'Substitutos ósseos- Conceitos gerais e estado actual'

Arquivos de Medicina (2006), Vol 19(4): 153-162

M. Gutierres, M.A. Lopes, N. Sooraj Hussain, A.T.Cabral, L. Almeida, J.D. Santos

REVISÃO

ISSN 0871-3413 • ©*ArquiMed*, 2006

Substitutos Ósseos

Conceitos Gerais e Estado Actual

Manuel Gutierres*, Maria Ascensão Lopes†‡, Nandyala Sooraj Hussain†‡, Abel Trigo Cabral*, Luís Almeida*, José Domingos Santos†‡

**Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; † Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto; ‡Instituto de Engenharia Biomédica, Porto*

Os substitutos ósseos são actualmente objecto de intensa investigação a nível mundial, com vista a ultrapassar as limitações decorrentes da colheita de enxerto ou do recurso a bancos de osso, para preencher defeitos ósseos. Além disso, a utilização de substâncias com capacidade osteogénica abre novas perspectivas no tratamento de fracturas, pseudartroses e nas artrodeses vertebrais.

Dada a grande quantidade de informação existente sobre esta matéria, este artigo pretende não só rever conceitos gerais como também sumarizar o que de mais recente foi publicado na área da aplicação de substitutos ósseos para regeneração óssea.

Palavras-chave: Enxerto ósseo, substituto ósseo, biomaterial, hidroxiapatite, factores de crescimento

ARQUIVOS DE MEDICINA, 19(4): 153-162

BIOMATERIAIS: UM CONCEITO INOVADOR...

A aplicação de biomateriais remonta à pré-história, como o indicia a descoberta de crâneos com trepanações nas quais foram utilizadas placas de ouro e prata (1). Estão também descritas, há milhares de anos, a aplicação de implantes dentários e a utilização de fios de sutura. Mais recentemente, a sua divulgação sofreu um forte impulso com o aparecimento de lentes intraoculares, próteses articulares, implantes mamários, próteses valvulares e vasculares (2).

No entanto, a palavra "biomaterial" como a aplicamos actualmente, só há poucos anos foi introduzida na nomenclatura médica.

Na conferência de Chester, em 1991, definiu-se como um "material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, orgão ou função do organismo" (3).

Ao ser aplicado, deve manter as suas propriedades e características estruturais, mas simultaneamente substituir a função para a qual foi criado.

É também importante que permita uma boa adesão celular à sua superfície, tenha uma resistência mecânica adequada, não tenha características oncogénicas, seja hemostático, esterilizável e, por fim, que a sua produção em grandes quantidades seja fácil e com custos aceitáveis.

A IMPORTÂNCIA DOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS

Tem sido notável o desenvolvimento dos Biomateriais utilizados em cirurgia ortopédica, traumatológica e maxilo-facial, particularmente dos substitutos ósseos. Estes podem ser definidos como "todo o material de origem humana, animal, vegetal ou sintético, destinado à implantação no homem com a perspectiva de uma reconstituição do capital ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda de substância óssea de origem traumática ou ortopédica" (4).

No âmbito da Década do Osso e da Articulação 2000-2010 aumentou significativamente o esforço de investigação a este nível, tendo sido criadas equipas multidisciplinares com a finalidade de ultrapassar as complicações e limitações decorrentes da colheita de enxerto ósseo autólogo (5).

A utilização de aloenxertos apresenta sempre o risco potencial de transmissão de doenças infecciosas (6). Além disso, nem sempre existe disponibilidade ou acessibilidade fácil para recorrer aos bancos de osso existentes, que se debatem habitualmente com problemas ao nível do insuficiente volume de colheitas.

Anualmente, a nível mundial, são efectuadas mais de 2 milhões de cirurgias ortopédicas nas quais se colhe autoenxerto (7). Efectivamente, este é o que apresenta as melhores características de osteogénese, osteoindução e osteocondução (8). É difícil concentrar estas três propriedades num material sintético, mas é possível adicionar a uma matriz osteocondutora (cerâmicos como a hidroxiapatite ou o fosfato tricálcico), agentes bioactivos (como aspirado de medula e BMP's) que lhe forneçam as duas características restantes para substituírem com sucesso os auto e aloenxertos.

A aplicação de terapia genética continua também a ser uma porta aberta de um universo de soluções para o problema da reparação dos defeitos ósseos (9).

RESPOSTA BIOLÓGICA AOS BIOMATERIAIS

O êxito da aplicação de um material no organismo, depende essencialmente de dois factores:

- a sua biofuncionalidade a qual está directamente relacionada com a capacidade do biomaterial desempenhar uma determinada função (ou parte desta) do organismo.
- a sua biocompatibilidade que se baseia na análise das reações ocorridas na superfície do implante, não só aquando da sua implantação, mas também ao longo do tempo, quando este sofre um processo de degradação e desgaste (10).

Assim, em termos de resposta biológica, após implantação de um biomaterial ocorre a formação de um hematoma, com uma resposta de tipo inflamatória com chamada de água e glicoproteínas, que revestem e aderem ao implante.

Por quimiotactismo, numerosas células são recrutadas para o local, nomeadamente neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos (reacção de corpo estranho). Estas últimas além da sua actividade fagocítica, estimulam a acção dos linfócitos, fibroblastos, osteoclastos e células polimorfonucleares.

Seguidamente, inicia-se a angiogénese, com a migração e proliferação de células endoteliais que vão formar um rede de capilares que constituirá o suporte vascular da zona (11). Por fim, devido à acção de citoquinas (IL-1 e IL-2) e de diversos factores de crescimento (TGF-β, PDGF, IGF, BMP´s) vai ocorrer um processo de diferenciação das células mesenquimatosas pluripotenciais com a formação de matriz óssea e de osso imaturo.

A maturação e remodelação que encerram este processo, salientam a semelhança que existe com a fisiologia da formação do calo ósseo, subsequente a uma fractura (12).

AS CLASSES DE BIOMATERIAIS

De uma forma geral, os Biomateriais podem classificar-se segundo duas vertentes: a sua composição química e o seu comportamento biológico.

A primeira subdivide os biomateriais em 4 classes:

a) metais e ligas metálicas
b) cerâmicos
c) polímeros
d) compósitos

A classificação segundo o comportamento biológico é baseada na resposta do tecido hospedeiro (13):

1. Bioinertes - são aqueles que não provocam reacção de corpo estranho no organismo, encontrando-se em ligação directa ao tecido receptor. Exemplos: titânio, zircónia e alumina.
2. Biotolerados - são moderadamente aceites pelo tecido receptor, sendo geralmente envolvidos por uma cápsula fibrosa. Exemplos: aço inoxidável, ligas de crómio-cobalto e o polimetilmetacrilato (PMMA).
3. Bioactivos - nestes existe a formação de uma ligação directa aos tecidos vivos, pois geralmente têm, na sua composição, iões de cálcio e/ou fósforo (no caso dos substitutos ósseos) que vão estabelecer uma ponte química com o osso envolvente. Exemplos: hidroxiapatite, vidros bioactivos.
4. Reabsorvíveis - aqueles que são lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos tecidos onde são implantados. Exemplos: fosfato tricálcico, vidros bioactivos.

Para o sucesso clínico do substituto é necessário que a uma boa osteointegração, esteja associada a resistência mecânica necessária para o desempenho de funções de suporte. No sentido de potenciar as suas propriedades mecânicas e físico-químicas, podem combinar-se diferentes tipos de materiais que se complementam entre si. Por esta razão, muitos ortopedistas utilizam actualmente materiais compósitos para reconstrução óssea (14), cujas propriedades são superiores às que resultariam da simples adição dos seus componentes.

Alguns princípios fundamentais da engenharia de tecidos devem também ser respeitados (15). Por exemplo, para ocorrer regeneração tecidular é necessária a presença de células capazes de formar novo tecido ósseo (osteogénese); estas consigam aderir, crescer e atravessar todo o material (osteocondução) e estejam presentes factores que estimulem a sua diferenciação fenotípica em osteoblastos (osteoindução).

Dado o facto de esta revisão pretender ter um carácter primordialmente clínico, serão estas propriedades essenciais que vão ser utilizadas na esquematização e apresentação dos Biomateriais que passamos a descrever.

MATERIAIS OSTEOGÉNICOS

Neste grupo incluem-se todos aqueles biomateriais que contém células vivas com capacidade para se diferenciarem em tecido ósseo. Estas encontram-se não só na medula óssea, mas também no periósteo e nos tecidos moles peritrabeculares, pois derivam de células estaminais indiferenciadas do tecido connectivo (15).

1. Osso esponjoso autólogo

É colhido do próprio individuo (geralmente do íliaco ou tíbia próximal) pelo que não apresenta riscos de rejeição ou transmissão de doenças.

Além de uma matriz osteocondutora de minerais, cartilagem e proteínas, inclui também proteínas osteoindutoras além das células osteogénicas. Destas três características resulta o sucesso da sua implantação, nomeadamente para obter fusões ao nível da coluna vertebral, como o atesta a numerosa bibliografia publicada a esse respeito (16-18).

Embora neste tipo de enxerto, não se levantem

problemas de rejeição ou de transmissão de doenças, a morbilidade relacionada com a sua colheita pode, segundo alguns autores (5,19, 20), estár próxima dos 10%. As complicações mais frequentes são a formação de hérnias, as perdas hemáticas, as lesões nervosas, os hematomas e a infecção pós-operatória, além da possibilidade de sofrer de dor crónica no local da colheita.

O tempo operatório, factor importante na rentabilidade do bloco operatório, aumenta inevitavelmente, por ser necessária uma 2ª cirurgia.

Por fim a qualidade (diminuída com a osteoporose) e quantidade do "stock " ósseo podem ser insuficientes para o caso a tratar, levando, por exemplo, à não fusão de uma artrodese vertebral extensa (21,22).

2. Aspirado de medula óssea

Habitualmente é colhido por punção da crista ilíaca e centrifugado de forma a concentrar as células estaminais (stem cells) , que existem na medula na proporção de 1 por 50000 células nucleadas (23), aumentando assim a sua eficácia. Foi inicialmente utilizado no tratamento de atrasos de consolidação, através da sua injecção no foco de fractura (24).

Devido à sua capacidade osteogénica, a sua utilização tem-se alargado a outras indicações, nomeadamente no tratamento de quistos ósseos.

A fibrina que também a integra, forma uma matriz biológica degradável, mas a falta de uma matriz inorgânica limita as suas aplicações.

3. Osso cortical autólogo

Tem características de resistência mecânica que permitem suportar carga imediata, pelo que tem algumas aplicações clínicas particulares, nomeadamente na coluna vertebral (16).

No entanto, biologicamente as suas qualidades são inferiores às do osso esponjoso, por múltiplas razões: a sua revascularização é demorada pois a sua porosidade é reduzida; contém menos progenitores osteoblásticos e células hematopoiéticas; a sua remodelação é também lenta pois a reabsorção, que habitualmente precede a fase de osteogénese de novo osso, também o é (15). Estas desvantagens associadas à morbilidade da colheita, habitualmente não justificam a sua utilização em detrimento do aloenxerto de osso cortical.

4. Osso autólogo vascularizado

Este tipo de enxertos é colhido com o seu pedículo vascular, a fim de ser reanastomosado na zona onde este vai ser aplicado. Obriga, por isso, ao recurso a microcirúrgia, pelo que a sua generalização enfrenta problemas de ordem técnica (treino médico, tempo de cirurgia) e de maior morbilidade na zona dadora (peróneo, costela e ilíaco) (16).

Dado que o suprimento vascular práticamente não é interrompido, a viabilidade das células ósseas é muito maior, a necrose do enxerto é quase nula e daí a sua rápida incorporação.

A sua utilização reserva-se geralmente para defeitos ósseos com extensão superior a 12cm, ou zonas previamente irradiadas ou a ser submetidas a quimioterapia pós-operatória.

MATERIAIS OSTEOCONDUTORES

1. Materiais Cerâmicos

A grande variedade de materiais que pertence a esta classe é composto entre os elementos metálicos e não-metálicos, de origem natural ou sintética (25). É possível produzir materiais cerâmicos sintéticos com uma composição semelhante à matriz óssea inorgânica. Estes materiais não têm limitações em termos de quantidade disponível, nem requerem qualquer procedimento cirúrgico adicional.

Como desvantagens à sua utilização generalizada no ser humano salientam-se a sua inexistente actividade osteogénica ou osteoindutiva e o seu fraco desempenho mecânico, em situações de tracção, para servirem de estrutura de suporte dada as inerentes fragilidade e a elevada rigidez destes materiais (25,26).

a) Sulfato de cálcio

Vulgarmente denominado como gesso ("plaster of Paris"), utilizado para efectuar imobilizações em ortopedia, já existem descrições da sua aplicação datadas de 1892 (27), no preenchimento de cavidades secundárias a osteomielite tuberculosa.

Mais recentemente encontram-se na literatura, referências à sua utilização, em Otorrinolaringologia, como implante de reconstrução pós mastoidectomia radical (28), ou em Ortopedia para o tratamento de quistos ósseos essenciais (29).

b) Vidros

Larry Hench (30,31) foi o pioneiro da utilização de vidros bioactivos para fins biomédicos. A principal característica dos vidros bioactivos é a sua capacidade para promover uma rápida e durável ligação química, através de uma interface apatítica, com o tecido ósseo (32,33).

O método de produção tradicional de um vidro, por tratamento térmico de fusão seguido de arrefecimento até à solidificação sem que haja cristalização, tem-se revelado limitativo para determinadas gamas de composições químicas, pelo que a preparação por via sol-gel tem vindo a ser introduzida. A constituição dos vidros é essencialmente à base de sílica (vidros silicatados) ou de fósforo (vidros fosfatados), consoante o formador de vidro usado. Estes últimos são mais

fácilmente fundidos e quimicamente mais instáveis que os silicatados. A importância dos grupos fosfatos (PO_4^{3-}) associados ao cálcio (Ca^{2+}) na formação do tecido ósseo, é de salientar.

A capacidade de um vidro se ligar ao tecido ósseo, sofrer biodegradação e formar uma camada de apatite superficial, varia em função da sua composição e relação dos seus constituintes. Por exemplo, no caso dos vidros silicatados, um alto conteúdo em Na_2O e CaO, levam a que estes sejam muito reactivos quando colocados em meio aquoso (13).

O diagrama de Hench ilustra, para vidros silicatados, este conceito de comportamento biológico em função da composição química (Fig. I).

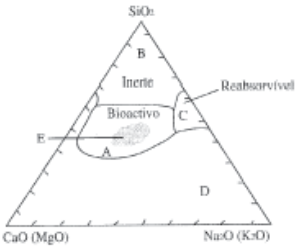

Fig.1 - Diagrama de Hench.

Os biovidros da zona:
- A - estabelecem uma união com o osso
- B - são inertes
- C - são reabsorvíveis
- D - não tem interesse biomédico
- E - ligam-se quer aos tecidos ósseos quer aos tecidos moles

Na utilização de vidros silicatados como biomateriais, o tamanho das partículas é um factor importante estudar, para prevenir a sua migração através do sistema linfático. Sabe-se agora que a utilização clínica de biovidros, cujo tamanho oscila entre 90-710µm de diâmetro, não origina os problemas de migração que ocorrem com partículas menores (34, 35). Dado que os osteoblastos necessitam de sílica, cálcio e fósforo para a produção de osso, as partículas habitualmente são incorporadas neste processo.

Em termos de aplicação clínica, o vidro silicatado mais utilizado é o Bioglass® 45S5 (36), que está demonstrado conduzir à formação mais rápida de osso do que a hidroxiapatite (HA) (37, 38). No entanto, a baixa resistência mecânica não permite a sua aplicação em zonas de carga.

Assim vidros cerâmicos bioactivos (obtidos por cristalização controlada de vidros) foram desenvolvidos por Kokubo de forma a, mantendo as propriedades de osteocondução do Bioglass® 45S5, melhorar a sua resistência, permitindo a sua utilização mais alargada (39). Outros vidros cerâmicos foram desenvolvidos por Vogel (40), os quais possuem a grande vantagem de serem maquináveis devido à presença de cristais curvos do tipo mica (flogopite) na respectiva microestrutura (41). O desenvolvimento de vidros fosfatados, em que o óxido formador de vidro é o P_2O_5 em vez de SiO_2, foi iniciado por Bumie (42). Como consequência da estrutura tridimensional destes vidros, estes são usualmente mais solúveis que os anteriores.

c) Materiais Cerâmicos à base de fosfato de cálcio

Fosfato tricálcico (TCP)

Existe sob duas formas alotrópicas α e β. Possui a fórmula química $Ca_3(PO_4)_2$ (relação molar Ca/P=1,5) contendo cerca de 39% de cálcio e 20% de fósforo (43). É considerado um cerâmico de rápida reabsorção (15, 44). O seu mecanismo de acção depende, pois da alta concentração de cálcio e fósforo à superfície que melhora a sua osteointegração, iniciando a biomineralização, estimulando os osteoclastos e influenciando a diferenciação fenotípica das células osteogénicas. Sob a forma de pasta de pó, são menos eficazes por falta da porosidade necessária ao crescimento ósseo.

Associando, no entanto, produtos como o naftaleno ou o amido, é possível obter poros com 100 a 300 microns, permitindo uma mais rápida osteointegração (45).

A forma granular é a mais eficiente das três (granular, macroporosa e em gel), porque os espaços entre os grânulos aumentam a porosidade da matriz e também a sua superfície de contacto.

As principais desvantagens do TCP, comparativamente com a Hidroxiapatite, prendem-se com a sua falta de suporte estrutural provocada pela sua demasiado rápida reabsorção, em função da sua macroporosidade. Devido a esta fragilidade estrutural, quando utilizado sob a forma de cunhas de adição interna em osteotomias de valgização tibial, alguns autores sugerem a utilização de uma osteossíntese estável para evitar perdas de correcção (46-48).

Hidroxiapatite (HA)

Há uma grande semelhança entre a hidroxiapatite natural e a sintetizada em laboratório, no que diz respeito à sua composição química e comportamento in vivo pelo que a sua aplicação se generalizou não só na reparação óssea, no preenchimento de cavidades pós exérese de tumores (49) e osteotomias de valgização tibial (50), como também no revestimento de próteses dentárias e ortopédicas (51).

A hidroxiapatite é um fosfato de cálcio cuja composição

é $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (relação molar Ca/P=1,67) pelo que apresenta, ao contrário do TCP, muito lenta reabsorção e remodelação óssea, o que leva a que se mantenha no organismo durante anos (52).

Apresenta uma estrutura favorável à invasão vascular, mas a lentidão de reabsorção e integração assim como a dificuldade em manter os grânulos no local do defeito ósseo, levou à necessidade de criar compósitos e pastas com características de biofuncionalidade superiores às dos seus constituintes individualmente.

Biocompósitos à base de fosfato de cálcio

Os fosfatos de cálcio bifásicos, são compósitos de Hidroxiapatite e TCP. São utilizados geralmente na proporção de dois terços para um terço, com porosidade de 40 até 60%, favorecendo a velocidade e qualidade da osteointegração, a sua reabsorção, mas mantendo uma resistência à compressão que se aproxima, em alguns produtos, dos 10 MPa (44).

Os autores deste artigo desenvolveram um compósito sintético, recentemente registado como Bonelike®, a partir de hidroxiapatite reforçada com um vidro de modo a introduzir iões importantes na fisiologia do tecido ósseo (53, 54). Este material, constituido por uma matriz de hidroxiapatite e fases α e β-TCP dispersas na sua microestrutura, tem uma composição semelhante à parte inorgânica do tecido ósseo. O desenvolvimento deste material teve como objectivo obter um biomaterial com melhor bioactividade (55) e propriedades mecânicas (56) do que os materiais actualmente disponíveis comercialmente.

Estão em curso diversos trabalhos científicos, envolvendo o Serviço de Ortopedia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e diversas entidades de I&D nacionais e estrangeiras, para analisar o seu comportamento biológico quer *in vitro* (57) quer *in vivo* (58) não só com animais, como também, desde há 10 anos para cá, com células humanas (59-61) e com doentes (62) nos últimos 3 anos, nos quais este compósito tem sido aplicado. Os resultados têm sido bastante superiores em relação à HA convencional, em termos da avaliação da sua capacidade de formação de um novo tecido ósseo.

Cimentos de cerâmica injectáveis

Recentemente, novos substitutos sintéticos de fosfato dicálcico-tricálcico foram desenvolvidos (63), de forma a poderem ser aplicados na forma líquida e, ao serem aquecidos à temperatura corporal, sofrerem um processo de endurecimento através de uma reacção endotérmica.

São usados com sucesso no tratamento das fracturas distais do rádio, com o objectivo de prevenir o colapso nos doentes com osteoporose (64).

2. Colagénio

Trata-se da proteína mais abundante da matriz óssea extracelular. É considerado um bom veículo de transporte para outros enxertos sintéticos, assim como BMP´s e células osteogénicas, porque a sua estrutura é considerada um meio adequado para a regeneração óssea (45, 65).

A sua resistência estrutural é mínima e possui o risco potencial de imunogenicidade.

Estudos efectuados têm no entanto atingido resultados controversos. Por exemplo, em modelos caninos verificou-se que a adição de autoenxerto a um compósito de um cerâmico e colagéneo é biologicamente inferior do que a utilização isolada de um volume menor de autoenxerto, na obtenção de fusões vertebrais (66).

Por outro lado, um estudo prospectivo randomizado efectuado com compósito colagéneo-TCP vs medula óssea no tratamento de fracturas em ossos longos revelou taxas de consolidação sem diferenças estatisticamente significativas (67).

Um compósito deste tipo, de origem bovina, aprovado pela Food and Drug Administration(FDA) sob a denominação de Collagraft, revelou óptimos resultados quando associado a células de medula, por exemplo nas artrodeses vertebrais ou preenchimento de cavidades quísticas (68).

MATERIAIS OSTEOINDUTORES

1. Aloenxerto

É aquele que é proveniente de um dador da mesma espécie. Actualmente já não é usado sem preparação prévia (fresco), devido à resposta inflamatória que desencadeia e aos riscos de transmissão de doenças.

Pode ser conservado de 2 formas (15):

1. Congelado ("fresh-frozen") => a -70ºC após uma lavagem com antibiótico (a sua utilização pode ir de 1 ano, se for mantido a -20ºC, até 5 anos, se a -70ºC)
2. Liofilizado ("freeze-dried") => lavagem dupla com antibiótico, congelação a -70ºC e secagem até ficar com um conteúdo em água de cerca de 5% (duração ilimitada)

A congelação reduz a imunogenicidade e consequente rejeição crónica, mas não elimina o risco de transmissão de HIV (69). Pelo contrário, a liofilização reduz ainda mais a imunogenicidade e elimina o risco de HIV, mas diminui também a capacidade de osteoindução e as propriedades mecânicas do enxerto.

Além dos problemas imunogénicos e infecciosos, os aloenxertos apresentam ainda outras desvantagens como a sua inexistente capacidade osteogénica, a variabilidade dos resultados clínicos da sua aplicação e, por fim, o seu elevado custo.

A quantidade disponível, comparativamente com o enxerto autólogo, é sem dúvida uma vantagem em relação a este, assim como o é, a dispensabilidade de um procedimento cirúrgico adicional no paciente, para a sua colheita.

Por fim, já é possível ter acesso a aloenxerto ósseo com uma grande variedade de formas físicas (gel, pó, fibras, pastas, etc).

Actualmente, está a ser desenvolvido um grande esforço de investigação, no sentido de melhorar a integração e remodelação deste tipo de enxerto através de modificações físico-químicas. As modificações físicas passam por criar instrumentos de corte através de laser, por exmplo, de forma a obter formatos especiais, com furações precisas, seguidos de desmineralização da superfície para melhorar a revascularização. A modificação química dos aloenxertos pode passar ainda pela adição de factores de crescimento, BMP-2 e BMP-7, que irão estimular o crescimento ósseo (6).

Em relação ao problema da rejeição crónica, diversas linhas de investigação tem sido seguidas para melhorar a tolerância aos aloenxertos. O estudo da compatibilidade genética dos "loci" dos antigéneos de histocompatibilidade (HLA) ou de tolerância induzida por curtos períodos de imunossupressão seguidos de transplante de medula ou mesmo com o recurso a anticorpos monoclonais são as que parecem mais promissoras (70).

2. Matriz óssea desmineralizada (DBM)

É produzida colocando aloenxerto em meio ácido, o que lhe retira a maior parte da componente mineral, mas retém o colagéneo e as proteínas não colagéneas, incluindo factores de crescimento (44).

Se por um lado este processo destrói eventuais vírus, eliminando o risco de transmissão de doenças infecciosas, por outro diminui a sua resistência estrutural, limitando, assim, as suas possíveis aplicações em situações sujeitas a carga em Ortopedia (8).

O seu maior potencial de osteoindução comparativamente ao aloenxerto (17), depende de factores como o tipo de soluções e o tempo usado na desmineralização, o tamanho das suas partículas e as temperaturas e métodos de esterilização utilizados (71). Alguns estudos animais efectuados recentemente, comparam a eficácia das diferentes DBM comercializadas, em artrodeses de coluna onde são bastante utilizadas como alternativa ou suplemento do aloenxerto (72, 73).

3. Xenoenxerto

São enxertos provenientes de outras espécies animais (ex: bovinos). Por esse motivo, necessitam de um tratamento antigénico, de deslipidização e desproteinização, que lhe reduz concomitantemente as suas capacidades osteoindutoras (74). Por isso, em regra, previamente à sua aplicação, o xenoenxerto é impregnado com células de medula óssea humana.

4. Factores de crescimento ósseo

Urist, em 1965, deu o primeiro passo na descoberta dos factores de crescimento ósseo. Ao implantar fragmentos ósseos, em posição subcutânea ou intramuscular, verificou a formação de tecido ósseo, introduzindo então o termo "osteoindução" (75, 76, 77).

Além disso, ao estudarem-se os factores homeostáticos que, regulando a acção dos osteoblastos e osteoclastos, contribuem para o equilíbrio da massa óssea, conclui-se que estes são de 2 tipos: sistémicos (através de hormonas como a paratormona e a calcitonina) ou locais (através de factores de crescimento). Estes são polipeptideos, específicos para determinados tecidos os quais se ligam a receptores de superfície, estimulando a actividade celular) (78). Há pois uma série de processos nos quais os factores de crescimento actuam: crescimento do esqueleto, consolidação de fracturas, reparação da cartilagem articular e osteoporose.

A matriz óssea contém numerosos factores de crescimento (79), com diversas formas de actuação:

a) BMP (Bone Morphogenic Proteins)

A matriz óssea desmineralizada foi o biomaterial de eleição para isolar, purificar e fazer a clonagem molecular das BMP´s.

Estas, após fixarem-se à célula menquimatosa com o auxílio da fibronectina, enviam sinais por proteínas específicas para o núcleo, levando à expressão de genes que induzem a síntese de macromoléculas envolvidas na formação de cartilagem e osso, originando um condrócito ou osteoblasto (79). Há pois aqui uma cascata da osteogénese com 3 passos: quimiotaxia e mitose, diferenciação em cartilagem e substituição por osso.

O processo de purificação, clonagem genética e recombinação (rh) é complexo pelo que muita investigação tem sido efectuada nesta área. Se por um lado está demonstrada a sua ligação a receptores celulares específicos, o pleiotrofismo das BMP´s (capacidade de um simples gene ter uma multiplicidade de acções biológicas) está comprovado inclusivamente no que diz respeito à regulação da hematopoiese, síntese de matriz extracelular e até da apoptose (morte celular) (80).

Existem mais de 20 tipos de BMP´s, mas as mais activas são a 2, 4 e 7 (mais conhecida por OP-1, osteogenic protein-1, e já aprovada pela FDA) (81).

As aplicações clínicas das formas recombinantes, rhBMP-2 e da rhBMP-7, têm sido estudadas exaustivamente, nomeadamente no tratamento de fracturas ou pseudartroses (82) e em artrodeses vertebrais (83, 18), muitas vezes com resultados superiores ao do enxerto autólogo. No entanto, esta elevada capacidade de osteoindução é, por alguns autores, considerada excessiva.

A investigação dirige-se também para os veículos de transporte destas proteínas, no sentido da sua libertação ser controlada, por exemplo com a utilização de partículas de Hidroxiapatite associada a géis reabsorvíveis (84).

b) TGF-Beta (Transforming Growth Factor-Beta)

Tem 3 isoformas, sendo a TGF-Beta 1 a mais abundante no tecido ósseo (85). Trata-se de um factor de crescimento implicado na proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de muitos tipos de células, pelo que tem influência em processos tão diversos como a embriogénese, angiogénese (86), inflamação (87) e cicatrização (88). Em contraste com as BMP's, é incapaz de induzir a osteogénese a partir de células mesenquimatosas pluripotenciais, mas uma vez desencadeado o processo, aumenta a pool de células osteoprogenitoras por indução da quimiotaxia e proliferação (89).

Diversas linhas de investigação, mostram que está também implicado na tumorigénese e invasão tumoral, nomeadamente através de metastização óssea, ao criar condições locais favoráveis ao crescimento tumoral e angiogénese (90, 91).

O tratamento da osteoporose seria outra hipótese de aplicação clínica, mas que, por falta de um transportador adequado, continua a ser de difícil implantação.

c) PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

É um mitogéneo de células mesenquimatosas, produzido não só por plaquetas, mas também por macrófagos, monócitos e células endoteliais (78). Actua exclusivamente na replicação, mas não interfere nas funções dos osteoblastos (92).

Estudos animais revelaram que uma simples injecção de PDGF num foco de osteotomia, aumenta a densidade e volume de calo ósseo quando comparado com um grupo controle (93). Verificou-se também que implantes sintéticos tratados com plasma, apresentam uma densidade trabecular aos 6 meses que é superior aqueles não tratados, sendo esta acção atribuída às PDGF (94)

d) IGF-I e II (Insulin-Like Growth Factor-I e II)

Está há muito descrita a forma como o eixo hipotálamo-hipofisário, actua libertando hormonas de crescimento que se ligam a receptores específicos da placa de crescimento que libertam IGF-1. Há depois um feedback negativo sobre estas glândulas que frena a sua produção (95). Além deste efeito sobre o crescimento, actua também na reparação óssea, pelo que alguns investigadores colocaram a hipótese de as hormonas de crescimento poderem assim interferir na consolidação de fracturas (96), o que não se veio posteriormente a confirmar (97).

A IGF-2 é dos factores de crescimento mais abundantes do osso. Tem uma grande semelhança química e biológica com a IGF-1, provavelmente porque a sua transdução para a célula alvo ocorre através do mesmo receptor de superfície (95). É no entanto menos potente. Uma linha de investigação interessante surgiu com a descoberta recente de que campos magnéticos externos são capazes de estimular a produção de IGF-2 em culturas de osteoblastos humanos (98).

e) FGF (Fibroblast Growth Factor)

Originalmente foram descritos devido à sua actividade mitogénica sobre os fibroblastos. No entanto, actualmente, são-lhes atribuídas funções de regulação de funções celulares tão diversas como mitogénese, diferenciação, produção de proteases e modulação de receptores (99).

Quer a FGF-1 (ácida) quer a FGF-2 (básica), actuam na regulação de células ósseas e cartilagíneas. A injecção local no foco de fractura de um rato de FGF-1, produziu um alargamento significativo do calo ósseo, embora simultaneamente inibisse a expressão do gene da matriz cartilagínea (98). Em relação à FGF-2, verificou-se imunhistoquimicamente que há um aumento da sua concentração em redor de uma fractura em ratos sãos, ao contrário do que sucede em diabéticos, e que a sua aplicação nestes, sob a forma de gel de fibrina, restaurava o processo de consolidação (100).

A sua acção é, no entanto, complexa pois pode ter efeitos antagónicos em função da dose ministrada (101).

Estes problemas levaram a que diversos investigadores estudassem a aplicação da terapia genética para o controle da formação óssea, permitindo assim obter níveis locais mais fisiológicos de factores de crescimento e a sua expressão celular mais prolongada, evitando assim o emprego de doses mais elevadas destes sob a forma de bolus (102).

CONCLUSÕES

Os avanços científicos na área dos substitutos ósseos são uma realidade.

A nível de materiais osteocondutores, a evolução deu-se com a introdução de técnicas inovadoras na preparação de compósitos HA/TCP com um comportamento mecânico e biológico mais próximo do osso.

A engenharia de tecidos segue agora a linha da sua associação com células ósseas com o propósito de lhes conferir o componente osteogénico que lhes falta.

As possibilidades que se abrem para a cirurgia reconstrutiva centram-se também nos avanços da biomodelação, com a produção de implantes com a forma exacta do defeito ósseo, através do recurso a técnicas avançadas de reconstrução tridimensional.

Com a descoberta da importância da angiogénese e dos factores de crescimento nos mecanismos de formação de osso, abre-se um universo de novas aplicações clínicas não só no tratamento de pseudartroses e cirurgia reconstrutiva, mas inclusivamente na osteoporose e osteoartrose.

REFERÊNCIAS

1 - Laurencin CT. Chapter I- Bone graft and bonegraft substitutes a brief history. In: Laurencin CT, editors. Bone graft substitute - ASTM International. 2004.
2 - Ratner BD. A history of Biomaterials. In: Ratner, edits. Biomaterials Science. 2nd edition. Elsevier Inc. 2004. pp.10-9.
3 - Williams et al. Conferência de consensos sobre definições em Biomateriais. Chester 1991.
4 - Mainard. Les substituts osseox em 2001: Monographie Editée par GESTO (Association pour L'etude des Greffes et substitutes Tissulaires en Orthopédie) sous la direction de Dr. Mainard , Edition Romillat , Paris, 2001.
5 - Banwart JC. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. Spine 1995;20:1055-60.
6 - Tomford WW. Bone allografts : Past, Present and future. Cell and Tissue Banking 2000;1:105-9.
7 - Vaccaro AR. The Role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone Graft. Orthopedics 2002; 25 (suppl 5): 571-8.
8 - Khan SN. Clinical applications of Bone Graft substitutes. Orthopedic Clinics of North America 2000;31:389-98.
9 - Nishida K, Gilbertson LG, Evans CH, Kang JD. Potential applications of gene therapy to the treatment of spinal disorders. Spine 2000;25:1308-14.
10 - Proubasta J, Mur JG, Planell JA. Biocompatibilidad, materiales implantables, tipos de implante. In: Fundamentos de Biomecânica y Biomateriales, Ediciones Ergon. Madrid. 1997. pp. 271-350.
11 - Davies JE. Histodynamics of endosseous wound healing. In: Davies JE, editors. Bone engineering. Canada: EM2. 2000. pp. 1-11.
12 - Anderson. Biological responses to materials. Annu. Rev Mater Res 2001;31:81-110.
13 - Bauer TW, Muschler GF. Bone Graft Materials. Clin Orthop 2000;37:10-27.
14 - Fleming JE Jr, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in Orthopedic Tissue Engineering. Orthop Clin North Am 2000;31:357-74.
15 - Vaccaro AR, Chiba K, Heller JG. Bone grafting alternatives in spinal surgery. The Spine Journal 2002;2:206-15.
16 - Boden SD. Biology of lumbar spine fusion and use of bone graft substitutes: Present, future and next generation. Tissue Engineering 2000;6:383-99.
17 - Burkus JK, Sandhu HS, Gornet MF, Longley MC. Use of rh BMP-2 in combination with structural control allografts; Clinical and radiographic outcomes in anterior lumbar spinal surgery. J Bone Joint Surg 2005; 87-A (6); 1205-1212.
18 - Keler EE, Triflett WW. Iliac bone graft: Review of 160 consecutive cases.J Oral Maxillofac Surg 1987;45:11-4.
19 - Younger E, Chapmann M. Morbidity at bone graft-donor sites. J Orthop Trauma 1989;3:192-5.
20 - Montgomery DM, Aronson DD, Lee CL, Lamont RL. Posterior spinal fusion: Allograft versus autografts bone. J Spine Disord 1990;3:370-5.
21 - Mc Carthy RE, Peek RD, Morrisy RT, Hough AJ Jr. Allograft bone in spinal fusion for paralytic scoliosis. J Bone Joint Surg Am 1986;68: 70-5.
22 - Lane JM, Safdar NK. Bone Grafts of the 20th Century: Multiple purposes, materials and goals. Orthopedics Today. 2000.
23 - Connolly J, Guse R, Lippiello L. Development of an osteogenic bone marrow preparation. J Bone Joint Surg Am 1989;71:684-91.
24 - Peltier LF. The use of plaster of Paris to fill defects in bone. Clin Orthop 1961;21:1-31.
25 - Hogset O, Bredberg G. Plaster of Paris and hair cell morphology. A scanning electron microscopic study of an alternative implant materials for ear surgery. Acta Otolaryngol 1988;106:331-8.
26 - Peltier LF, Jones RH. Treatment of unicameral bone cysts by curetage and packing with plaster of Paris pellets. Clin Orthop 2004;422:145-7.
27 - Hench LL, Best S. Ceramic, glasses and glass ceramics. In: Ratner BD, editors. Biomaterial sciences.2nd Edition. 2004. pp.155-70.
28 - Hench LL, Wilson J. Surface active biomaterials. Science 1984;226:630-6.
29 - Boyan BD, Nasatzky E, Keller TA, Schartz Z. Substitutos del injerto osseo. Current Opinion in Orthopedics 1998;III:17-23.
30 - Clark AE, Hench LL, Paschall HA. The influence of surface chemistry on implant interface histology : A theorical basis for implant materials selection. J Biomed Mater Res 1976;110:161-71.
31 - Hench LL, Wilson J. Bioactive Glasses: Present and Future. Bioceramics 1998;11:31-6.
32 - Gatti AM, Zaffe D. Bioactive glasses and chemical bond. Biomaterials 1992:97-106.
33 - Hamadouch M, Sedel L. Ceramics in Orthopaedics J Bone Joint Surg Br 2000; 82-B:1095-9.
34 - Oonishi H, Hench LL, Wilson I. Quantitative comparison of bone growth behavior in ceramics of Bioglass ®, A-W glass ceramics and HA. J Biomed Mater Res 2000;51:37-46.
35 - Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. Clin Orthop Rel Research 1997;334:316-25.
36 - Kokubo T, Ito S, Huang Z. Ca-P - Rich Layer formed on high strength bioactive glass ceramics A-W. J Biomed Mater Res 1990;24:331-43.
37 - Vogel W, Holland H, Gummel J. Development of machineable bioactive glass-ceramics for medical uses. J of Non-Crystaline Solids 1986;80:34-51.
38 - Holland W, Vogel W, Mortier WJ, Duvingneaud PH, Naessens G, Plumat E. A new type of crystal in machineable glass-ceramics. Glass Technology 1983;24:318-22.
39 - Burnie J. Controlled release glass (C. R. G.) - A new biomaterial. PhD Thesis. 1988.
40 - Driessens FCM, Ramselaar MMA. Chemical reactions of calcium phosphate implants after implantation in vivo. J Mater Sci 1992;3:413-7.
41 - Betz RR. Limitation of autograft and allograft new synthesis solutions. Orthopedics 2002 (suppl).
42 - Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. Orthop Clin North Am 1999;30:599-8.
43 - Lascart T, Favard L, Burdin P, Traore O. Utilisation du phosphate tricalcique dans les osteotomies tibiales de valgisation par addition interne. Ann Orthopediques de L' Ouest 1998;30:137-41.
44 - Meynet J. Osteotomie tibiale de valgisation par ouverture interne: place des substituts osseux. Ann Orthopediques de L'Ouest 1998;30:171-3.
45 - Gaasbeek R, Toonen H, Heerwaarden R, Buma P. Mechanism of bone incorporation of β-TCP bone substitute in open wedge tibial osteotomy in patients. Biomat 2005;26;33:6713-9.

46 - Yamamoto T, Onga T, Marui T, Mizuno K. Use of Hydroxyapatite to fill cavities after excision of begin bone tumors: clinical results. J Bone Joint Surg 2000;82-B:1117-20.
47 - Koshino T, Murase T, Saito T. Medial opening-wedge high tibial osteotomy with use of porous hydroxyapatite to treat medial compartment osteoarthritis of the knee. J Bone Joint Surg Am 2003; 85: 78-85.
48 - Regner L, Carlsson L, Karrholm J, Herbert P. Ceramic coating improves tibial component fixation in total knee arthroplasty. J Arthroplasty 1998; 13: 882-889.
49 - Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone . Biomaterials 2004; 25: 987-994.
50 - Santos JD, Hastings GW, Knowles JC. Sintered hydroxyapatite compositions and method for the preparation thereof, European Patent WO 0068164. 1999.
51 - Lopes MA. Glass reinforced hydroxyapatite composites: structure, physico chemical characterization and biological performance. PhD Thesis. FEUP. 1999.
52 - Lopes MA, Santos JD, Monteiro FJ, Ohtsuki C, Osaka A , Kaneko S, Inove H. Osteocompatibility and in vivo evaluation of glass reinforced hydroxyapatite composite. Bioceramics 1999;12:421-4.
53 - Lopes MA, Monteiro FJ, Santos JD. Glass reinforced hydroxyapatite composites: secondary phase proportions and densification effects on bioactive bending strength. J Biomed Mater Res 1999;48:734-40.
54 - Santos JD, Vasconcelos M, Reis RL, Afonso A, Monteiro FJ, Hastings GH. Glass reinforced hydroxyapatite composites: physical properties and preliminary histological studies in rabbits. Bioceramics 1994;7:243-8.
55 - Afonso A, Santos JD, Vasconcelos M, Branco R, Cavalheiro J. Granules of osteoapatite and glass-reinforced hydroxyapatite implanted in rabbit tibia. J Mat Scien: Materials in Medicine 1996;7:507-10.
56 - Costa MA, Gutierres M, Almeida L, Lopes MA, Santos JD, Fernandes MH. In vitro mineralization of human bone marrow cells cultured on Bonelike®. Key Engineering Materials 2004;254-256:821-4.
57 - Ferraz MP, Fernandes MH , Cabral T, Santos JD, Monteiro, FJ. In vitro growth and differentiation of osteoblast-like human bone marrow cells on glass reinforced hydroxyapatite plasma-sprayed coatings. J Mat Scien: Materials in Medicine 1999;10:567-76.
58 - Ferraz MP, Knowles JC, Olsen I, Monteiro FJ, Santos JD. Flow cytometry analysis of the effects of pre-immersion on the biocompatibility of glass-reinforced hydroxyapatite plasma-sprayed coatings. Biomat 2000;21:813-20.
59 - Gutierres M, Hussain NS, Afonso A, et al. Biological behaviour of bonelike® graft implanted in the tibia of humans. Key Engineering Materials 2005;284-286:1041-4.
60 - Knnack D, Goad M, Rey C, Tofigni A, Chakravarthy P, Lee D. Resorbable calcium phosphate bone substitute. J Biomed Mater Res 1998;43:399-409.
61 - Kopylou P, Jonsson K, Thorngren KG. Injectable calcium phosphate in the treatment of distal radius fractures. J Hand Surg Br 1996;21:768-71.
62 - Schreiber RE, Blease K, Ambrosio A, Amburn E, Sosnowski B, Sampath TK. Bone induction by ADBMP-2/collagen implants. J Bone Joint Surg Am 2005;87:1059-68.
63 - Muschler GF, Negami S, Hyodo A , Gaisser D, Gasley K , Kambic H. Evaluation of collagen ceramic composite graft materials in a spinal fusion model. Clin Orthop 1996;328:250-60.
64 - Chapman MW, Bucholz R, Cornell C. Treatment of acute fractures with a collagen calcium phosphate graft material. A Randomized clinical trial. J Bone Joint Surg Am 1997;79:495-502.
65 - Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E , Lee DL. Role of bone substitutes. Clin Orthop 1996;324:55-65.
66 - Kelly EB. New frontiers in bone grafting. Orthop Techn Review 2000;2:1-5.
67 - Mathes DW, Randolph MA, Lee WP. Strategies for tolerance induction to composite tissue allografts. Microsurgery 2000;20:448-52.
68 - Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone: The influence of processing on safety and performance. Orthop Clin North Am 1999;30:571-81.
69 - Peterson B, Whang PG, Iglesias R , Wang JC, Lieberman JR.Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix.J Bone Joint Surg Am 2004;86:2243-50.
70 -Morone MA, Boden SD. Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix cell. Spine 1998;23:159-67.
71 - Elves MW, Salama R. A study of the development of cytotoxic antibodies produced in recipients of xenografts of iliac bone. J Bone joint Surg Br 1974;56:331-9.
72 - Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965;150:893-9.
73 - Yuan H, Zou P, Yang Z, Zhang X, De Bruijn JD, Groot KD. Bone morphogenic protein and ceramic-induced osteogenesis. J Mat Scien: Materials in Medicine 1998;9:717-21.
74 - Reddi AH, Marshall R. Urist: A renaissance scientist and orthopedic surgeon. J Bone Joint Surgery Am 2003;85:3-7.
75 - Khan SN, Bostrom MP, Lane J. Bone growth factors. Orthopedic Clinics of North America 2000;31:375-87.
76 - Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: From basic science to clinical applications. J Bone Joint Surg Am 2001; 83-A (suppl1) (PT1): S1-6.
77 - Sugi Y, Yamamura H, Okagawa H, Markwald RR. Bone morphogenetic protein-2 can mediate myocardial regulation atrioventricular cushion mesenchymal cell formation in mice. Developmental Biology 2004; 269:505-18.
78 - Asahina I, Sampath TK, Nishimura I, Hauschka PV. Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. J Cell Biol 1993;123:921-33.
79 - Friedlander GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteotomic protein-1(BMP-7) in the treatment of tibial nonunions. J Bone Joint Surg Am 2001;83-A (suppl.1) (PT2): S151-8.
80 - Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE. The use of Rh BMP-2 in interbody fusion cases. Definitive evidance of osteoinduction in humans: A preliminary report. Spine 2000; 25: 376-86.
81 - Matsumoto T, Okazaki M, Inove M, et al. Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein. Biomat 2004;25:3807-12.
82 - Janssens K, Dijke P, Janssens S, Hul WV. Transforming growth factor-beta1 to the bone. Endoc Rev 2005: 26:743-74.
83 - Pepper MS.Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogensis and vessel wall integrity. Cytokine Growth Factor Rev 1997;8:21-43.
84 - Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. Annu Rev Immunol 1998;16:137-61.
85 - O´Kane S , Ferguson MW. Transforming growth factor beta and wound healing. Int J Biochem Cell Biol 1997;29:63-78.

86 - Aufdemorte TB, Fox WC, Holt GR, McGuff HS, Ammann AJ, Beck LS. An intraosseous device for studies of bone-healing. The effect of transforming growth factor beta. J Bone Joint Surg Am 74:1153-61.
87 - Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. Nat Rev Cancer 2003;3:807-21.
88 - Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. Nat Genet 2001;29:117-29.
89 - Hock JM, Canalis E. Platelet derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiate function of osteoblasts. Endocrinol 1994;134:1423-8.
90 - Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steel J, Johnson KA, Hicklin DJ. Effect of platelet-derived growth factors on tibial osteotomies in rabbits. Bone 1994; 5:203-8.
91 - Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg 1998;85:638-46.
92 - Trippel SB, Coutts RD, Einhorn TA, Mundy GR, Rosenfeld RG.Instructional course lectures, the American Academy of Orthopaedic Surgeons - growth factors as therapeutic agents. J Bone Joint Surg Am 1996;78:1272-86.
93 - Koskinen EV, Lindholm RV, Nieminen RA, Puranen JP, Attila U. Human growth hormone in delayed union and non-union of fractures. Internat Orthop 1978;1:317-22.
94 - Northmore-Ball MD, Wood MR. Meegitt BF. A biomechanical study of the effects of growth hormone in experimental fracture healing. J Bone Joint Surg Br 1980;62:391-6.
95 - Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Khin NA, et al. A growth factor dependent model for magnetic field regeneration of bone formation. Trans Orthop Res Soc 1994;19:518.
96 - Jin Gushi S, Heydmann A, Kana SK, Macey LR, Bolander ME. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. J Orthop Res 1990;8:364-71.
97 - Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin - diabetic rats. Endocrinol 1994;135:774-81.
98 - Wang JS, Aspenberg P. Basic fibroblast growth factor and bone induction in rats. Acta Orthop Scandinavia 1993;64:551-69.
99 - Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion. Orthop Clin North Am 1999;30:635-45.
100 - Hench LL, Wilson J, edits. An introduction to Bioceramics. Advanced series in Ceramics 1993;1.
101 - Kingery WD, Bowen HK, Uhlmann DR. Introduction to ceramics. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons. 1976.
102 - Schneider SJ, edits. Ceramic and Glasses. Engineered Materials Handbook. ASM International 1991;4.

Correspondência:
Dr. Manuel Gutierres
Serviço de Ortopedia
Hospital de São João
Alameda Prof. Hernâni Monteiro
4200-319 Porto

e-mail: m.gutierres@sapo.pt