Repair of bone allograft fracture using bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res*, 397, 119-126.

Liebich, H.-G & König, H. E. (2002). Volume 1. Aparelho locomotor. In: H. E. König & H.-G. Liebich, *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido* (1^a ed., pp. 5-9). Porto Alegre, Artmed Editora S.A.

Lissenberg-Thunnissen, S. N., de Gorter, D. J., Sier, C. F., & Schipper, I. B. (2011). Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop*, 35(9), 1271-1280.

Luppen, C. A., Blake, C. A., Ammirati, K. M., Stevens, M. L., Seeherman, H. J., Wozney, J. M., & Bouxsein, M. L. (2002). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances osteotomy healing in glucocorticoid-treated rabbits. *J Bone Miner Res*, 17(2), 301-310.

Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67, 753-791.

Massagué, J., & Gomis, R. R. (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*, 580(12), 2811-2820.

McGuigan, F. X. (2010). Skeletal Trauma. In: S. W. Wiesel & J. N. Delahay, *Essentials of Orthopedic Surgery* (4^a ed., pp. 38). New York, Springer Science+Business Media.

McKay, W. F., Peckham, S. M., & Badura, J. M. (2007). A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop*, 31(6), 729-734.

Meyer, U. & Wiesmann, H. P. (2006). *Bone and cartilage engineering*. (1^a ed., pp. 65-72). Berlin, Springer-Verlag.

Milovancev, M., Muir, P., Manley, P. A., Seeherman, H. J., & Schaefer, S. (2007). Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in 4 dogs. *Vet Surg*, 36(2), 132-140.

Miyazono, K. (1999). Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone*, 25(1), 91-93.

Miyazono, K., Kamiya, Y., & Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*, 147(1), 35-51.

Miyazono, K., Maeda, S., & Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(3), 251-263.

Moghaddam, A., Elleser, C., Biglari, B., Wentzensen, A., & Zimmermann, G. (2010). Clinical application of BMP 7 in long bone non-unions. *Arch Orthop Trauma Surg*, 130(1), 71-6.

Nauth, A., Ristevski, B., Li, R., & Schemitsch, E. H. (2011). Growth factors and bone regeneration: how much bone can we expect?. *Injury*, 42(6), 574-579.

Nishimura, R., Hata, K., Matsubara, T., Wakabayashi, M., & Yoneda, T. (2012). Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J Biochem*, 151(3), 247-254.

Nohe, A. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*, 16(3), 291-299.

Osada, M., Inoue, O., Ding, G., Shirai, T., Ichise, H., Hirayama, K., Takano, K., *et al.* (2012). Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J Biol Chem*, 287(26), 22241-22252.

Perren, S. M. (2002). Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *J Bone Joint Surg Br*, 84(8), 1093-1110.

Phillips, A. M. (2005). Overview of the fracture healing cascade. *Injury*, 36 Suppl 3, S5-7.

Piermattei, D. L., Flo, G. L. & DeCamp, C. E. (2006). Brinker, Piermattei, and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair. (4^a ed., pp. 70, 76, 145, 168). St. Louis, Saunders Elsevier.

Putod, J.-M. (1997). Anatomie appliquee. In: Y. Latte & J. A. Meynard, Manuel de fixation externe: applications au chien et au chat (1^a ed., pp. 82-86). Paris, Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.

Reddi, A. H. (1998). Cartilage-derived morphogenetic proteins and cartilage morphogenesis. *Microsc Res Tech*, 43(2), 131-136.

Reddi, A. H. (2001). Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A Suppl 1(Pt 1), S1-6.

Reddi, A. H. (2003). Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homoeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis*, 62(Suppl 2), 73-78.

Reddi, A. H. (2005). BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(3), 249-250.

Rengachary, S. S. (2002). Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*, 13(6), 1-6.

Rocheffort, G. Y., Pallu, S., & Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int*, 21(9), 1457-1469.

Rosen, V. (2006). BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann N Y Acad Sci*, 1068, 19-25.

Rovesti, G. L. (2005). Nonunions. In: A. L. Johnson, J. E. F. Houlton & R. Vannini, *AO principles of fracture management in the dog and cat* (1^a ed., pp. 403). Estugarda, Georg Thieme Verlag.

Sakou, T. (1998). Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone*, 22(6), 591-603.

Sampath, T. K., & Reddi, A. H. (1981). Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7599-7603.

Schmidmaier, G., Schwabe, P., Strobel, C., & Wildemann, B. (2008). Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury*, 39, S37-S43.

Schmidmaier, G., Schwabe, P., Wildemann, B., & Haas, N. P. (2007). Use of bone morphogenetic proteins for treatment of non-unions and future perspectives. *Injury*, 38, S35-S41.

Schmitt, J. M., Hwang, K., Winn, S. R., & Hollinger, J. O. (1999). Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res*, 17(2), 269-278.

Schmoekel, H. G., Weber, F. E., Hurter, K., Schense, J. C., Seiler, G., Ryrz, U., Spreng, D., *et al.* (2005). Enhancement of bone healing using non-glycosylated rhBMP-2 released from a fibrin matrix in dogs and cats. *J Small Anim Pract*, 46(1), 17-21.

Schmoekel, H. G., Weber, F. E., Seiler, G., von Rechenberg, B., Schense, J. C., Schawalder, P., & Hubbell, J. (2004). Treatment of nonunions with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered from a fibrin matrix. *Vet Surg*, 33(2), 112-118.

Seeherman, H., Li, R., Bouxsein, M., Kim, H., Li, X. J., Smith-Adaline, E. A., Aiolova, M., *et al.* (2006). rhBMP-2/calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. *J Bone Joint Surg Am*, 88(1), 144-160.

Senn, N. (1889). Senn on the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Ann Surg*, 10(5), 352–368.

Sfeir, C., Ho, L., Doll, B. A., Azari, K., & Hollinger, J. O. (2005). Fracture repair. In: J. R. Lieberman & G. E. Friedlaender, *Bone regeneration and repair: biology and clinical applications* (1^a ed., pp. 21-32). Totowa, Humana Press Inc.

Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., & Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20(5-6), 343-355.

Solheim, E. (1998). Growth factors in bone. *Int Orthop*, 22(6), 410-416.

Spector, D. I., Keating, J. H., & Boudrieau, R. J. (2007). Immediate mandibular reconstruction of a 5 cm defect using rhBMP-2 after partial mandibulectomy in a dog. *Vet Surg*, 36(8), 752-759.

Ten Dijke, P., Miyazono, K., & Heldin, C. H. (1996). Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 8(2),139-145.

Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B. D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T., *et al.* (2006). BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet*, 38(12), 1424-1429.

Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(3698), 893-899.

Urist, M. R., & Strates, B. S. (1971). Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, 50(6), 1392-1406.

Virk, M. S., & Lieberman, J. R. (2012). Biologic adjuvants for fracture healing. *Arthritis Res Ther*, 14(5), 225.

Wagner, M. & Frigg, R. (2006). AO Manual of Fracture Management. Internal Fixators: Concepts and Cases Using LCP and LISS. (1^a ed., pp. 125-142). Estugarda, Georg Thieme Verlag.

Weisbrode, S. E. (2007). Bones and joints. In: M. D. McGavin & J. F. Zachary, Pathologic basis of veterinary disease (4^a ed., pp. 1041-1051). St. Louis, Mosby Elsevier.

Welch, R. D., Jones, A. L., Bucholz, R. W., Reinert, C. M., Tjia, J. S., Pierce, W. A., Wozney, J. M., *et al.* (1998). Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res*, 13(9), 1483-1490.

Westerhuis, R. J., van Bezooijen, R. L., & Kloen, P. (2005). Use of bone morphogenetic proteins in traumatology. *Injury*, 36(12), 1405-1412.

White, A. P., Vaccaro, A. R., Hall, J. A., Whang, P. G., Friel, B. C., & McKee, M. D. (2007). Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *Int Orthop*, 31(6), 735-741.

Wu, X., Shi, W., & Cao, X. (2007). Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*, 1116, 29-49.

Xiao, Y. T., Xiang, L. X., & Shao, J. Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(3), 550-553.

Zeng, S., Chen, J., & Shen, H. (2010). Controlling of bone morphogenetic protein signaling. *Cell Signal*, 22(6), 888-893.