

Estudo comparativo entre as osteossínteses com placas e osteossínteses com placas associadas a enxertos de proteína morfogenética óssea (Gen-Tech®) em fraturas distais de rádio-ulna em cães com menos de 6 quilos¹

Cassio R.A. Ferrigno², Marcos I. Della Nina³ e Denise T. Fantoni²

ABSTRACT.- Ferrigno C.R.A., Della Nina M.I. & Fantoni D.T. 2007. [A comparative study of osteosynthesis with plates and plates associated with grafts of bone morphogenic proteins (Gen-Tech®) in distal radio-ulna fractures in dogs with less than 6 kilograms.] Estudo comparativo entre as osteossínteses com placas e osteossínteses com placas associadas a enxertos de proteína morfogenética óssea (Gen-Tech®) em fraturas distais de rádio-ulna em cães com menos de 6 quilos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(2):65-69. Departamento de Cirurgia do Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-900. E-mail: cassioaf@usp.br

It is well known that bone morphogenic proteins (BMP) cause osteogenesis, yet clinical research must be performed in order to really show their benefits. Animals weighing less than 6 kg show well known difficulties regarding radius and ulna fracture repair mainly with bone non-union, due to poor vascularization of the distal portion of the radius. Therefore this study aimed to compare the velocity of bone callus formation in the treatment of fracture repair with plates and screws alone or with plates and screws plus BMP. Thirty three dogs with radius and ulna fractures were distributed into two groups, where animals of the control group received the conservative treatment performed with screws and plates alone, whilst the other group received the conservative treatment and BMP. The time of bone callus formation was evaluated comparatively through radiographic exams 30, 60, 90, 120, 180 and 210 days after the surgical procedure. Animals treated with BMP showed a healing time of 32 ± 15 days, which was significantly different ($p < 0.001$) from the control group which required 127 ± 34 days. With the results obtained, it can be concluded that the distal radio-ulna fractures of dogs weighing less than 6 kg suffered a significant reduction of the bone callus formation time, which was around 90 days.

INDEX TERMS: Bone morphogenic proteins, BMP, bone fractures, bone plate, dogs.

RESUMO.- Sabe-se que *Bone morphogenic proteins* (BMP) são promotores de osteogênese, mas pesquisas ainda estão sendo feitas no intuito de descobrir sua atuação clínica na reparação de fraturas. As dificuldades inerentes da reparação de fraturas de rádio-ulna de cães abaixo de 6 quilos são conhecidas, principalmente, com a ocorrência freqüente de não-união óssea devido a pouca vascularização da porção distal do rádio. Tendo em vista

esta realidade objetivou-se a comparação da velocidade de formação de calo ósseo entre o tratamento com placas e parafusos e tratamento com placas e parafusos associados a BMP.

Foram realizadas 33 osteossínteses de regiões distais de rádio-ulna de cães, sendo 17 animais do grupo controle (tratamento com placas e parafusos) e 16 animais do grupo BMP (tratamento com placas e parafusos com adição de proteína morfogenética óssea BMP). Avaliou-se, comparativamente, o tempo de formação de calo ósseo, por exames radiográficos, aos 30, 60, 90, 120, 180 e 210 dias de pós-operatório. Foi encontrada a média de tempo de cicatrização de $127,5 \pm 34,15$ dias no grupo controle e, no grupo tratado com a proteína morfogenética óssea, a média foi de 32 ± 15 dias. Com isto pode-se concluir que as fraturas distais de rádio e ulna, em cães menos de 6 kg, tratadas com proteína morfogenética ós-

¹ Recebido em 24 de outubro de 2006.

Aceito para publicação em 5 de dezembro de 2006.

² Departamento de Cirurgia do Hospital Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo, SP 05508-900. *Autor para correspondência: cassioaf@usp.br

³ Pós-Graduando, Departamento de Cirurgia da FMVZ, USP.

sea sofreram redução significativa do tempo de formação de calo ósseo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Proteínas morfogenéticas ósseas, BMP, fraturas, cães, placas ósseas.

INTRODUÇÃO

A cicatrização óssea é influenciada pelos fatores de crescimento ósseo, peptídeo ou glicoproteínas, que organizam e coordenam a mitose celular, quimiotaxia, diferenciação e crescimento das células produtoras de matriz óssea (Herndon et al. 1992).

BMP é a sigla utilizada para a denominação inglesa Bone Morphogenetic Proteins, descrito primeiramente por Marshall Urist em 1960 (Urist 1965). Urist notou a formação de osso heterotópico após a implantação de matriz óssea desmineralizada em pontos intramusculares. A seqüência de eventos observados foi idêntica ao observado durante a ossificação endocondral e na cicatrização óssea. Nelas, as células mesenquimais indiferenciadas migram para o local de implantação onde ocorre proliferação, os condroblastos derivados das células mesenquimais secretam componentes da matriz extracelular para formar a base cartilaginosa. Esta base será hipertrofiada e a matriz extracelular se torna vascularizada por células hematopoiéticas e endoteliais. Em seguida, ocorre o aparecimento de osteoblastos e osteoclastos, onde ocorre a reabsorção da cartilagem e sua substituição por osso.

O BMP e outros fatores de crescimento ósseo podem ser encontrados em pequenas quantidades em células do perioste, células mesenquimais, nas fibras colágenas da matriz óssea e em pequenas células não-colágenas da matriz óssea. A quantidade de BMP encontrado normalmente na matriz óssea é cerca de 1-2mg/kg de osso mineralizado (Forell et al. 1993, Lind et al. 1996). A importância dos BMPs é a grande variedade de indivíduos nas quais foi possível isolar moléculas similares e o fato de, dentro das espécies mamíferas, não serem relatados casos de resposta antigênica ao uso de BMP recombinante entre espécies (Heckman et al. 1991, Yasko et al. 1992).

Atualmente existem 14 tipos de BMP com a característica de produzir osso. Os tipos de BMP-2 a nove são membros da família das TGFb, sendo os BMP-2, BMP-4 e BMP-7 condro-indutivos e osteoindutivos. O BMP-7 é conhecido como proteína ostioindutiva humana um e o BMP-2 é conhecido como proteína ostioindutiva humana dois. Por outro lado, o BMP-3 possui apenas a propriedade de formação de cartilagem, mas a ativação seqüenciada de todos os BMPs de um a nove é importante para a osteoindução e formação do calo ósseo (Alper 1994, Cook et al. 1995, Cheng et al. 2003). É importante salientar que apesar dos BMPs estarem na superfamília das TGFb, as duas categorias de fatores de crescimento têm poucos efeitos celulares comuns e normalmente têm efeitos antagônicos. Podemos citar o fato da TGFb inibir a produção de fosfatase alcalina e reduzir a incorporação de sulfato pelas proteoglicanas, enquanto os BMPs aumentam a produção de fosfatase alcalina e a absorção de sulfato (Heckman et al. 1991, Yasko et al. 1992, Millis 1999).

Os BMPs são distintos, em parte, dos outros fatores de crescimento, pois atuam na indução de diferenciação de células mesenquimais em condroblastos e osteoblastos e não na ação

de aumento da atividade mitótica das células. Também atuam na quimiotaxia destas células para o local da implantação. Portanto, o BMP atua em duas formas distintas: a de quimiotaxia de células indiferenciadas para o local da fratura e da diferenciação destas em células produtoras de matriz óssea (Heckman et al. 1991, Yasko et al. 1992, Forell et al. 1993, Lind et al. 1996, Cheng et al. 2003).

A habilidade do BMP de induzir osteogênese é influenciada por vários fatores, como a fonte e o potencial osteoindutivo da preparação do BMP, a viabilidade e habilidade morfogenética óssea ou a capacidade de resposta à indução das células osteoprogenitoras do hospedeiro e das condições do ambiente local de implantação (Ekelund et al. 1991, Heckman et al. 1991, Yasko et al. 1992 Cheng et al. 2003).

Os trabalhos relatam que o tempo esperado para cicatrização óssea, no tratamento de fraturas distais de radio ulna com placas está em um intervalo de 3 meses a 1 ano (Lappin et al. 1983, Vaughan 1984, Brinker et al. 1999).

Certas características inerentes a estas estruturas, como pouco recobrimento de tecido muscular, canal medular pequeno ou pouca vascularização são as causas principais de complicações, sejam após cirurgias ou em tratamentos conservadores (Sumner-Smith & Cawley 1970, DeAngelis et al. 1973, Lappin et al. 1983, Vaughan 1984, Bellah. 1987, Denny 1990, Turner 1995).

O fator peso tem influência nas complicações, nas raças pequenas. Existem trabalhos relatando entre 60% (Lappin et al. 1983, Vaughan 1984, Bellah. 1987, Denny 1990, Turner 1995) e 100% (Lappin et al. 1983) de não-união óssea, causadas geralmente pela pobre vascularização.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 33 animais da espécie canina, com peso entre 1,2 e 6 kg, com até 7 anos e que apresentaram fraturas simples fechadas e fraturas simples abertas, no terço distal de rádio e ulna.

Delineamento experimental

Foram estudados os efeitos do uso da proteína morfogenética óssea (Gen-Tech[®])⁴, comparativamente a cirurgias isoladas de fixação óssea através de placas e parafusos em fraturas distais de e suas implicações sobre a evolução do processo de formação de calo ósseo. Para tanto, foram avaliados os fenômenos relativos à evolução clínica dos animais, bem como a avaliação da evolução radiográfica da formação do calo ósseo. Os animais foram divididos em dois grupos: animais com tratamento da fratura com placa e parafuso - Grupo Controle e animais tratados com placa e parafusos mais Gen-Tech[®] - Grupo BMP. Foram analisados os achados relativos à proposição aos 30, 60, 90, 120, 180 e 210 dias de pós-operatório.

Conduta operatória

Os animais foram pré-medicados com cefalexina na dose de 20mg/kg dois dias antes do ato cirúrgico. Após jejum hídrico de cerca de 6 horas e alimentar por 12 horas, os animais foram submetidos ao protocolo anestésico mais adequado a cada paciente.

Efetuar-se as osteossínteses. Para tanto, após tricotomia e preparo rotineiro de campo operatório, foi realizada incisão cutânea na face crânio medial da região distal do rádio e ulna. A seguir, foi

⁴ Indutor e aglutinante de colágeno BMP, Baumer S.A.

efetuada a divulsão dos tecidos subjacentes, a localização, isolamento e afastamento dos tendões dos músculos extensor carpo-ulnar e extensor digital lateral e dos músculos extensor longo do polegar e da cabeça ulnar do músculo flexor digital profundo. Foram iniciados então os procedimentos de redução e alinhamento dos fragmentos da fratura.

Terminada esta etapa operatória, iniciou-se a técnica de colocação de placa e parafusos ósseos, que compreende a fixação de placa de tamanho adequado ao osso. Concluídas as manobras, foi aplicada no Grupo BMP 1,5cc de proteína morfogenética óssea (Gen-Tech®) adicionadas a soro fisiológico.

Procedimentos de avaliação

Para a avaliação dos resultados, adotou-se estudo temporal aos 30, 60, 90, 120, 180 e 210 dias de pós-operatório.

Avaliação radiológica. Nos devidos tempos de observação (30, 60, 90, 120, 180 e 210 dias), os animais foram submetidos a exames radiográficos para avaliação da velocidade de formação do calo ósseo. Em cada exame foram realizadas sempre duas vistas ortogonais do membro operado para uma melhor visualização da evolução do calo ósseo.

Avaliação estatística. A análise estatística considerada mais adequada para possibilitar a interpretação dos resultados obtidos neste experimento foi o teste *t* de Student, que procurou verificar possíveis diferenças significativas entre os grupos de animais do experimento. Este tipo de teste foi o escolhido devido ao fato do teste *t* ser indicado para a comparação de médias onde a variância é desconhecida e as comparações terem sido escolhidas antes de serem examinados os dados do experimento. O teste *t* também foi escolhido por permitir a realização de um número de comparações diretamente proporcional ao grau de liberdade do teste e a comparação de uma variável contínua entre dois grupos, adequando-se perfeitamente à análise requerida pelo experimento.

RESULTADOS

O trabalho observou a velocidade de cicatrização dos 17 animais do grupo controle (Quadro 1) e dos 16 animais do Grupo BMP (Quadro 2).

Quadro 1. Resultados Grupo Controle

Raça	Idade (anos)	Peso (kg)	Simples/cominutiva	Complicações	Tempo para união (dias)
Pinscher	1	4	Simples/ fechada	Ndn ^a	90
Pinscher	1	5	Simples/ fechada	Ndn	120
Poodle	3	6	Simples/ fechada	Ndn	120
Poodle	2	6	Simples/ fechada	Ndn	120
Poodle	7	5	Simples/ fechada	Ndn	120
Pinscher	2	5	Simples/ fechada	Placa solta aos 15 dias	Ndn
Poodle	0,8	5	Simples/ fechada	Ndn	Não união
Pinscher	0,8	6	Simples/ fechada	Ndn	120
Poodle	3	6	Simples/ fechada	Ndn	90
Poodle	2	5	Simples/ fechada	Ndn	Não união
Poodle	4	1,2	Simples/ Fechada	Ndn	Não união
Chiuaua	1	3	Simples/ fechada	Ndn	120
Poodle	1	6	Simples/ fechada	Ndn	120
Pinscher	1,2	6	Simples/ aberta	Placa solta aos 17 dias	Ndn
Poodle	2	3	Simples/ fechada	Ndn	210
Poodle	1	5	Simples/ fechada	Ndn	180
SRD	1	6	Simples/ fechada	Ndn	120

^a Ndn = nada digno de nota.

Em relação ao tempo de união óssea, o grupo controle apresentou 12% de animais cujo tempo de união óssea foi de 90 dias, 47% de união óssea aos 120 dias, 6% em 180 dias, 6% em 210 dias e 29% dos animais não apresentaram união óssea até o final do experimento. No grupo BMP os resultados quanto ao tempo de união óssea foram, 81% dos animais apresentaram consolidação óssea com 30 dias de pós-operatório, em 6% dos animais o tempo de união óssea encontrado foi de 60 dias e 13% não apresentaram união óssea (Fig.1-3).

Resultados estatísticos. A análise estatística realizada com os resultados mostrou uma média +/- desvio-padrão na idade dos animais do Grupo Controle de 1,98 +/- 1,59 anos. No grupo gen-tech foram observados valores de 1,61 +/- 1,65 anos, sendo que estas variações de idade entre os grupos foram consideradas não significantes.

Em relação a variação de peso dentro dos grupos do experimento, o Grupo Controle apresentou 4,89 +/- 1,38 kg enquan-

Quadro 2. Resultados Grupo BMP

Raça	Idade (anos)	Peso (kg)	Simples/cominutiva	Complicações	Tempo para união (dias)
Pinscher	0,8	3	Simples/ fechada	Ndn ^a	30
Poodle	1	4	Simples/ fechada	Ndn	30
Poodle	0,7	3	Simples/ fechada	Ndn	30
Poodle	6	3	Simples/ Fechada	Quebra de placa aos 60 dias	Ndn
Poodle	0,9	2	Simples/ fechada	Ndn	30
Poodle	0,7	3	Simples/ fechada	Ndn	30
Pinscher	1	4	Simples/ fechada	Ndn	30
SRD	5	6	Simples/ fechada	Ndn	30
Poodle	1	4	Simples/ fechada	Falha da placa após 15 dias	Ndn
Pinscher	2	2	Simples/ Fechada	Ndn	30
SRD	3	3	Simples/ fechada	Ndn	60
Pinscher	0,7	3	Simples/ fechada	Ndn	30
Pinscher	0,7	1,5	Simples/ fechada	Ndn	30
Pinscher	0,8	1,8	Simples/ fechada	Ndn	30
Pinscher	1	1,5	Simples/ fechada	Ndn	30
Pinscher	0,5	2,7	Simples/ fechada	Ndn	30

^a Ndn = nada digno de nota.

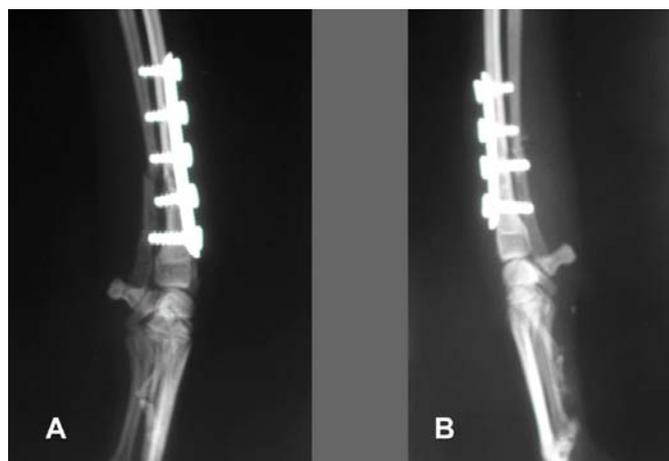


Fig.1. Avaliação radiográfica durante o pós-operatório imediato mostrando a fixação por placa e parafusos (A); a proteína morfogenética óssea foi utilizada em um dos pacientes (B).

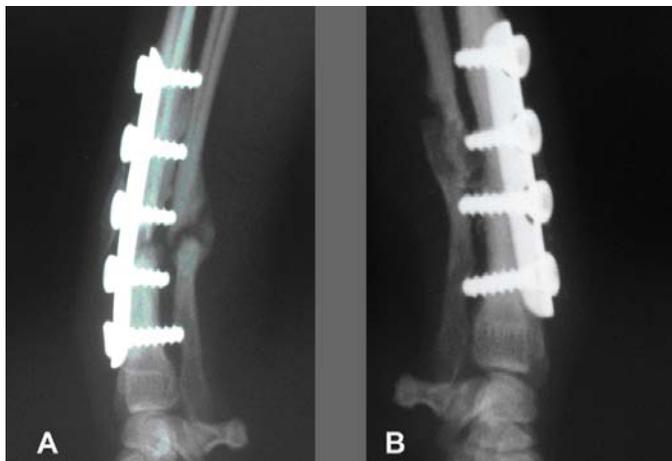


Fig. 2. Avaliação radiográfica após 30 dias de cirurgia no membro de paciente em que não foi utilizado a proteína morfogenética óssea demonstrando a formação incompleta do calo ósseo (A), e de paciente em que foi utilizado a proteína morfogenética óssea demonstrando a formação completa do calo ósseo (B).

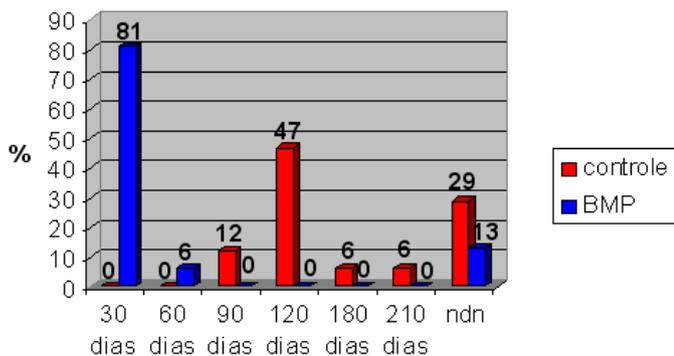


Fig. 3. Tempo de união óssea.

to no grupo BMP os valores encontrados foram de $2,97 \pm 1,16$ kg. A análise mostrou que a variação de peso entre os grupos foi significativa.

Os valores de média \pm desvio-padrão do tempo de união observados no Grupo Controle foram de $127 \pm 34,15$ dias enquanto que no grupo BMP os valores foram de 32 ± 15 dias. Estas variações de tempo de união óssea entre os dois grupos do experimento mostraram-se extremamente significativa a partir da análise estatística realizada.

Neste estudo, a avaliação estatística revelou que a diferença entre as médias \pm desvio padrão do tempo de união óssea entre os dois grupos foi muito significativa, demonstrando uma alta correlação entre o uso do enxerto de "bone morphogenetic protein" e a redução do tempo de consolidação óssea avaliada pelo exame radiográfico.

DISCUSSÃO

Durante o experimento, foi observado que os animais tanto do Grupo Controle como do Grupo BMP mostraram porcentagem menor de não-união óssea do que os encontrados na literatura, que relata até 60% (Vaughan 1984). Isto provavelmente deveu-se a escolha da utilização do tratamento com placa óssea e

placa óssea associada com proteína morfogenética óssea. No caso do Grupo BMP, é importante lembrar que todos os casos onde não houve união óssea foram concomitantes a problemas de quebras das placas ósseas, causando instabilidade no foco de fratura.

A quebra das placas ocorridas em ambos os grupos, em números iguais de animais, não interferiu no estudo do tempo de cicatrização, sendo que a quebra das placas provavelmente ocorreu por motivos citados na literatura (Lappin et al. 1983, Bellah. 1987, Denny 1990, Turner 1995), como fadiga do material, problemas inerentes ao paciente ou outros. A relação quebra de placas e peso será discutida mais adiante no texto.

A partir dos resultados estatísticos, foi possível determinar que a diferença de idade entre o grupo controle e o Grupo BMP não foi significativa, excluindo qualquer possibilidade da idade dos animais ter influenciado na velocidade ou eficiência do processo de consolidação óssea. Isto pode ser reforçado principalmente pelo fato de todos os animais estarem em faixas etárias fora do período considerado como geriátrico (Goldston 1999) que para cães até 9 kg é de $11,48 \pm 1,85$ anos. Nesta faixa etária ocorre redução da capacidade de quimiotaxia, na imunocompetência, fatores importantes para a atuação do "bone morphogenetic protein", além da taxa metabólica e uma perda gradativa de tecido ósseo, fatores que influenciariam em ambos os grupos.

Durante a análise dos resultados foi observado que a diferença entre a média \pm desvio-padrão do peso dos animais entre os dois grupos mostrou ser significativa, sendo o Grupo Controle composto por animais mais pesados que o Grupo BMP, fato este que poderia ter reduzido o tempo de cicatrização óssea devido a influência positiva do fator peso, que corresponderia a melhor vascularização devido a maior recobrimento muscular o que auxiliaria o grupo controle na velocidade de formação do calo ósseo, como mostram os trabalhos (Sumner-Smith & Cawley 1970, DeAngelis et al. 1973, Lappin et al. 1983, Vaughan 1984, Bellah. 1987, Denny 1990, Turner 1995), o que não ocorreu em nosso estudo.

Apesar dos resultados precoces de cicatrização óssea encontradas no grupo BMP, o grupo controle apresentou uma média \pm desvio padrão de $127,5 \pm 34,15$ dias para completa cicatrização do foco de fratura. As médias dos valores encontrados de tempo de formação de calo ósseo no grupo controle estão de acordo com os descritos na literatura que, na idade dos animais deste experimento, são de 3 meses a 1 ano para esta técnica de fixação com placas ósseas (Lappin et al. 1983, Vaughan 1984, Brinker et al. 1999).

Os valores encontrados de média \pm desvio padrão do tempo de consolidação no grupo BMP (32 ± 15 dias) contrastam visivelmente com os resultados observados no grupo controle, demonstrando o grande efeito promotor de produção de osso que o enxerto de proteína morfogenética óssea promove nos focos de fraturas de rádio e ulna, reduzindo o tempo de consolidação e a porcentagem de não-união óssea.

As complicações que ocorreram durante o experimento foram principalmente causadas por quebras ou falhas das pla-

cas ósseas implantadas nos membros fraturados. É importante notar que a porcentagem de quebra das placas foi praticamente a mesma nos dois grupos do experimento, quando era de se esperar uma maior porcentagem de problemas com o implante no grupo com animais mais pesados, indicando que a diferença de peso entre os grupos pouco influenciou na prevalência destas ocorrências. Esta equivalência também indica que as quebras de placas não interferiram no resultado final do experimento, devido ao fato de que houve prevalência semelhante da complicação em ambos os grupos.

Podemos concluir com os resultados observados neste estudo, onde foram utilizados os enxertos de proteína morfogenética óssea, indicaram que este tipo de enxerto conseguiu reduzir significativamente o tempo de consolidação óssea em fraturas distais de em cães menores que 6 kg. Os valores encontrados de média +/- desvio-padrão do tempo de consolidação no Grupo BMP contrastam visivelmente com os resultados observados no grupo controle, demonstrando o grande efeito que o enxerto de proteína morfogenética óssea promove nos focos de fraturas de rádio e ulna, reduzindo o tempo de consolidação.

REFERÊNCIAS

- Alper J. 1994. Bony up: Newly isolated proteins heal bad breaks. *Science* 263:324-325.
- Bellah, R.J. 1987. Use of a distal hook plate for treatment of a distal radial fracture in a dog. *Vet. Surg.* 16:278-282.
- Brinker W.O., Piermatei D.L., Flo G.L. 1999. Fraturas do rádio e da ulna, p.359-382. In: Brinker W.O., Piermatei D.L. & Flo G.L. (ed.), *Manual de Ortopedia e Tratamento das Fraturas dos Pequenos Animais*. Manole, São Paulo.
- Cheng H., Jiang W., Phillips F.M., Haydon R.C., Peng Y., Zhou L., Luu H.H., An N., Breyer B., Vanichakarn P., Szatkowski J.P., Park J.Y. & He T.C. 2003. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J. Bone J. Surg. A* 85:1544-1552.
- Cook S.D., Wolfe M.W., Salkeld S.L. & Rueger D.C. 1995. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J. Bone J. Surg.* 77:734-740.
- DeAngelis M.P., Olds R.B. & Stoll S.G. 1973. Repair of fractures of the radius and ulna in small dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19:436-441.
- Denny H.R. 1990. Pectoral limb fractures, p.357-387. In: Whittick W.G. (ed.), *Canine Orthopedics*. 2nd ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Ekelund A., Brosjo O. & Nilsson O. 1991. Experimental induction of heterotopic bone. *Clin. Orthop.* 263:102.
- Forell E.B. & Straw R.C. 1993. Bone morphogenetic proteins and bone derived growth factors. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 6:166-170.
- Goldston R.T. 1999. Introdução e revisão de geriatria, p.15-27. In: Goldston R.T. & Hoskins J.D. (ed.), *Geriatria e Gerontologia do Cão e do Gato*. Roca, São Paulo.
- Heckman J.D., Boyan B.D., Aufdemorte T.B. & Abbott J.T. 1991. The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in a canine model. *J. Bone J. Surg. A* 73:750-764.
- Herndon D.N., Hayward P.G. & Rutan R.L. 1992. Growth hormones and factors in surgical patients. *Advantage in Surgery* 25:124-127.
- Lappin M.R., Aron D.N., Herron H.L. & Malnati G. 1983. Fractures of the Radius and Ulna in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 19:643-650.
- Lind M., Eriksen E.F. & Bunger C. 1996. Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblast, human marrow osteoblast, and U2-OS cells. *Bone* 18:53-60.
- Millis D.L. 1999. Bone and non-bone-derived growth factors and effects on bone healing. *Vet. Clin. North America, Small Anim. Pract.* 29:1221-1246.
- Sumner-Smith G. & Cawley A.J. 1970. Nonunion of fractures in the dog. *J. Small Anim. Pract.* 11:311-325.
- Turner M.T. 1995. Fractures of the bone of the front limb, p.195-219. In: Olmstead M.L. (ed.), *Small Animal Orthopedics*. Mosby Year Book, St Louis.
- Urist M.R. 1965. Bone: Formation by auto induction. *Science* 150:893-897.
- Vaughan L.C. 1984. A clinical study of nonunion fractures in the dog. *J. Small Anim. Pract.* 5:173-177.
- Yasko A.W., Lane J.M., Fellingner E.J., Rosen V., Wozney J.M. & Wang, E.A. 1992. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J. Bone J. Surg. A* 74:659-670.