

Účinek přípravku Alveolex při kostní reparaci se stimulací rhBMP-2: Histomorfometrická studie

NATHALIA TERRA PEREIRA,¹ JOAO PAULO MARDEGANISSA,² CASSIO DO NASCIMENTO,¹ DIMITRIUS LEONARDO PITOL,² EDILSON ERVOLINO,³ MARCELO RODRIGUES DA CUNHA,⁴ AND VINÍCIUS PEDRAZZI^{1*}

¹Oddělení dentálních materiálů a zubních protéz, fakulta stomatologie v Ribeirao Preto, Univerzita v Sao Paulo, Brazílie

²Oddělení morfologie, stomatologie a fyziologie, fakulta stomatologie v Ribeirao Preto, Univerzita v Sao Paulo, Brazílie

³Oddělení základních věd, fakulta stomatologie v Aracatuba, Sao Paulo Státní univerzita, Brazílie

⁴Oddělení morfologie a základní patologie, fakulta lékařská v Jundiai, Brazílie

KLÍČOVÁ SLOVA: alveolex; rhBMP-2; kostní reparace; histomorfometrie

SHRNUTÍ CÍLE: Cílem této studie bylo histomorfometricky posoudit vliv přípravku alveolex (Propolis 10%) na reparaci kostních dutin v lebce krys. **MATERIÁLY A METODY:** U samců krys Wistar byla vytvořena vada o průměru 5 mm v jejich lebce pomocí vrtacího trepanu. Vady byly vyplněny pomocí rhBMP-21 Alveolex, rhBMP-2, Alveolex, nebo koagulátem. Dvacet osm zvířat se sedmi subjekty na každém bylo obětováno 30 dnů po zákroku a vzorky byly odebrány a uloženy do parafinu. Z lebeční kosti byl odebrán histologický řez označen pomocí HE (hematoxylin a eozin) a analyzován diferenční bodovou metodou. **VÝSLEDKY:** Skupina I a II, rhBMP-21 Alveolex a rhBMP-2, respektive, vykazovaly vyšší úroveň nově vytvořené kosti než jiné skupiny ($P < 0,001$). Nebyly zde žádné významné rozdíly mezi skupinami I a II ($P > 0,05$). Dále zde nebyl žádný výrazný rozdíl mezi skupinami III a IV, Kontrolní-koagulát a Alveolex, respektive ($P > 0,05$). **ZÁVĚR:** Alveolex navýšil kostní reparaci u lebečních vad krys, když byl v kombinaci s rhBMP-2, nicméně bez výrazného rozdílu pro rhBMP-2 izolovanou skupina; Alveolex izolovaná skupina vykazovala nižší úroveň nově vytvořené kosti bez výrazných rozdílů ve skupině koagulátu (kontrolní). Mikroskop. Res. Tech. 75:36-41, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

ÚVOD

Kostní tkáň byla charakterizována svým známým regeneračním potenciálem, se schopní úplné opravy do původní struktury a funkce (Lindhe, 2008). Nicméně v některých situacích, zejména u velkých vad na kostech bylo uzdravení kosti zpožděno nebo dokonce omezeno (Luginbuehl et al., 2004). Proto, aby se urychlila nebo podpořila kostní reparace, je zkoumána a vyvíjena široká škála biomateriálů pro použití v medicíně a stomatologii (Carneiro et al., 2005).

Některé růstové faktory, včetně kostních morfogenetických proteinů (BMP), růst transformující faktor beta, faktor růstu fibroblastů, a inzulinový růstový faktor, byly použity pro stimulaci regenerace kosti. BMP jsou nejznámějšími nejučinnějšími podpůrnými kostními faktory a byly rozsáhle studovány u osového a kraniofaciálního skeletu (Arosarena a Collins, 2005). U klinických zkoušek byly použity různé skupiny růstových faktorů BMP pro tento účel, zejména typ rhBMP 2 (Chung et al., 2007). Bylo prokázáno, že tento biomateriál může stimulovat uzdravení kosti přímou stimulací diferenciací osteoblastů (Kugi-miya et al., 2006). Ukázalo se, že BMP-2 urychluje proces uzdravení uzavřené fraktury u malých zvířat, jako jsou krysy a králíci (Arosarena et al., 2005; Carneiro et al., 2007; Issa et al., 2008).

Rekombinantní lidský BMP-2 (rhBMP-2) také vykazoval kladný vliv na regeneraci chrupavkové tkáně, zejména hyalinní chrupavku podrobenou mikroprasklinám, a to zavedením mesenchymálních kmenových buněk do chondrocytů (Yang et al., 2011), a spinálními zákroky zahrnujícími artrodézi, pomáhající uzavření kostní vady vytvořené na páteři (Hamilton et al., 2011). Byla nicméně také uváděna nižší účinnost i větších vad z důvodu obtíží uchování v místě hojení (Seeherman et al., 2004).

Alveolex, ústní přípravek na bázi propolisu (Propolis 10%, jodoform 5%, včelí vosk, zahušťovadlo), je látka obecně ve stomatologické praxi používaná, a používá se pro urychlení uzdravování dutiny ústní po extrakci zubu, aby nedocházelo k zánětu alveolu a ke snížení pooperační bolesti. Nyní existuje několik studií, které ukazují, že propolis, látka vyráběná včelami z květů, je silnou antimikrobiální fungicidní antioxidační a protizánětlivou látkou (Kano et al., 2008). Tento přípravek obsahuje

aminokyseliny, flavonoidy, terpeny, a deriváty kyseliny skořicové (Sforzin, 2007). Obecně je propolis tvořen z 50% pryskyřicí a rostlinným balzámem, 30% vosku, 10% esenciálních a vonných olejů, 5% polenu, a 5% různých dalších látek včetně organických zbytků v závislosti na místě a času sběru.

Korespondence: Prof. Dr. Vinicius Pedrazzi, Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto - Universidade de Sao Paulo, Av. Cafe S/N, CEP: 14040-904, Ribeirao Preto, Silo Paulo, Brazílie.

E-mail: pedrazzi@forp.usp.br

Přijato 7. února 2011; schváleno v revidované formě 23. března 2011

DOI 10.1002/jemt.21019

Zveřejněno online 26. května 2011 v online knihovně Wiley (wileyonlinelibrary.com).

Ve stomatologii bylo použití propolisu navrženo v mnoha oblastech, včetně kariologie (Parolia et al., 2010), ústní chirurgie (Casaroto et al., 2010), endodontického ošetření (Valera et al., 2010), ústní patologie (Santos et al., 2008), a nauce o ozubici (Gulinelli et al., 2008).

S ohledem na klady dosažené při zkoumání použití propolisu a s ohledem na to, že v aktuální literatuře chybí nebo jsou jen málo informace o vlivu propolisu na kostní reparace, je cílem této studie posoudit histomorfometricky vliv přípravku Alveolex, v kombinaci s nebo bez rhBMP-2, na uzdravení kritických kostních vad vytvořených v lebce kryš Wistar.

MATERIÁLY A METODY

Tato náhodně uspořádaná studie vyšla z požadavků Etického výboru o Použití zvířat pro experimenty na Univerzitě v Sao Paulo, Brazílii. Všechna zvířata byla klinicky kontrolována každý den po zákroku až do jejich obětování.

Látky

Rekombinantní lidský kostní morfogenetický protein typu 2 (rhBMP-2), použitý v této studii, byl získán od Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften (Am Hubland, Würzburg, Německo). Tento protein byl rozpuštěn v poměru 1:1 ve fosfátovém pufru při neutrálním pH. Alveolex [Biodinamica, Ibiopora, power ratio (PR), Brazílie] byl nakoupen při komerční prezentaci přímo od distributorů.

Experimentální postupy

Dvacet osm samců kryš Wistar bylo náhodně rozděleno do čtyř skupin po sedmi zvířatech, s váhou 250-300 g při vstupu do studie. Všechna zvířata byla uspána nitrosvalovou injekcí s xylazinem (5 mg/kg) a ketaminem (75 mg/kg, Agibrands do Brasil LTDA- Campinas, Sao Paulo, Brazílie). Na oči byly během zákroku položeny gázové podušky nasáklé fyziologickým slaným roztokem (0,9%), aby nedocházelo k vysušování rohovky. Po trichotomii v hlavové oblasti a aplikaci lokálního jódového antiseptika byla provedena příčná incize na pokožce a podkožní tkáni na zádech zvířete. Kůže se pak posunula na oblast lebky, kde byla provedena incize okostice, aby vznikl přístup k lebeční kosti. Byla provedena kritická kostní vada o 5 mm šířky v levé zadní oblasti (lebeční kost) pomocí trepanu s nástavcem s proti-úhlovou hlavicí (Kavo, Sao Paulo, Brazílie) namontovanou na elektrickém vsazeném motoru (fyziologický slaný roztok).

Zvířata byla náhodně rozdělena do čtyř experimentálních skupin podle typu materiálu použitého pro vyplnění vzniklé kostní vady: skupina I (n = 7; vady vyplněné rhBMP-2+Alveolex); skupina II (n = 7; vady vyplněné rhBMP-2); skupina III (Kontrolní-Koagulát, n = 7; vady vyplněné koagulátem); a skupina IV (n = 7; vady vyplněné Alveolex).

Doba hojení a obětování zvířat

Po zaplnění vad byla tkáň saturována po chirurgickém zásahu na pokožce zvířete a okostice vrácena do původní polohy. Sutura byla provedena pomocí hedvábného vlákna 4,0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Sao Jose: dos Campos, SP, Brazílie). Chirurgické zranění bylo doplněno přiléhající svalovou tkání, umožňující, aby použité látky zůstaly na kostní vadě bez nutnosti použít jiné přístroje. Po zákroku byla zvířata uchovávána v boxech s jídlem a vodou dostupnou dle libosti, s cyklem světla a tmy 12 hod/12 hod a při teplotě 25°C. Každému zvířeti byla aplikována injekce s 0,1 mL/100 g váhy veterinárních pentabiotik pro zvířata malé velikosti (Fort Dodge®, Campinas, SP, Brazílie) a nitrosvalová injekce s Banaminem (Flunixin Megumine, 0,5 mg v 0,1 ml, NLS Animal Health) jako analgetikum.

Po 30 dnech od vytvoření kritické kostní vady byla zvířata uspána pomocí 37,5% uretanu (s 1,5

g/Kg na tělesnou hmotnost). Zvířatům byl napřed aplikován přes levou komoru 0,1M fosfátového pufru (PBS) při pH = 7.4. Poté, po infuzi 200 ml PBS následoval 4% paraformaldehydový roztok v PBS. Perfuze byla provedena za pomoci infuzní pumpy (550 T2 Samtronic, Brazílie).

Vzorky lebky byly odebrány po perfuzi a z kosti byla pečlivě odstraněna měkká tkáň. Tyto fragmenty byly ponořeny do perfuzního fixačního roztoku na dobu 24 hodin a pak dekalifikovány pomocí 0,5M EDTA s výměnou roztoku co 2 dny. Po dekalifikaci, která trvala od 15 do 30 dnů, byl účinek kyseliny neutralizován po 24 hodinách v 5% roztoku síranu sodného. Tkáně byly dehydratovány pomocí postupné expozice etanolu: 70% (přes noc), 80%, 85%, 90%, 95%, a 100% (2 hodiny v každé z koncentrací). Kostní bloky byly ponořeny stejným dílem do alkoholu a xylolu (přes noc) a vyčištěny xylem, s výměnou třikrát co 2 hodiny. Posléze byly všechny bloky uloženy do parafínu. Bylo provedeno deset semisériových řezů o šířce 6 μ m v každém vzorku a označeno hematoxylin-eozínem pro další analýzy pod světelným mikroskopem.

Histomorfometrický rozbor

Byly pozorovány histologické řezy kritické kostní vady pomocí mřížky obsahující 100 stejně vzdálených bodů v každém analyzovaném poli, upravené podle oka světelného mikroskopu (Leica DMRB, Německo) a zapojeného na digitální fotoaparát (Olympus DP11). Procento nově vytvořené kosti bylo měřeno pomocí diferenční bodové metody (Weibel et al., 1966). Bylo analyzováno deset řezů z každé vady.

Statistická analýza

Všechna kvantitativní data byla vyjádřena jako průměry (\pm SD) a byla analyzována v opakovaném rozboru měření odchylek (ANOVA). Závažnost rozdílů mezi skupinami u každého druhu byla šetřena pomocí zkoušky Kruskal-Wallis, po které následovalo vícenásobné porovnávání se zkouškou posthoc Dunn. Rozdíly byly posouzeny jako závažné, kde $P < 0,05$. Pro rozbor dat byl použit statistický software NCSS 2007 (NCSS, Kaysville).

VÝSLEDKY

Kvantitativní analýza

Všechna data zjištěná v této studii jsou zobrazena na obrázku 1. Skupina I (rhBMP-21 Alveolex) a skupina II (rhBMP-2) vykazovaly vyšší úroveň nově vytvořené kosti než jiné skupiny, $20,28 \pm 7,84$ a $17,90 \pm 6,82$, respektive, ($P < 0,001$). Nebyl zjištěn žádný výrazný rozdíl mezi skupinami I a II ($P > 0,05$). Dále, nebyl zjištěn žádný výrazný rozdíl mezi skupinami III (Kontrolní-Koagulát; $10,20 \pm 5,09$) a IV (Alveolex; $11,45 \pm 5,04$; $P > 0,05$).

Kvalitativní histologický rozbor

Skupina I (rhBMP-2+Alveolex)

Po 30 dnech od zákroku kritická kostní vada vykazuje bohatou síť trabekulární kosti a pojivové tkáně okolo velké oblasti amorfního obsahu (Obr. 2A, 3A, a 3B). Ve většině případů byla regenerace kosti odpovědná za úplné uzavření chirurgické vady. Vzhled trabekulární kosti vykazoval mnoho osteocytů a jejich povrch vypadal jako pokrytý osteoblasty. (Obr. 3A a 3B). Pojivová tkáň nacházející se mezi kostním trávěm a středem některých chirurgických poranění vykazovala menší množství kolagenových vláken, fibroblastů, a velké množství makrofágů a multinukleární buňky, zejména v blízkosti zbytků přípravku Alveolex (Obr. 3A a 3B).

Skupina II (rhBMP-2)

Ve skupině II vypadaly chirurgické vady jako téměř vyplněné novou kostí po 30 dnech od vyplnění kritické vady. Ve většině případů byla regenerace kosti úplná (obr. 2B). Nově vytvořená kost vykazovala jemnou síť trabekulární kosti s roztroušenými morkovými oblastmi a velkou dobře uspořádanou pojivovou tkání s velkým množstvím kolagenových vláken, fibroblastů, a některých cév (obr. 3C a 3D).

Skupina III (Kontrolní-koagulát)

Po 30 dnech byla téměř celá kritická kostní vada pokryta pojivovou tkání tvořenou velkým množstvím svazků kolagenových vláken směřovaných paralelně k povrchu chirurgické oblasti a menším množstvím fibroblastů, cév, a vzácně se vyskytujícími zánětlivými buňkami (obr. 2C, 3E, a 3F). Tenká vrstva nové kostní tkáně obklopená osteoblasty byla omezena na okraje kritické kostní vady (obr. 2C).

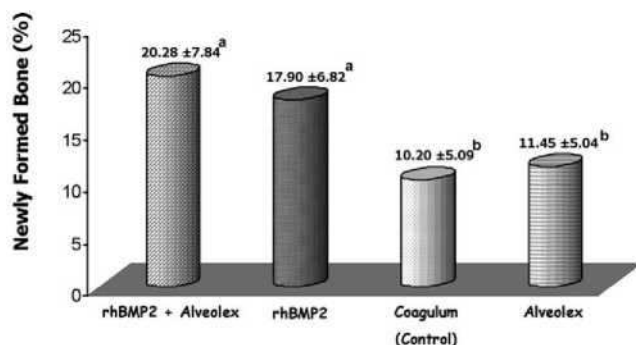
Skupina IV (Alveolex)

Ve skupině IV, po 30 dnech, bylo jizvovité místo pokryto pojivovou tkání s velkým obsahem kolagenových vláken, fibroblastů, makrofágů, a multinukleárních buněk obklopujících zbytky přípravku Alveolex (obr. 2D, 3G, a 3H). Okraje kostní vady vykazovaly tenkou vrstvu kostní tkáně, podobné té,

kteřá byla ve skupině I (obr. 2D a 3H).

DISKUZE

Předchozí studie byly provedeny s cílem urychlit proces uzdravování kosti nebo snížit čas nutný pro kostní reparaci (Shen et al., 2010). Tyto studie zahrnují použití růstových faktorů, hormonů, biomateriálů, chemických látek nebo jejich kombinací. Osteoinduktivní potenciál rhBMP-2 u urychlení kostní reparace byl již dříve v literatuře uveden (Issa et al., 2008, 2009, 2010). Tento protein patří do velké skupiny proteinů, které mají různé role;



Obr. 1. Procento nově vytvořené kosti (průměr, \pm SD) v zóně kritické vady lebky u skupiny I (rhBMP-21 Alveolex), II (rhBMP-2), III (Kontrolní-Koagulát), a IV (Alveolex), 30 dnů po zákroku. Odlišná písmena znamenají značné rozdíly mezi skupinami podle zkoušky Kruskal-Wallis, po které následovalo vícenásobné porovnávání se zkouškou posthoc Dunn; $P < 0,05$.

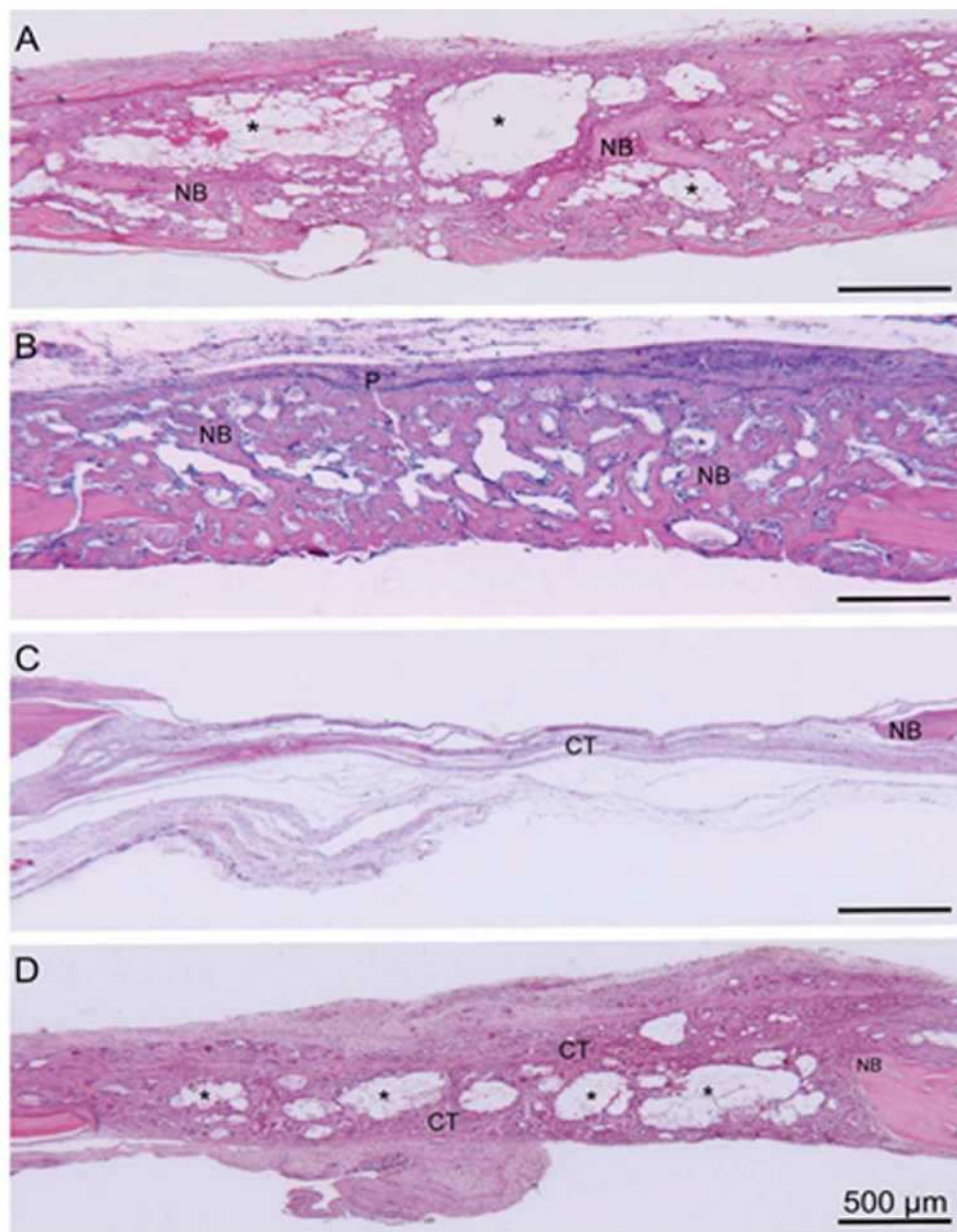
zejména u BMP-2 jeho aktivita souvisí s regulací tvorby kosti a chrupavky pomocí osteoblastové stimulace osteoprogenitorových buněk. Lze rozeznat reparativní účinek rhBMP-2, a takto lze tento protein použít ve stomatologii, s cílem obnovit alveolární hřeben, a také pomoci při osteointegraci implantátů, a u fraktur s rozsáhlou ztrátou tkáně, má také kladný účinek na tvorbu reparativního dentinu (Goncalves 1998).

Většina těchto studií využívala krysy jako experimentální model, hlavně z důvodu vysoké metabolické aktivity těchto zvířat ve srovnání s lidmi. Ukázalo se, že propolis má stimulační účinek na tvorbu a inhibiční účinky při resorpci v kostní tkáni. Některé složky propolisu, jako taniny, flavonoidy, a esenciální oleje jsou spojovány s farmakologickými vlastnostmi (Toker et al., 2008). Tato studie byla provedena s cílem posoudit vliv propolisu, v kombinaci či nikoli s rhBMP-2, na uzdravování kosti lebeční u krys. Existovala domněnka, že by Alveolex mohl uspišit kostní reparaci.

V rozboru nově vzniklé kosti vykázal rhBMP-2 a jeho spojení s Alveolex (propolisem) nejlepší výsledky u kostní reparace. Když byl Alveolex použit samostatně u kostní vady, byl pozorován nižší průměr kostní tkáně bez zásadního rozdílu v porovnání s kontrolní skupinou (koagulát).

Nejlepší výsledky získané u skupiny rhBMP-2 byly očekávány, protože jeho potenciál jako kostního stimulantu je široce v literatuře popsán (Issa et al., 2008, 2009, 2010; Wang et al., 2011). Byly pozorovány vyšší úrovně tvorby kosti u skupiny, kde se rhBMP-2 spojil s Alveolex, a mohou souviset s účinkem propolisu jako inhibitory jak tvorby, tak zrání osteoklast. Některé výzkumy předpokládají, že je propolis schopen vyvolat histologické změny související s inhibicí osteoklastogeneze a aktivitu osteoklastů v kostní tkáni (Pileggi et al., 2009). Je známo, že reabsorpce kosti většinou souvisí s výskytem osteoklastů a makrofágů. Naše údaje tedy vedou k tomu, že spojení propolisu a rhBMP-2 může inhibovat některé aspekty cesty vedoucí ze zrání a aktivaci osteoklastů. Dále toto spojení může jakkoli stimulovat osteoblastové buňky.

ALVEOLEX PŘI OBNOVĚ KOSTNÍCH VAD



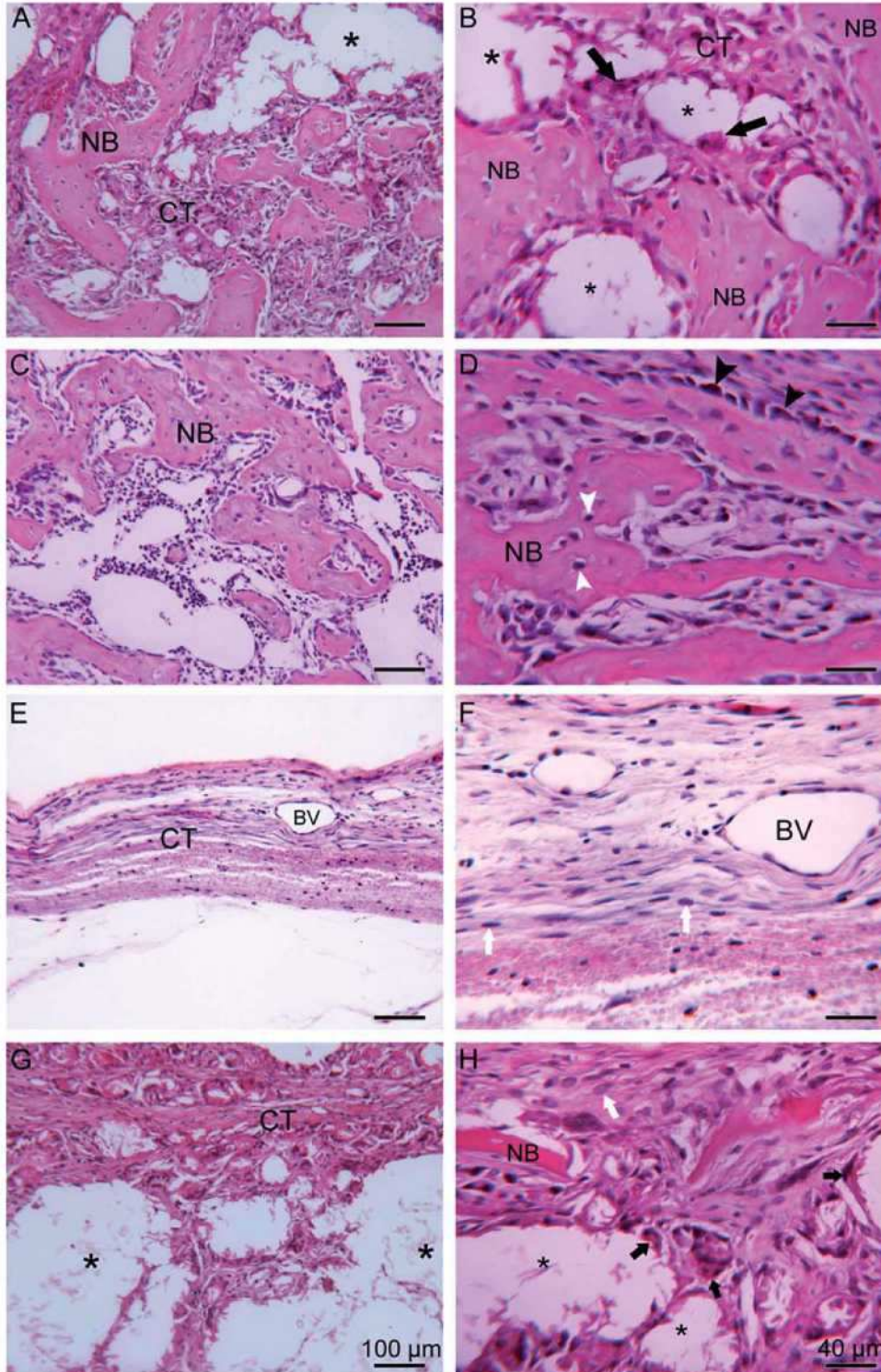
Obr. 2. Fotografie z fotomikrografie ukazující celý rozsah kritické kostní vady A: Skupina I (rhBMP-2+Alveolex) vykazuje kostní vadu zcela vyplněnou nově vytvořenou kostí (NB), a rozsáhlé kavity obsahující zbytky přípravku Alveolex (hvězdičky). B: Skupina II (rhBMP-2) vykazuje úplné uzavření kritické kostní vady kostní tkání (NB) a úplnou obnovu okostice (P). C: Skupina III (Kontrolní-koagulát) vykazuje malé množství nově vytvořené kosti (NB) podél okrajů chirurgické vady a ve středu vyplněnou pojivovou tkání (CT). D: Skupina IV (Alveolex) ukazuje malé množství nově vytvořené kosti (NB) podél okrajů chirurgické vady a střed vyplněn pojivovou tkání (CT), zahrnující místa před tím vyplněná zbytky přípravku Alveolex (hvězdičky). Velikost měřítka: 500 pm (všechny obrázky jsou ve stejném zvětšení). [barevné obrázky lze prohlížet v online vydání, které je k dispozici na wileyonlinelibrary.com.]

Podobné údaje uváděli Toker et al. (2008). Zkoumali vliv propolisu na ztrátu alveolární kosti po vyvolané periodontitidě u krys a pozorovali pokles osteoklastu u všech krys po předepsání propolisu. Naopak, značně vzrostla osteoblastová aktivita a snížila se ztráta alveolární kosti. Podobně i Ivanovska et al. (1995) ukázali, že etanolový extrakt z propolisu urychloval kostní procesy při obnově kostní tkáně v porovnání s kontrolní skupinou. Nicméně by se měly provést další studie, aby se tato

hypotéza objasnila.

Další zdůvodnění pro získaná data lze spojovat s mechanickými podmínkami. Složení přípravku Alveolex, hlavně založené na pryskyřici (50% v/w) a vosku (30% v/w), může urychlovat rhBMP-2 při hojení kostních vad. V tomto kontextu by mohl Alveolex fungovat jako zásobárna poskytující průběžné zásobování zasažené oblasti.

N.T. PEREIRA ET AL.



Obr. 3. Fotografie z fotomikrografie s velkým zvětšením ukazují střed kritické kostní vady. A, B: Skupina I (rhBMP-2+Alveolex), zde je možné pozorovat hustou síť trabekulární nově vzniklé kosti (NB), která zahrnuje pojivovou tkáň (CT) bohatou na fagocytické buňky (černé šipky) a velké kavity před tím vyplněné přípravkem Alveolex (hvězdičky). C, D: Skupina II (rhBMP-2) zde je možné

pozorovat síť tvořenou trabekulární novou kostí (NB), s osteocyty (bílé šipky) a osteoblasty (černé šipky), vedle pojivové tkáně a širokých medulárních dutin. E, F: Skupina III (Kontrolní) s velkým množstvím kolagenových vláken směřovaných paralelně k povrchu poranění a přítomností menšího množství fibroblastů (bílé šipky), cév (BV), a zřídka zánětlivých buněk. G, H: Skupina IV (Alveolex) vykazuje mnoho míst, které před tím obsahovaly zbytky přípravku Alveolex (hvězdičky), ohraničených pojivovou tkání (CT) bohatou na fibroblasty a makrofágy, zejména multinukleární buňky (černé šipky). Velikost měřítko vpravo a vlevo je 100 a 40 pm, respektive. [barevné obrázky lze prohlížet v online vydání, které je k dispozici na wileyonlinelibrary.com.]

To by mohlo vysvětlovat vyšší úroveň tvorby u skupiny rhBMP-2 plus přípravek Alveolex oproti skupině se samotným Alveolex.

S ohledem na to, že přípravek Alveolex použitý spolu s rhBMP-2 v této experimentální studii vedl k nejlepšímu restorativnímu účinku podle histomorfometrických metod, otevírají se možnosti pro klinické použití, jako je tomu u samotného rhBMP-2 v maxilofaciální a ortopedické chirurgii, s výrazným osteoinduktivním účinkem.

V související literatuře byla uvedena drobná informace o vlivu propolisu na morfologii a funkci kostních buněk. Dále, chemické složení této látky se musí prozkoumat, zda závisí na rostlinách, z kterých je sebrána, a následně se mění její protizánětlivý a analgetický účinek. Měly by se provést další řízené studie ohledně objasnění této otázky.

S ohledem na tuto experimentální studii byl přípravek Alveolex účinný při vyplnění kritických kostních vad a skupiny, které obsahovaly použití rhBMP-2 vykázaly lepší proces uzdravení kosti.

REFERENCE

- Arosarena O, Collins W. 2005. Comparison of BMP-2 and -4 for rat mandibular bone regeneration at various doses. *Orthod Craniofac Res* 8:267-276.
- Carneiro E, Garcia RB, Oliveira RC, Moraes FG, Menezes R, Letra A, Canova GC, Cestari TM, Granjeiro JM. 2005. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. *J Appl Oral Sci* 13:157-162.
- Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RK, Moreschi E, Victorino FR, Steffens VA, Bersani-Amado CA. 2010. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. *Dent Traumatol* 26:323-331.
- Chung YI, Ahn KM, Jeon SH, Lee SY, Lee JH, Tae G. 2007. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. *J Control Release* 121:91-99.
- Goncalves EAL, Guimaraes SAC, Garcia RB. 1988. Bone morphogenetic proteins: Molecular approaches to tissue repair. *Rev Odontol Univ Sao Paulo* 12:299-304.
- Gulinelli JL, Panzarini SR, Fattah CM, Poi WR, Sonoda CK, Negri MR, Saito CT. 2008. Effect of root surface treatment with propolis and fluoride in delayed tooth replantation in rats. *Dent Traumatol* 24:651-657.
- Hamilton DK, Smith JS, Reames DL, Williams BJ, Chernavsky DR, Shaffrey CI. Safety, efficacy, and dosing of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) for posterior cervical and cervico-thoracic instrumented fusion with a minimum two-year follow-up. *Neurosurgery*, in press.
- Issa JP, do Nascimento C, Bentley MV, Del Bel EA, Iyomasa MM, Sebald W, de Albuquerque Junior RF. 2008. Bone repair in rat mandible by rhBMP-2 associated with two carriers. *Micron* 39:373-379.
- Issa JPM, do Nascimento C, Lamano-Carvalho TL, Iyomasa MM, Sebald W, Albuquerque Junior RF. 2009. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in the acute distraction osteogenesis. *Clin Oral Implants Res* 20:1286-1292.
- Issa JPM, Defino HLA, Coutinho Netto J, Volpon JB, Regalo SCH, Siessere S, Tioffi R. 2010. Evaluation of rhBMP-2 and Natural Latex as Potential Osteogenic Proteins in Critical Size Defects by Histomorphometric Methods. *Anatom Rec (Hoboken)* 293:794-801.
- Ivanovska ND, Dimov VB, Bankova VS, Popov SS. 1995. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity in vivo. *J Ethnopharmacol* 47:145-147.
- Kano Y, Horie N, Doi S, Aramaki F, Maeda H, Hiragami F, Kawamura K, Motoda H, Koike Y, Akiyama J, Eguchi S, Hashimoto K. 2008. Artepillin C derived from propolis induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via ERK and p38 MAPK pathways. *Neurochem Res* 33:1795-1803.
- Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI. 2006. Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J Bone Miner Metab* 24:95-99.
- Lindhe J, Meyle J, Skupina D of European Workshop on Periodontology. 2008. Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*

35:282-285.

- Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. 2004. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 58:197-208.
- Parolia A, Kundabala M, Rao NN, Acharya SR, Agrawal P, Mohan M, Thomas M. 2010. A comparative histological analysis of human pulp following direct pulp capping with Propolis, mineral trioxide aggregate and Dycal. *Aust Dent J* 55:59-64.
- Pileggi R, Antony K, Johnson K, Zuo J, Holliday LS. 2009. Propolis inhibits osteoclast maturation. *Dent traumatol* 25:584-588.
- Santos VR, Gomes RT, de Mesquita RA, de Moura MD, Franca EC, de Aguiar EG, Naves MD, Abreu JA, Abreu SR. 2008. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: A pilot study. *Phytother Res* 22:1544-1547.
- Seeherman HJ, Boussein M, Kim H, Li R, Li XJ, Aiolo M, Wozney JM. 2004. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model. *J Bone Joint Surg Am* 86:1961-1972.
- Sforzin JM. 2007. Propolis and the immune system: A review. *J Ethnopharmacol* 113:1-14.
- Shen W, Chen X, Chen J, Yin Z, Heng BC, Chen W, Ouyang HW. 2010. The effect of incorporation of exogenous stromal cell-derived factor-1 alpha within a knitted silk-collagen sponge scaffold on tendon regeneration. *Biomaterials* 31:7239-7249.
- Toker H, Ozan F, Ozer H, Ozdemir H, Eren K, Yeler H. 2008. A morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 79:1089-1094.
- Valera MC, da Rosa JA, Maekawa LE, de Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. 2010. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110:70-74.
- Wang L, Zou D, Zhang S, Zhao J, Pan K, Huang Y. 2011. Repair of bone defects around dental implants with bone morphogenetic protein/fibroblast growth factor-loaded porous calcium phosphate cement: A pilot study in a canine model. *Clin Oral Implants Res* 22:173-181.
- Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 30:23-38.
- Yang HS, La WG, Bhang SH, Kim HJ, Im G, Lee H, Park JH, Kim BS. Hyaline cartilage regeneration by combined therapy of microfracture and long-term BMP-2 delivery. *Tissue Eng Part A*, in press.