

Eloá Rodrigues Luvizuto

O EFEITO DA BMP-2 SOBRE AS PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS DO BETA-
TRICÁLCIO FOSFATO EM DEFEITOS DE CALVÁRIA DE RATOS.

Araçatuba - 2011

Eloá Rodrigues Luvizuto

O EFEITO DA BMP-2 SOBRE AS PROPRIEDADES OSTEOCONDUTORAS DO BETA-TRICÁLCIO FOSFATO EM DEFEITOS DE CALVÁRIA DE RATOS.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Câmpus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do
Grau de “Doutora em Odontologia” – Área de
Concentração Clínica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto.

Araçatuba - 2011

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por me proporcionar paz interior, perseverança, fé, alegria e saúde.

Aos meus pais **José Clineu Luvizuto** e **Maria Aparecida Rodrigues Luvizuto**, à minha irmã **Gisele Cristina Rodrigues Luvizuto**, ao meu irmão **Giovani Rodrigues Luvizuto**, aos meus sobrinhos **Rodrigo Luvizuto Gutierrez** e **Bernardo Luvizuto Gutierrez**, ao meu cunhado **Jorge Barbosa Gutierrez**, aos meus avós: **Izídio Luvizuto** e **Luizia Mestriner Luvizuto**, **João Rodrigues da Costa** “in memoriam” e **Helena Lazarini Rodrigues** “in memoriam” pelo amor incondicional, confiança, dedicação, apoio e inspiração para minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora Profa. Dra. **Roberta Okamoto** pelos ensinamentos durante toda essa jornada, dividindo experiências e oportunidades únicas. Sempre acreditando e investindo em mim, sempre bem disposta a aceitar e complementar minhas idéias dando total liberdade para que eu possa desenvolvê-las. Obrigada pelas experiências e oportunidades únicas, pela alegria, entusiasmo e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. **Tetuo Okamoto** pela disponibilidade de sempre nos ajudar em tudo que é preciso, pela competência como ser humano, professor e pesquisador, pela filha brilhante que tem, pelo carinho, simpatia e amizade. Por toda a sua contribuição científica.

Ao Prof. Dr. **Reinhard Gruber**, excelente pesquisador e ser humano, por fazer realidade algo tanto desejado, por me disponibilizar todos seus conhecimentos na área da pesquisa, cultura e filosofia de vida. Pela oportunidade única que tive de participar de alguns de alguns de seus projetos de pesquisa e colocando-se disposto a sempre me ajudar.

Aos Prof(s). Dr(s). da Disciplina de Clínica Integrada da FOA-UNESP: **Wilson Roberto Poi, Sônia Regina Panzarini Barioni, Celso Koogi Sonoda, Daniela Atili Brandini, Denise Pedrini Ostini, José Carlos Monteiro de Castro** pela amizade, harmonia de trabalho compartilhando conhecimentos e filosofias. Por toda ajuda e apoio. Pela minha formação profissional durante a graduação e durante todos esses anos de pós-graduação. Obrigada por tudo. É um grande prazer poder trabalhar com pessoas tão especiais e inteligentes.

Ao Prof. Dr. **Idelmo Rangel Garcia Júnior** pelos conhecimentos clínicos divididos, oportunidades, dedicação e paciência.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, na pessoa do seu Diretor, Prof.Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé pela oportunidade de realização do curso de graduação, mestrado e doutorado em odontologia.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa e pela bolsa de doutoramento.

À **Universidade de Medicina de Viena** (Medizinische Universität Wien – MUW) pela oportunidade oferecida para realização da extensão do meu curso de doutorado junto ao departamento de cirurgia oral da faculdade de odontologia de Viena - Áustria.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. da Disciplina de Ciências Básicas: **Rita Cássia Menegati Dornelles** pela orientação em meu trabalho de exame geral de qualificação do curso de doutorado.

Aos Prof(s). Dr(s). da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da FOA-UNESP: **Alessandra Marcondes Aranega, Michel Saad Neto, Oswaldo Magro Filho, Ana Paula Bassi, Daniela Ponzoni.**

Aos colegas Prof(s). Dr(s). **Ana Paula Faloni, Eduardo Hochuli, Daniele Botticelli.**

À colega **Tânia Madrid** pela amizade e todo empenho em me ajudar nas difíceis escolhas da vida.

Aos colegas: **Beatriz Oliveira Marques, Carolina Perruzzi, Cristiane Chiantelli Cláudio, Giovana Cyrillo, Maria Fernanda Marques, Milena de Oliveira Xavier, Paola Cicarelli, Mariana Matos, Renata Marques e Marcelo Oliveira** pela amizade.

Às colegas da graduação: **Ana Paula Ayala de Macedo, Camyla Alle e Eliana Rodrigues.**

Às estagiárias: **Paula Trevolin, Vanessa Ferreira da Silva.**

À colega de especialização em periodontia: **Ana Lúcia Roselino.**

Às colegas de mestrado e doutorado em Clínica Integrada: **Célia Tomiko Matida Hamata Saito, Cláudia Letícia Vendrame dos Santos, Carolina Lunardelli Trevisan, Lithiene Ribeiro Castilho, Luciene Campoli Alves, Elizane Ferreira Hamanaka, Fernanda Serra.**

Aos colegas de mestrado e doutorado em Cirurgia: **Abraão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho, Carolina Chiantelli Cláudio Coutinho, Eduardo F. S. Faco, Flávia Priscila Pereira, Francisley Ávila Souza, Jéssica Lemos Gulinelli, Marcos Heidy Guskuma, Paulo Esteves Pinto Faria, Rodolfo Valentini Neto, Thallita Pereira Queiroz, Heloisa Fonseca**

Marão, Fernando Gastaldi, Leonardo Perez Favelani, Lamis Meorin Nogueira, Gabriel Ramalho Ferreira.

Aos colegas de mestrado e doutorado em Prótese: **Amílcar Chagas Freitas Júnior, Érica Alves Gomes, Érika Oliveira de Almeida e Valentim Adelino Ricardo Barão.**

À colega de doutorado em pediatria: **Nátalia Marique Cursino.**

À colega de mestrado em periodontia: **Nátalia Campos.**

À funcionária **Cleide Lemes da Silva** pelo carinho e alegria.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada: **Antônia Ferreira Artioli, Aparecida Leontina Baiochi de Carvalho, Bernadete Rodrigues Inácio, Claudiomiro Pereira, Dirce C. Boato, Gilmar Martins de Oliveira e Paulo Roberto Gratão.**

Aos Profs. Drs. da faculdade de odontologia de Viena/Áustria: **Georg Watzek, Hanns Plenck, Stefan Tangl, Ulrike Kuchler.**

Aos funcionários do Instituto Ludwig Boltzmann de Viena/Áustria: Prof. **Gerald Zanoni**, Profa. Dra. **Alexandra Meinl**, Prof. Dr. **Heinz Redl.**

Aos colegas: **Carina Auzinger, Andrea Tiscler, Elisabeth Gruber, Manuela Pensch, Patrick Heimel, Petra Pokorny, Toni Dobsak, Prof. Dr. Herman Agis, Karoline Reich, Michael Sandholzer, Christian Schuh, Katharina Singer.**

À minha prima **Vania Mestriner** e sua família.

Epígrafe

"O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente"
Texto Zen-Budista

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1</i> - Imagens da micro-CT dos defeitos em calvária de ratos tratados e não tratados.	34
<i>Figura 1 suplemento</i> - Análise quantitativa de micro-CT dos defeitos da calvária de ratos.....	35
<i>Figura 2</i> - Análise quantitativa da micro-CT do total de tecido mineralizado (biomaterial + tecido ósseo neoformado) dos defeitos da calvária de ratos.....	36
<i>Figura 3</i> - Imagens histológicas dos defeitos críticos em calvária de ratos tratados e não tratados.....	37
<i>Figura 4</i> - Análise quantitativa do total de volume de tecido mineralizado (biomaterial + osso neoformado) por unidade de volume de tecido (MV/TV) em defeitos de calvária de ratos.....	38
<i>Figura 5</i> - Análise quantitativa de osso neoformado e biomaterial residual nos defeitos ósseos.....	39
<i>Figura 6</i> - Coloração de fluorescência dos defeitos de calvária de ratos tratados e não tratados.....	40
<i>Figura 7</i> - Coloração de fluorescência em alta resolução nos defeitos ósseos de calvária de ratos tratados com TCP.....	41
<i>Figura 8 suplemento</i> – Imagem histológica em maior aumento do grupo TCP	42

Figura 9 <i>suplemento</i> – Imagens histológicas em maior aumento dos grupos PLA/PGA e PLA/PGA + BMP-2.....	43
Figura 10 <i>suplemento</i> – Imagens histológicas em maior aumento dos grupos CPC e CPC + BMP-2.....	44
Figura 11 <i>suplemento</i> – Imagem histológica em maior aumento do grupo controle sem tratamento.....	45
Figura 12 <i>suplemento</i> – Imagens histológicas em maior aumento do grupo osso autógeno particulado.....	46
Figura 13 <i>suplemento</i> – Imagem histológica em maior aumento do grupo osso autógeno particulado.....	47

LISTA DE SIGLAS

TCP: β - tricálcio fosfato

BMP-2: proteína óssea morfogenética 2

PLA / PGA ou PL/PG: gel de ácido polilático e poliglicólico

CPC: cimento de fosfato de cálcio

μ CT ou micro-CT: micro tomografia computadorizada

pc: peso corporal

ip: intra peritoniana

μ CT DC: Medições bidimensionais da micro-tomografia computadorizada do fechamento do defeito ósseo.

μ CT MV / TV: quantidade do volume de tecidos mineralizados (osso neoformado + biomaterial) por volume total de tecido das micro-tomografias computadorizadas.

MV / TV: Volume de tecido mineralizado (osso neoformado + biomaterial) por volume total de tecido dos cortes histológicos calcificados.

BV: volume de osso neoformado

BV / TV: volume de osso neoformado por volume total de tecido

SV ou SBV ou SVB: volume de substituto ósseo (volume de biomaterial)

SV / TV ou SBV/TV ou SVB/TV: volume de substituto ósseo (volume de biomaterial) por volume total de tecido

LISTA DE SÍMBOLOS

kg – quilograma

mg – miligrama

μl - microlitro

μm – micrômetro

μg - micrograma

ml - mililitro

g - grama

mm - milímetros

mg / kg – miligrama por quilograma

pxl / mm – pixel por milímetro

mm² – milímetros quadrados

SUMÁRIO

Resumo	15
Abstract	16
1. Introdução	17
2. Material e métodos	19
3. Resultados	22
4. Discussão	25
5. Conclusão	28
6. Referências	29
7. Figuras	34
8. Anexos	48

O efeito da BMP-2 sobre as propriedades osteocondutoras do β -tricalcio fosfato em defeitos de calvária de ratos.

Eloá R Luvizuto^{1,4}, Stefan Tangl^{1,2}, Gerald Zanon³, Tetuo Okamoto^{4,5}, Celso K Sonoda⁴, Reinhard Gruber^{1,2}, Roberta Okamoto^{4,5}.

1 Departamento de Cirurgia Oral, Universidade de Medicina de Viena, Áustria

2 Sociedade Austríaca de Regeneração Tecidual, Áustria

3 Instituto Ludwig Boltzmann de Traumatologia Clínica e Experimental, Viena, Áustria

4 Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Brasil

5 Departamento de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade do Sagrado Coração, Bauru, Brasil

Correspondência:

Roberta Okamoto

Rua José Bonifácio 1193, CEP: 16015-050

Araçatuba-SP

robertaokamoto@usc.br

* Luvizuto ER, et al., The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects, *Biomaterials* (2011), doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.076 (Anexo B).

Resumo: A neoformação óssea em defeitos críticos em calvária de ratos depende fortemente das propriedades osteocondutoras dos enxertos e biomateriais. Ainda é controverso se os biomateriais podem substituir os enxertos de osso autógeno e se a suplementação dos biomateriais com Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs) é necessária para melhorar a formação óssea. Examinamos defeitos críticos em calvária de ratos (5 mm de diâmetro) tratados com β -tricálcio fosfato (TCP; Cerasorb® M), gel de ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA; Fisiograft®) e cimento de fosfato de cálcio (CPC; Norian® CRS®), isoladamente ou na presença de 5 μ g de BMP-2 após 45 dias. Defeitos tratados com enxerto de osso autógeno particulado e defeitos não tratados serviram como controle. A formação óssea foi avaliada com base na análise de μ CT, análise histomorfométrica e análise de fluorescência. Nós relatamos que o TCP apoia a formação óssea de forma mais eficiente do que o enxerto de osso autógeno particulado. A formação óssea na presença de TCP sozinho atingiu um nível máximo de neoformação óssea, enquanto que a suplementação de BMP-2 falhou em melhorar a neoformação óssea. Em contrapartida, não houve diferença significativa na formação óssea quando o PLA / PGA e o CPC foram comparados ao enxerto autógeno. Além disso, a presença de BMP-2 não alterou substancialmente as propriedades osteocondutoras de PLA/PGA ou de CPC. Conclui-se que as propriedades osteocondutoras do TCP são superiores aos dos enxertos autógenos e que o TCP não exige suplementação de BMP-2. Nossos resultados também mostram que a diminuição da capacidade osteocondutora do PLA/PGA e do CPC não podem ser superadas pela suplementação de BMP-2 em defeitos de calvária de ratos.

Palavras-Chaves: Modelo animal; regeneração óssea, BMP (proteína óssea morfogenética); cimento de fosfato de cálcio; ácido polilático; engenharia de tecido ósseo.

Abstract: Bone formation in critical-sized calvaria defects is strongly dependent on the osteoconductive properties of grafts. It remains a matter of controversy whether biomaterials can replace autografts and whether the supplementation of biomaterials with Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) is necessary to enhance bone formation. We examined rat calvaria critical-sized defects (5mm diameter) treated with β -tricalcium phosphate (TCP; Cerasorb® M), polylactic and polyglycolic acid gel (PLA/PGA; Fisiograft®) and calcium phosphate cement (CPC; Norian® CRS®), either alone or in the presence of 5 μ g of BMP-2 after 45 days. Autografts and untreated defects served as controls. Bone formation was evaluated based on μ CT analysis, histomorphometric analysis and fluorescence analysis. We report that TCP supported bone formation more efficiently than did autografts. Bone formation in the presence of TCP alone reached a maximal level, as BMP-2 supplementation failed to enhance bone formation. By contrast, no significant difference in bone formation was observed when PLA/PGA and CPC were compared to autografts. Moreover, the presence of BMP-2 did not substantially change the osteoconductive properties of PLA/PGA or CPC. We conclude that the osteoconductive properties of TCP are superior to those of autografts and that TCP does not require BMP-2 supplementation. Our findings also show that the decreased osteoconductive properties of PLA/PGA and CPC cannot be overcome by BMP-2 supplementation in rat calvaria defects.

Keywords: Animal model; bone regeneration; BMP (bone morphogenetic protein); calcium phosphate cement; polylactic acid; bone tissue engineering.

Introdução

O uso de biomateriais em vez de enxerto ósseo autógeno é uma esperança à muito tempo em cirurgia reconstrutiva [1]. Os biomateriais podem fornecer uma matriz osteocondutora que guia a formação de tecido ósseo no interior do defeito ou da área enxertada. Melhorar as propriedades osteocondutoras dos biomateriais é uma tarefa importante na pesquisa e na indústria de biomateriais. Não é de surpreender que os biomateriais são suplementados com fatores de crescimento para aprimorar o processo de formação óssea e, assim, a consolidação do biomaterial. A principal tarefa, no entanto, reside na criação de um biomaterial com propriedades osteocondutoras favoráveis que são semelhantes ou mesmo superiores aos enxertos ósseos evitando a necessidade da suplementação de fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento, incluindo as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), podem apoiar o processo de formação óssea, no entanto, as preocupações sobre a sua utilização têm sido levantadas. Por exemplo, nem sempre é evidente que exista uma melhora do processo de neoformação óssea que justifique os altos custos do biomaterial e também os possíveis efeitos colaterais da associação de fatores de crescimento aos biomateriais. O FDA aprovou a combinação de BMPs ao colágeno para aplicações ortopédicas [2] e odontológicas [3]. No entanto, as combinações de outros biomateriais com BMPs ainda não foram aprovadas [1, 4-5].

Tentativas iniciais para identificar carreadores apropriados para BMPs foram realizadas com grandes expectativas. Por exemplo, o TCP [6-7], PLA/PGA [8-9] e cimento de fosfato de cálcio [10-11] foram testados devido às suas capacidades de manter as propriedades osteoindutoras da BMP-2 em modelos pré-clínicos. No entanto, as conclusões desses estudos não são convincentes, pois a formação óssea não é necessariamente reforçada pela suplementação de BMP-2 [7, 9, 11-12]. Assim, nem todos os biomateriais suportam as propriedades osteoindutoras

da BMP-2. Atualmente ainda não está claro qual dos três biomateriais disponíveis no mercado (TCP, Cerasorb® M; PLA/PGA; Fisiograft®; CPC, Norian® CRS®) permite a máxima formação óssea e se a sua suplementação com BMP-2 provoca um aumento substancial na neoformação óssea no defeito ósseo.

Os modelos animais têm sido a base de estudo do impacto de biomateriais carregados com BMP-2 na neoformação óssea [13]. Há um consenso de que a prova de estudos deve seguir o princípio da árvore filogenética, começando com modelos roedores [14]. A calota craniana de ratos é exemplar, para uso em modelo de defeitos ósseos de tamanho crítico em que a BMP-2 pode exercer sua capacidade osteoindutora [9, 15-16]. Mesmo que este seja um defeito de modelo ortotópico, as bordas entre o tecido ósseo da calvária e o biomaterial residual prevêm uma situação desafiadora para a neoformação óssea em abranger toda a extensão do defeito. Outra vantagem do modelo de calvária de ratos é a sua reprodutibilidade e a capacidade de avaliar o resultado do estudo com base na análise histomorfométrica de micro tomografia computadorizada (μ CT) e análise histomorfométrica padrão, mantendo a variação interna experimental baixa [14]. Estes argumentos suportam a utilização deste modelo em nosso estudo.

No presente estudo, comparamos as propriedades osteocondutoras do enxerto autógeno particulado e de três biomateriais associados ou não à BMP-2 em defeitos críticos em calvária de ratos por meio de análise histomorfométrica de μ CT, análise histomorfométrica padrão e análise de microscopia de fluorescência.

Material e Métodos

Desenho de estudo e ética

Vinte ratos Wistar (90 dias de idade) foram adquiridos do Centro de Animais da Universidade Estadual Paulista e mantidos a uma temperatura de 22 ° C em um ciclo de 12 horas claro/12-h escuro com livre acesso à água e ração para roedores. Um total de 40 defeitos críticos em calvária (5 mm de diâmetro) foram divididos aleatoriamente em 8 grupos experimentais, com um total de 5 defeitos por grupo experimental (n = 5). Os grupos experimentais foram os seguintes: [1] 500-1000 µm de β - tricálcio fosfato (TCP) (Cerasorb ® M, Curassan Ltd., Alemanha) [2]; TCP acrescido de 5 µg de BMP-2 (R & D Systems, Inc., Minneapolis , MN, EUA) [3]; gel de ácido polilático e poliglicólico (PLA / PGA) (Fisiograft ®, Ghimas SPA, Itália) [4] PLA / PGA associado a BMP-2 [5]; cimento de fosfato de cálcio (CPC) (Norian® SRC®, Craniofaciais Repair System®, Alemanha), e [6] CPC associado a BMP-2. Os outros dois grupos experimentais foram o controle não tratado [7] e o controle enxerto de osso autógeno particulado [8]. O presente estudo respeitou os princípios de cuidados com animais de laboratório e as leis nacionais sobre o uso de animais. O estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual Paulista, Brasil (protocolo n ° 2008-004517).

Procedimentos cirúrgicos e marcações com fluorocromo

Após anestesia geral com xilazina (0,03 ml/100 g de peso corporal [pc] / intraperitoneal [ip]; Dopaser ® Laboratórios Calier SA, Barcelona, Espanha) e ketamina (7 µl / kg pc / ip; Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Brasil), a calvária dos animais foram tricotomizadas e desinfetadas com iodeto de polivinilpirrolidona (Indústria Química e Farmacêutica Rioquímica Ltd, Brasil). Após técnicas de assepsia, foi feita uma incisão através da pele da calota craniana e periósteo, e

retalhos de espessura total foram refletidos. Sob copiosa irrigação com solução salina estéril, dois defeitos ósseos de 5 mm de diâmetro foram preparados com uma broca trefina (3i Implant Innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) em cada animal, um defeito em cada região parietal. Os defeitos foram tratados como descrito acima, posteriormente o periósteo foi reposicionado e suturado com fio de sutura de ácido poliláctico (Vycril 5,0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil). A pele foi suturada com fio de náilon (náilon 5.0, Mononylon, Ethicon). Todos os animais receberam dose única de 20.000 UI de penicilina G benzatina (Pentabiótico, Veterinário Pequeno Porte, a Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, Brasil) por via intramuscular. Os ratos receberam 20 mg / kg de peso corporal de calceína (verde) e alizarina (vermelho) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) nos dias 15 e 30 pós-operatório, respectivamente. Os ratos foram sacrificados por overdose anestésica aos 45 dias após o procedimento cirúrgico.

Processamento das amostras

As partes relevantes das calvárias foram removidas e fixadas em solução neutra tamponada de formalina 4%. As calvárias foram divididas ao meio usando uma serra de alta precisão (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Alemanha). As amostras foram desidratadas em ordem crescente de álcoois e incluídas em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC + BPO, & Co. Kulzer, Hanau, Alemanha). Os blocos foram digitalizados com um sistema de micro tomografia computadorizada - μ CT (vivaCT 75, Scanco Medical AG, Basserdorf, Suíça), 70 mA kV/114 com um tempo de integração de 1x380 ms em alta resolução (pixels = 21x21 μ m). Os blocos foram processados com auxílio do equipamento de corte e polimento Exakt (Exakt Apparatebau) de acordo com método padronizado [17]. Os cortes foram preparados, em paralelo

à sutura sagital e reduzido a uma espessura de cerca de 40 μm , antes de serem corados com corante de Levai-Laczko.

Análise histomorfométrica

As análises foram realizadas a cego. Os cortes corados foram examinados por microscopia de luz (Nikon Microphot-FXA, Nikon, Tóquio, Japão), e as imagens foram obtidas com uma câmera digital (Nikon DXM 1200) juntamente com um palco motorizado (Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co KG, Wetzlar Steindorf, Alemanha). Fotos individuais foram montadas para gerar imagens de toda a extensão histológica (Lucia G 4,71, Laboratório Imaging Ltd, Brno, República Checa) em uma resolução de 890 pxl / mm. A análise foi restrita à área entre as extremidades das duas bordas do defeito ósseo. Baseado em imagens de forma interativa desenhada em cores falsas (Adobe Photoshop, Adobe, San Jose, CA, EUA), o tecido ósseo e os substitutos ósseos foram medidos com software para histomorfometria (Definiens Developer 7, Munique, Alemanha). Medições bidimensionais do fechamento do defeito ($\mu\text{CT DC}$) e medições tridimensionais da quantidade de volume de tecidos mineralizados (osso neoformado + biomaterial) ($\mu\text{CT MV / TV}$) foram calculadas a partir das amostras de μCT . O volume de tecido mineralizado por volume total de tecido (MV / TV), o volume de tecido ósseo neoformado no interior do defeito [volume ósseo (BV), em mm^2 , volume de tecido ósseo neoformado por volume total de tecido (BV / TV)], o volume de substituto ósseo no defeito [volume de substituto ósseo (SV) em mm^2 e volume substituto ósseo por volume de tecido (SV / TV)] foram calculados a partir das amostras histológicas. As análises qualitativas das marcações de fluorocromo foram realizadas com o auxílio de um microscópio de epifluorescência Microphot-FXA Nikon (Nikon, Tokyo, Japan).

Análise Estatística

Os dados foram analisados com comparações múltiplas de médias por contrastes de Tukey. Diferença estatisticamente significativa foi atribuída ao nível de $P < 0,05$.

Resultados

Análise de Micro-CT

Imagens bidimensionais da vista por cima da calvaria fornecem informações sobre o fechamento do defeito ósseo em geral. O fechamento completo do defeito foi observado apenas no grupo β -tricálcio fosfato (TCP) e TCP suplementado com BMP-2. Os grupos de osso autógeno particulado (AG), ácido polilático e poliglicólico (PLA/PGA ou PL/PG) e cimento fosfato de cálcio (CPC) não foi observado fechamento completo do defeito. Além disso, nas amostras em que o PLA/PGA e CPC foram suplementadas com BMP-2, também, não observou fechamento completo do defeito ósseo (Figura 1 e Figura 1 suplemento).

Seguidamente, foi realizada uma análise quantitativa tri-dimensional da quantidade de tecido mineralizado (biomaterial + tecido ósseo neoformado) no defeito ósseo. A análise revelou que o grupo osso autógeno particulado (AG), TCP sozinho, e TCP suplementado com BMP-2 tiveram uma tendência maior para formação de tecido mineralizado do que os grupos PLA/PGA e CPC, mesmo quando suplementados com BMP-2 (Figura 2). Importante, não foram observadas diferenças significativas quando os defeitos apresentam osso autógeno particulado, TCP sozinho ou TCP suplementado com BMP-2 foram comparados entre si. Em geral, estes dados fornecem a primeira evidência de que o TCP sozinho e TCP suplementado com BMP-2 desempenharam semelhante ao enxerto ósseo autógeno.

Análise quantitativa e qualitativa da histologia

Para entender melhor as propriedades osteocondutoras dos biomateriais, as análises histológicas foram realizadas. Como esperado a partir da análise de micro-CT, o local do defeito ósseo originalmente tratado com TCP foi totalmente preenchido por um conglomerado de biomateriais e osso neoformado. Remanescentes de TCP eram visíveis e estavam em íntimo contato com o tecido ósseo. Além disso, no grupo TCP combinado com BMP-2, as observações foram semelhantes. Defeitos que foram preenchidos com PLA/PGA não apresentaram biomaterial residual, apenas um tecido conjuntivo fino fechando o defeito ósseo. Neste grupo, a suplementação com BMP-2 pode ter favorecido a formação óssea, o que foi observado em algumas amostras. CPC também apresentou propriedades osteocondutoras, mas os defeitos não foram totalmente preenchidos por tecido ósseo. A análise histológica também fornece a impressão de que a suplementação com BMP-2 aumentou a degradação do CPC, o que foi confirmado histomorfometricamente. Como esperado, nenhuma formação óssea substancial foi observada nos defeitos do grupo controle (coágulo), enquanto o grupo osso autógeno particulado resultou no fechamento dos defeitos originais (Figura 3).

Exames histomorfométricos mostraram que o volume total de tecido mineralizado (biomaterial + osso neoformado) reflete os resultados da análise de micro-CT 3-dimensional (Figura 4). Novamente, o TCP resultou em maior volume de tecido mineralizado comparado ao grupo PLA / PGA (independente da presença de BMP-2), mas este apresentou quantidade de tecido mineralizado semelhante ao grupo CPC (independente da presença BMP-2) e ao grupo enxerto autógeno particulado. Resultados similares foram observados para o grupo TCP suplementado com BMP-2. Juntos, estes dados sugerem que o TCP apresenta propriedade osteocondutora favorável neste experimento.

O próximo passo foi de distinguir entre tecido ósseo neoformado e biomaterial residual no local do defeito. O grupo TCP apresentou maior volume de tecido ósseo neoformado que os outros grupos (PLA / PGA, CPC, enxerto autógeno particulado e as respectivas combinações com BMP-2). A suplementação com BMP-2 não alterou os valores absolutos (BV) e relativos (BV / TV) da neoformação óssea para todos os biomateriais testados. Eventualmente, uma tendência para um efeito positivo da BMP-2 foi observada com PLA / PGA. Curiosamente, a formação de tecido ósseo neoformado foi semelhante no grupo controle (coágulo – EC) e grupo enxerto ósseo particulado. Assim, o TCP apoia a formação de tecido ósseo neoformado mais eficiente do que os outros biomateriais e mais eficientemente do que o osso autógeno particulado (Figura 5a,b).

Quando se avalia a degradação do biomaterial, um efeito torna-se óbvio, a suplementação do CPC com BMP-2 suporta a degradação do biomaterial, que não foi o caso dos grupos TCP e PLA / PGA. Estes dados sugerem que a BMP-2 não melhorou efetivamente a neoformação óssea, mas aumentou a degradação do CPC (Figura 5c,d).

Coloração por fluorescência

Para compreender o impacto de biomateriais no processo ativo da consolidação do enxerto, a neoformação óssea foi marcada com fluorocromos. De acordo com a análise morfológica, a formação óssea, como indicada pela coloração verde e vermelha, foi evidente e ocorreu ao longo dos defeitos preenchidos com o TCP, independente da presença de BMP-2. Defeitos contendo PLA / PGA apresentaram apenas marcação fraca, que foi congruente com a análise morfológica, e nenhum efeito da suplementação com BMP-2 foi observada. A coloração por fluorescência também ocorreu em defeitos preenchidos com o CPC, mas por inspeção visual,

mais fluorocromo foi incorporado em amostras contendo BMP-2. Além disso, o padrão de coloração indica maior remodelação com BMP-2 do que nos respectivos controles CPC. A distribuição da coloração verde e vermelha indica que a formação óssea ocorreu de forma contínua entre os dias 15 e 30 dias pós-cirúrgicos, independente do biomaterial, porém ocorreu de forma mais eficaz nos grupos TCP e TCP + BMP-2 (Figura 6). Imagens de maior aumento destacam o fato de que os achados histológicos e a os achados da coloração com fluorocromos são congruentes. Estas análises detalhadas fornecem uma visão sobre as propriedades osteocondutoras do TCP e da falta de mudanças visíveis após a adição de BMP-2 (Figura 7).

Discussão

A BMP-2 é considerada um fator osteoindutor que melhora o processo de consolidação do biomaterial. No entanto, a BMP-2 é aplicada com uma esponja de colágeno, que não há propriedade de manutenção de espaço. Assim, novos conceitos focam o processo de mineralização e as propriedades osteocondutoras dos biomateriais para servir como carreadores de BMP-2. No entanto, surgem dúvidas, de qual biomaterial é adequado para servir como carregador da BMP-2 e se a suplementação de biomaterial com BMP-2 oferece uma vantagem substancial para o processo global da consolidação do biomaterial. Este estudo em ratos demonstrou que as propriedades osteocondutoras do TCP ocorreram de forma mais favorável em relação ao PLA / PGA, CPC e ao enxerto de osso autógeno particulado. Além disso, este achado principal foi independente da presença de BMP-2. Especificamente, os resultados do nosso estudo sugerem fortemente que o TCP sozinho induz a completa mineralização dos defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos. Assim, o TCP é um biomaterial eficaz, porque o fechamento completo do defeito ósseo pode ser alcançado aos 45 dias pós-operatórios.

Nossos resultados são importantes porque o TCP desempenhou melhor do que os outros dois biomateriais, assim como do que o enxerto de osso autógeno particulado. Se considerarmos que a coleta do enxerto autógeno está associada com morbidade do sítio doador e tem o inconveniente de quantidades limitadas de material disponível, nossos resultados sugerem que o TCP pode servir como uma alternativa ao enxerto de osso autógeno particulado, pelo menos nas condições experimentais propostas. Nossos resultados também são importantes porque as propriedades osteocondutoras do TCP não foram reforçadas com a adição de BMP-2, um fator de crescimento que é caro e que está associado à efeitos colaterais. Assim, nossos dados sugerem que não é necessário ou mesmo útil fazer a complementação do TCP com BMP-2, nas condições experimentais propostas. Estes dois achados importantes apoiam a afirmação de que nós identificamos um biomaterial disponível, que é aprovado para aplicações clínicas específicas e que promove a neofomação óssea em um local de defeito cirúrgico.

O achado de que o TCP foi melhor que o enxerto de osso autógeno particulado no modelo de calvária de ratos está pelo menos parcialmente de acordo com estudos anteriores da literatura que mostram que o TCP e o enxerto de osso autógeno igualmente apóiam a neoformação óssea [13, 18-20]. Também, a literatura mostra que o TCP associado ao osso autógeno particulado apresentou melhor desempenho que o osso autógeno particulado sozinho [21], suportando a potente propriedade osteocondutora deste biomaterial. Também, a suplementação de BMP-2 ao TCP, na dose utilizada neste estudo (5 μ g) e na dose ainda maior (15 μ g), apresentou resultados semelhantes ao enxerto autógeno [7]. Este achado é consistente com nosso estudo, onde se observou que o TCP associado à BMP-2 não melhora a formação óssea. Apenas TCP carregado com uma dose muito maior de BMP-2 apresentou um aumento satisfatório na formação óssea em relação ao TCP sozinho [6-7, 22]. Além disso, a

suplementação de paratormonio ao TCP não melhora a formação óssea em relação ao TCP sozinho [23].

O CPC por si só não é superior ao enxerto de osso autógeno, que está de acordo com estudos anteriores [24]. Por outro lado, CPC e PLA / PGA carregados com BMP-2 não melhoraram a neoformação óssea, em contraste com estudos anteriores que mostraram melhores resultados após a suplementação com BMP-2, porém, os efeitos observados são dose dependente [08-12]. Estudos anteriores em conjunto com nosso estudo sugerem que o TCP é um biomaterial que pode executar tão bem, ou melhor, do que o enxerto de osso autógeno particulado. A relevância clínica destes resultados é baseada no uso mundial do TCP, do PLA / PGA e do CPC como alternativas ao enxerto autógeno. É provável que as propriedades osteocondutoras desses biomateriais não sejam substancialmente (caso exista) afetadas pelo local do defeito. Este achado sugere que, em um cenário clínico, o TCP pode fornecer favoráveis propriedades de osteocondução. Também, de potencial importância clínica é o fato de que as propriedades osteocondutoras do TCP não puderam ser aprimoradas com a dosagem indicada de BMP-2, sugerindo que não são necessários esforços adicionais para melhorar o parâmetro de evolução clínica da neoformação óssea.

Considerando as limitações deste estudo, estes achados são baseados em um modelo experimental em calvária de ratos, que não representa totalmente todos os defeitos humanos. Mesmo que as calvárias de ratos são de tamanho crítico e as condições para a neoformação óssea são mais severas, o local do defeito é limitado a 5 mm de diâmetro, o qual pode ser menor do que os defeitos que acometem os seres humanos. Além disso, o suprimento vascular e a presença de células osteoprogenitoras são fatores favoráveis da calvária de ratos, que não é o caso em pacientes idosos que apresentam comprometimento da capacidade de regeneração óssea. Assim,

não se pode excluir que a suplementação de TCP e outros biomateriais com BMP-2 podem apresentar um efeito benéfico no processo de consolidação óssea. No nosso modelo experimental a regeneração óssea foi considerada normal. Outra limitação do nosso estudo é o desenho do estudo. Nós selecionamos um período de observação de apenas cinco defeitos por grupo experimental. No entanto, as diferenças entre os grupos foram grandes, permitindo realizar uma análise estatística. As limitações de nosso estudo fornecem uma base para futuros estudos. Baseado em nossos achados, estudos futuros deverão avaliar se o TCP apresenta resultados satisfatórios sem a suplementação de BMP-2 em modelos experimentais com comprometimento da regeneração óssea, por exemplo, os casos de ratas ovariectomizadas, diabetes e os ratos tratados com glicocorticóides. Além disso, os dados sobre a administração da BMP-2 e períodos de observação anterior à 45 dias de pós-operatório pode estender os resultados atuais. Um estudo futuro, também deve determinar as propriedades osteocondutoras do TCP sozinho e com suplementação de BMP-2 em defeitos ósseos maiores, como aqueles que podem ocorrer nos seres humanos.

Conclusão

Os resultados aqui apresentados indicam que a neoformação óssea atingiu um nível máximo quando os defeitos de calvária de ratos foram preenchidos com TCP. Nem PLA / PGA, nem CPC sozinhos e nem os biomateriais na presença de 5µg de BMP-2 puderam melhorar os resultados observados com o TCP sozinho. Novos estudos devem ser realizados com o TCP para desvendar o potencial osteocondutor deste biomaterial na regeneração óssea.

Agradecimentos

Os autores agradecem Patrick Heimele por seus cálculos com base no software Definiens Developer. Petra Pokorny pelo apoio estatístico, Toni Dobsak pelo apoio às ilustrações, o Dr. Georg Watzek e o Dr. Hanns Plenk. Esta pesquisa recebeu auxílio da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), número do projeto 2008/10516-6.

Referências

- [1] Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett.* 2009;31:1817-24.
- [2] Axelrad TW, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20:481-8.
- [3] Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK, et al. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:1947-60.
- [4] Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol Lett.* 2009;31:1825-35.
- [5] Issa JP, Bentley MV, Iyomasa MM, Sebald W, De Albuquerque RF. Sustained release carriers used to delivery bone morphogenetic proteins in the bone healing process. *Anat Histol Embryol.* 2008;37:181-7.

- [6] Sohier J, Daculsi G, Sourice S, de Groot K, Layrolle P. Porous beta tricalcium phosphate scaffolds used as a BMP-2 delivery system for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92:1105-14.
- [7] Dohzono S, Imai Y, Nakamura H, Wakitani S, Takaoka K. Successful spinal fusion by E. coli-derived BMP-2- adsorbed porous beta-TCP granules: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467:3206-12.
- [8] Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res*. 1988:257-65.
- [9] Schliephake H, Weich HA, Dullin C, Gruber R, Frahse S. Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid--an experimental study in rats. *Biomaterials*. 2008;29:103-10.
- [10] Bai B, Yin Z, Xu Q, Lew M, Chen Y, Ye J, et al. Histological changes of an injectable rhBMP-2/calcium phosphate cement in vertebroplasty of rhesus monkey. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34:1887-92.
- [11] Seeherman HJ, Azari K, Bidic S, Rogers L, Li XJ, Hollinger JO, et al. rhBMP-2 delivered in a calcium phosphate cement accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:1553-65.
- [12] Sorensen RG, Wikesjo UM, Kinoshita A, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: evaluation of a bioresorbable calcium phosphate cement (Ceredex) as a carrier for rhBMP-2. *J Clin Periodontol*. 2004;31:796-804.
- [13] Jensen SS, Broggin N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17:237-43.

- [14] Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16:123-45.
- [15] Schwarz F, Ferrari D, Sager M, Herten M, Hartig B, Becker J. Guided bone regeneration using rhGDF-5- and rhBMP-2-coated natural bone mineral in rat calvarial defects. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:1219-30.
- [16] Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J Biomed Mater Res.* 1994;28:1127-38.
- [17] Donath K. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Deutsche Zeitschrift für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.* 1988;34:197-206.
- [18] Schlegel KA, Rupprecht S, Petrovic L, Honert C, Srouf S, von Wilmsow C, et al. Preclinical animal model for de novo bone formation in human maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108:e37-44.
- [19] Weijs WL, Siebers TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Berge SJ, Meijer GJ, Borstlap WA. Early secondary closure of alveolar clefts with mandibular symphyseal bone grafts and beta-tri calcium phosphate (beta-TCP). *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39:424-9.
- [20] Szabo G, Huys L, Coulthard P, Maiorana C, Garagiola U, Barabas J, et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20:371-81.

- [21] Dai LY, Jiang LS. Single-level instrumented posterolateral fusion of lumbar spine with beta-tricalcium phosphate versus autograft: a prospective, randomized study with 3-year follow-up. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008;33:1299-304.
- [22] Zhao J, Hu J, Wang S, Sun X, Xia L, Zhang X, et al. Combination of beta-TCP and BMP-2 gene-modified bMSCs to heal critical size mandibular defects in rats. *Oral Dis*. 2010;16:46-54.
- [23] Yun JI, Wikesjo UM, Borke JL, Bisch FC, Lewis JE, Herold RW, et al. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a beta-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *J Clin Periodontol*. 2010;37:419-26.
- [24] Afifi AM, Gordon CR, Pryor LS, Sweeney W, Papay FA, Zins JE. Calcium phosphate cements in skull reconstruction: a meta-analysis. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126:1300-9.

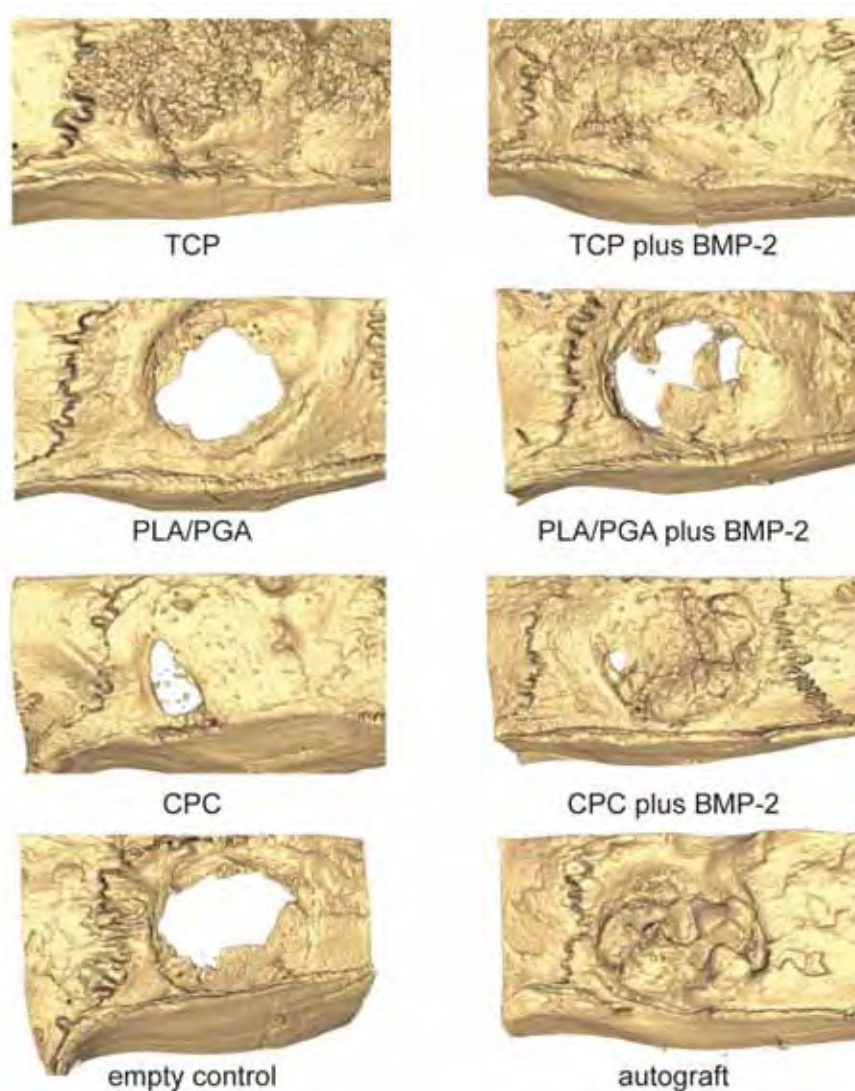
Figuras

Figura 1 - Imagens da micro-CT dos defeitos em calvária de ratos tratados e não tratados: defeitos calvária aos 45 dias pós-operatórios foram escaneados usando micro-CT. Imagens representativas indicam que o fechamento completo do defeito nos grupos TCP, TCP+BMP-2 e grupo osso autógeno particulado (autograft). TCP: beta-tricalcio fosfato. Plus: mais; PLA/PGA: acido polilático e poliglicólico; CPC: cimento de fosfato de cálcio; empty control: grupo controle não tratado; autograft: grupo osso autógeno particulado.

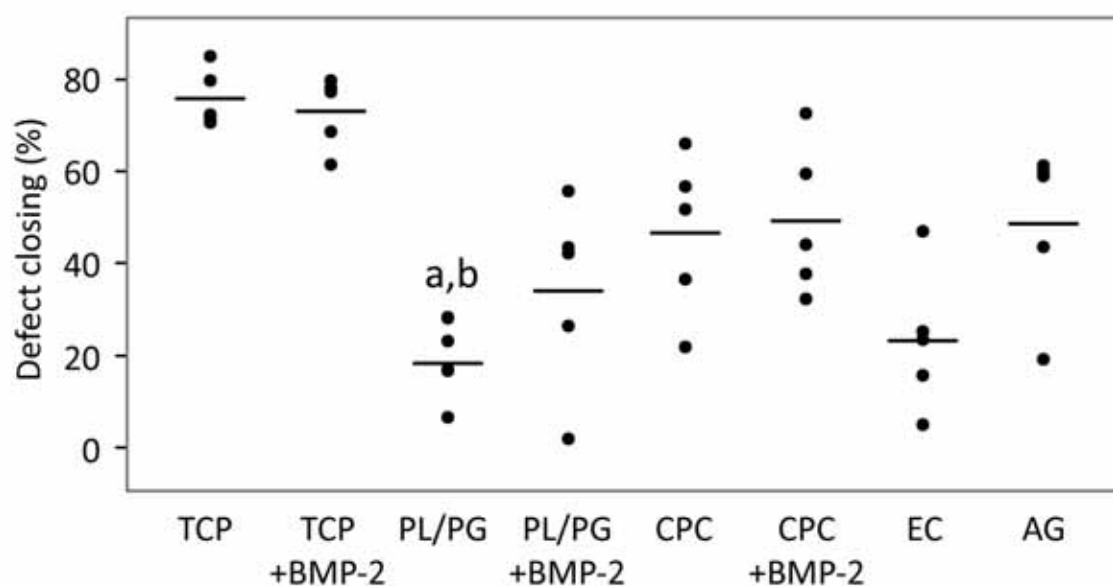


Figura 1 suplemento - Análise quantitativa de micro-CT dos defeitos da calvária de ratos: O fechamento total do defeito foi observado apenas no grupo TCP e no grupo TCP suplementado com BMP-2, mas não nos outros grupos tratados. A análise estatística indicou significância estatística * $P < 0,05$ entre TCP e PL / PG (a), TCP + BMP-2 e PL / PG (b), por comparações múltiplas de médias: teste de Tukey.

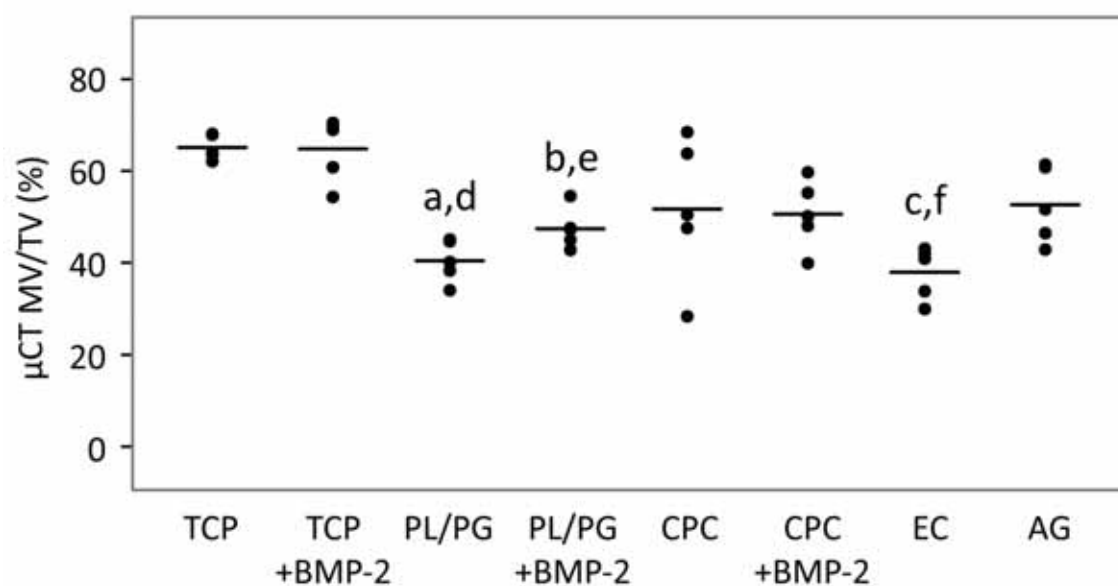


Figura 2 - Análise quantitativa de micro-CT do total de tecido mineralizado (biomaterial + tecido ósseo neoformado) por total de tecido dos defeitos da calvária de ratos. As análises estatísticas indicaram significância estatística * $P < 0,05$ entre o grupo TCP em relação ao PL / PG (a), PL / PG + BMP-2 (b) e grupo controle (EC) (c), e entre TCP + BMP-2 em relação ao PL / PG (d), PL / PG + BMP-2 (e) e EC (f) por comparações múltiplas de médias: teste de Tukey.

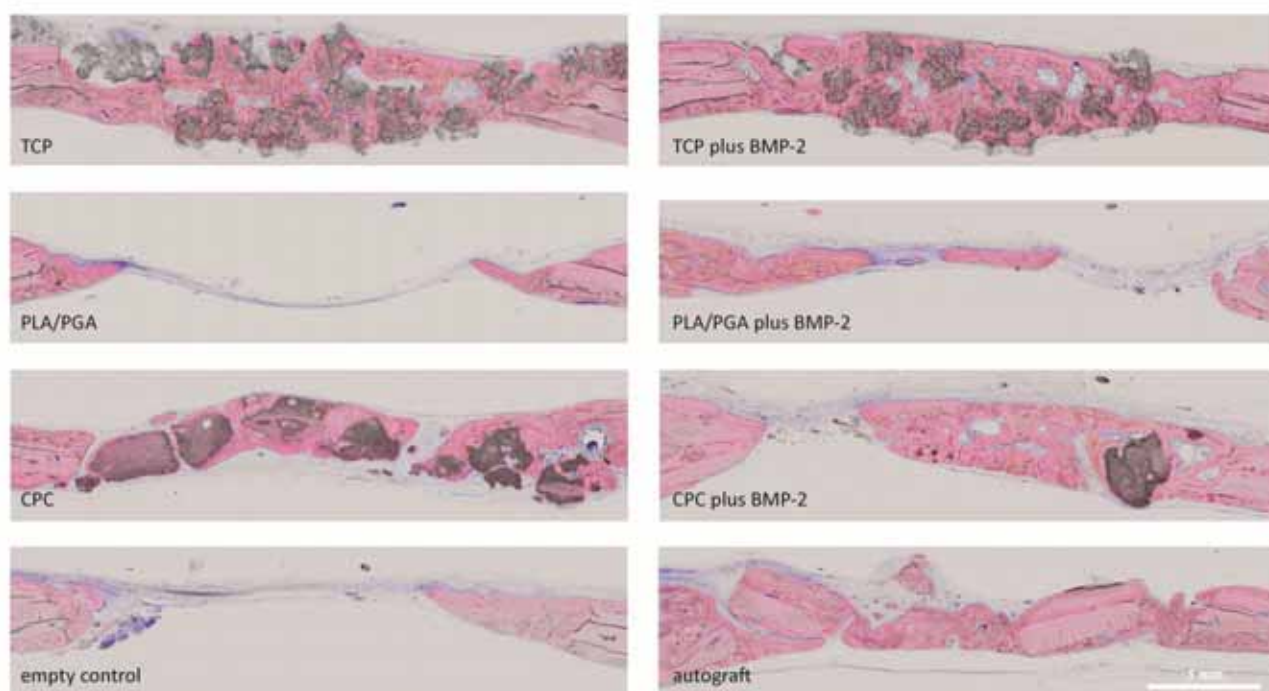


Figura 3 - Imagens histológicas dos defeitos críticos em calvária de ratos tratados e não tratados: os defeitos da calvaria aos 45 dias pós-operatórios foram submetidos à análise histológica. Imagens representativas indicam que o fechamento completo do defeito foi alcançado apenas nos grupos TCP, TCP+BMP-2 e no grupo osso autógeno particulado (autograft). (Coloração: Leiva-Laczko).

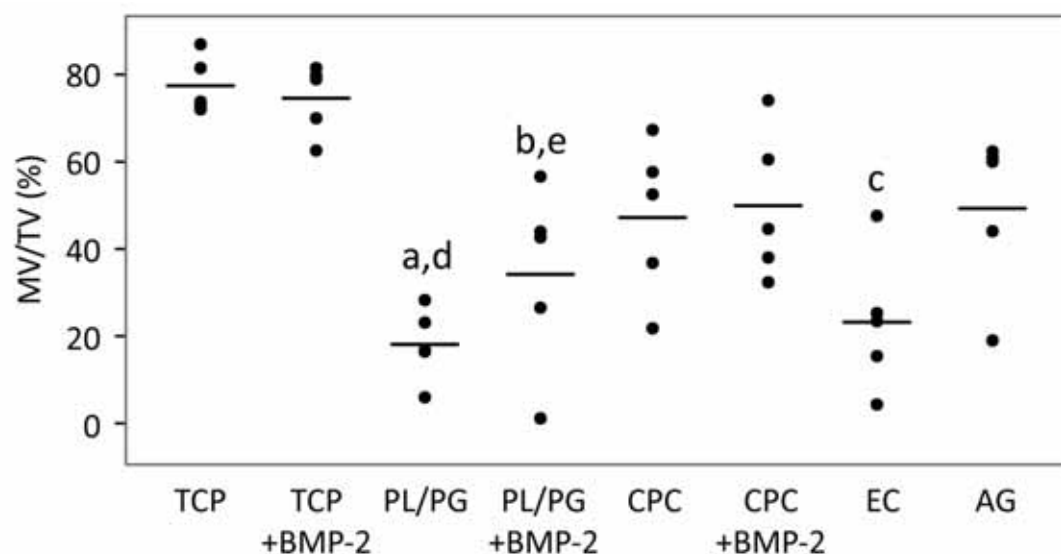


Figura 4 - A análise quantitativa do total de volume de tecido mineralizado (biomaterial + osso neoformado) por unidade de volume do tecido (MV/TV) em defeitos de calvária de ratos: as análises histomorfométricas demonstraram que o total de volume de tecido mineralizado do grupo TCP foi superior ao volume observado em outros grupos. A análise estatística indicou estatisticamente significativa $*P < 0,05$ entre TCP e PL / PG (a), PL / PG + BMP-2 (b) e EC (c) e entre TCP + BMP-2 e PL / PG (d) e PL / PG + BMP-2 (e). Comparações múltiplas de médias: teste de Tukey.

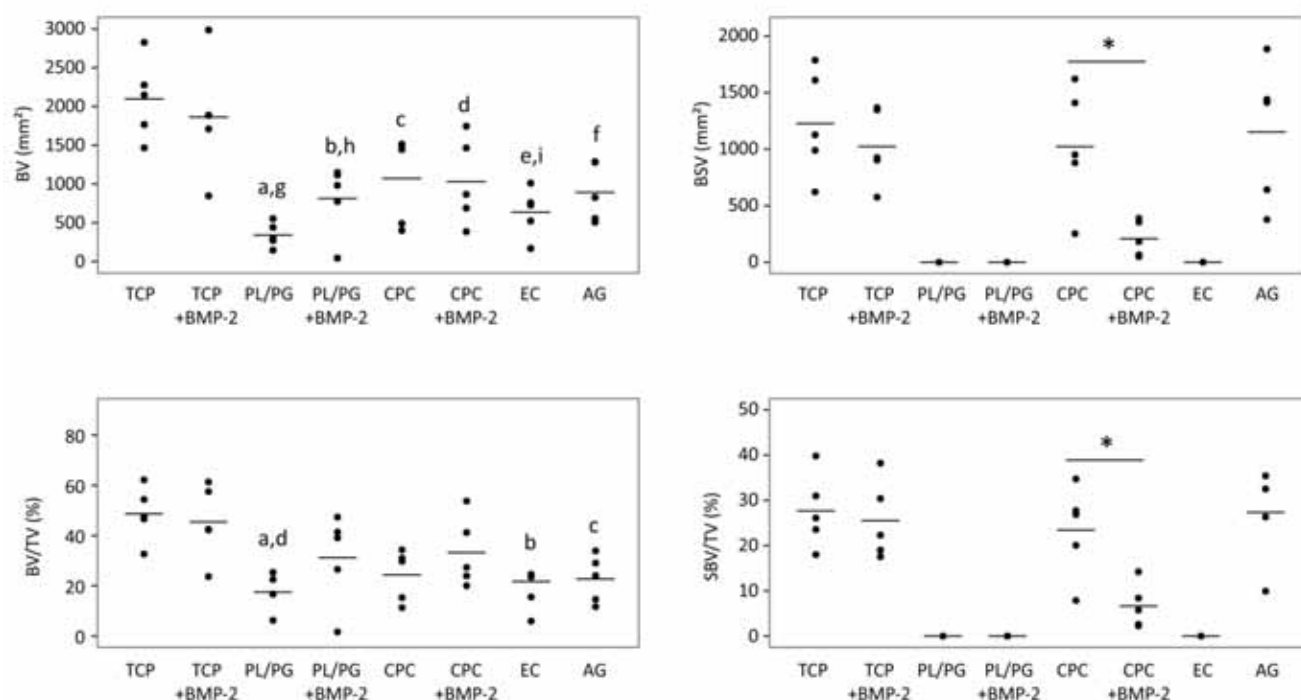


Figura 5- Análise quantitativa de osso neoformado e biomaterial residual no local do defeito: as análises histomorfométricas mostraram um elevado nível de formação óssea no grupo TCP. a) volume ósseo neoformado (BV), b) volume ósseo neoformado/volume total de tecido (BV/TV), c) volume de substituto ósseo (BSV), d) volume de substituto ósseo /volume total de tecido (BSV/TV). A) Análise quantitativa de BV (mm^2) mostrou diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$) entre TCP e PL/Pg (a), TCP e PL / PG + BMP-2 (b), TCP e CPC (c), TCP e CPC + BMP-2 (d), TCP e grupo controle (EC) (e), TCP e grupo de osso autógeno particulado (AG) (f) e entre TCP + BMP-2 e PG/PL (g), TCP + BMP-2 e PG/PL+ BMP-2 (h), TCP + BMP-2 e EC (i). B) Análise quantitativa dos BV / TV (%) apresentou diferença estatisticamente significativa (* $P < 0,05$) entre TCP e PL / PG (a), TCP e EC (b), TCP e AG (c) e entre TCP + BMP-2 e PL / PG (d). C) e D) Análise quantitativa de BSV (mm^2) e BSV / TV (%) apresentou diferença estatisticamente significativa * $P < 0,05$ entre CPC e CPC + BMP-2. Comparações múltiplas de médias: teste de Tukey.

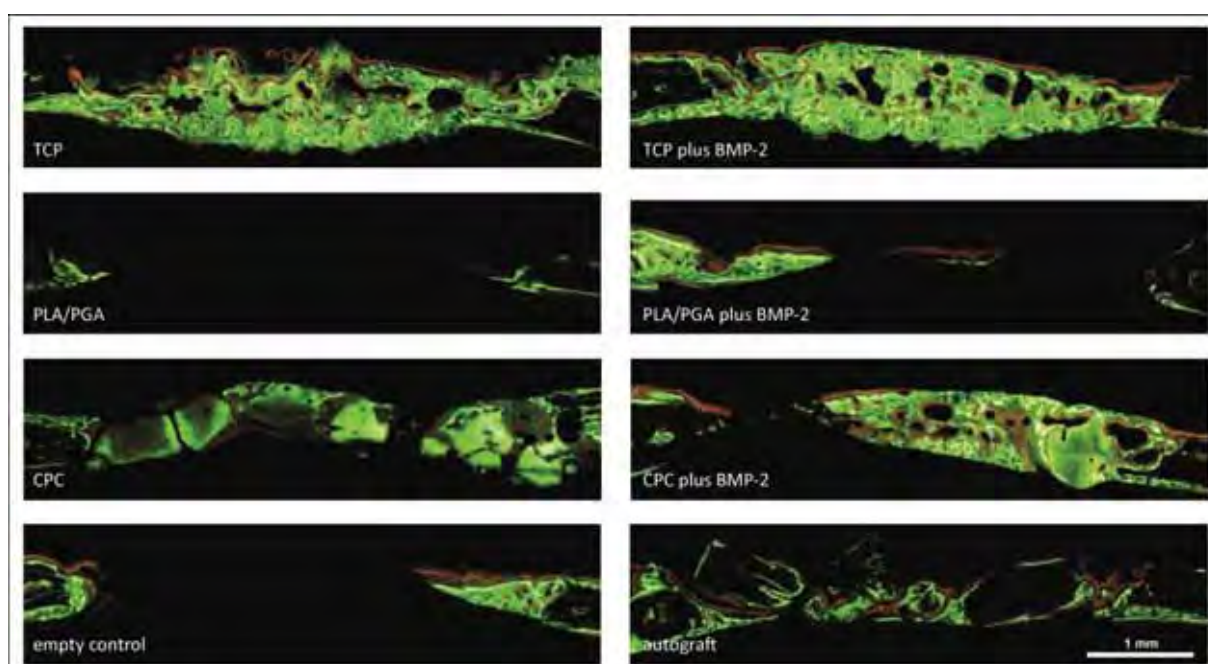


Figura 6 - Coloração de fluorescência dos defeitos de calvária de ratos tratados e não tratados: de acordo com a análise morfológica, a formação óssea, como indicado pela coloração verde e vermelha, apresentou-se coloração forte em todos os defeitos preenchidos com o TCP, independente da presença de BMP-2. Defeitos contendo PLA/PGA apresentaram apenas coloração fraca, que era congruente com a análise morfológica, e não foi observada diferença comparada ao grupo com suplementação de BMP-2. A coloração fluorescente também ocorreu em defeitos preenchidos com o CPC, mas por inspeção visual, maior coloração de fluorocromo foi incorporada nas amostras contendo BMP-2. Além disso, o padrão de coloração no CPC+BMP2 indica maior remodelamento ósseo na presença de BMP-2 do que no CPC. A distribuição de coloração verde e vermelha indica que a formação óssea ocorreu de forma contínua entre os dias 15 e 30 dias pós-cirúrgicos, independente do biomaterial, mas foi mais eficaz nos grupos TCP e TCP+BMP-2.

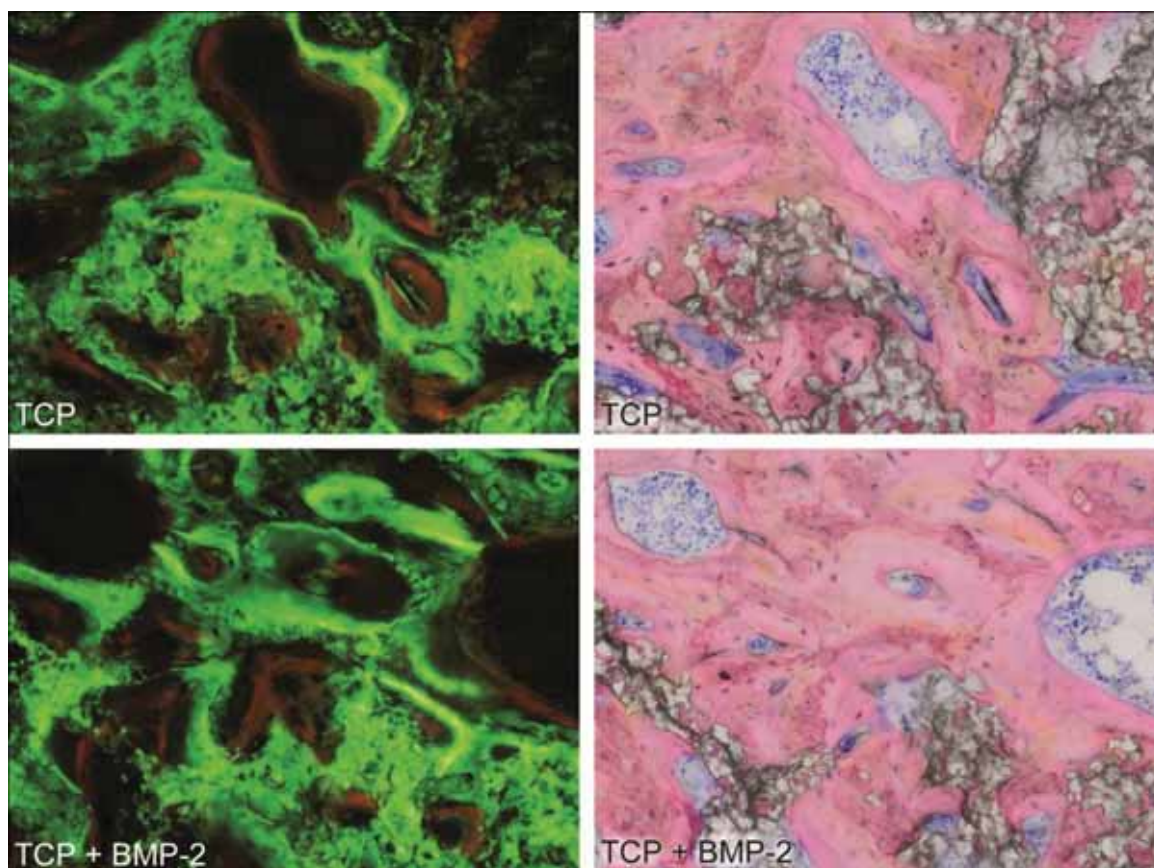


Figura 7 - Coloração de fluorescência de alta resolução nos defeitos ósseos de calvária de ratos tratados com TCP: os achados histológicos comparados à coloração de fluorocromo são congruentes. As áreas onde a formação óssea está indicada pela coloração vermelho-escuro na cortes histológicos também apresentou coloração de fluorocromo verde e vermelho. Estas análises detalhadas fornecem um conhecimento mais profundo das propriedades osteocondutoras da TCP e da falta de mudanças visíveis após a adição de BMP-2.

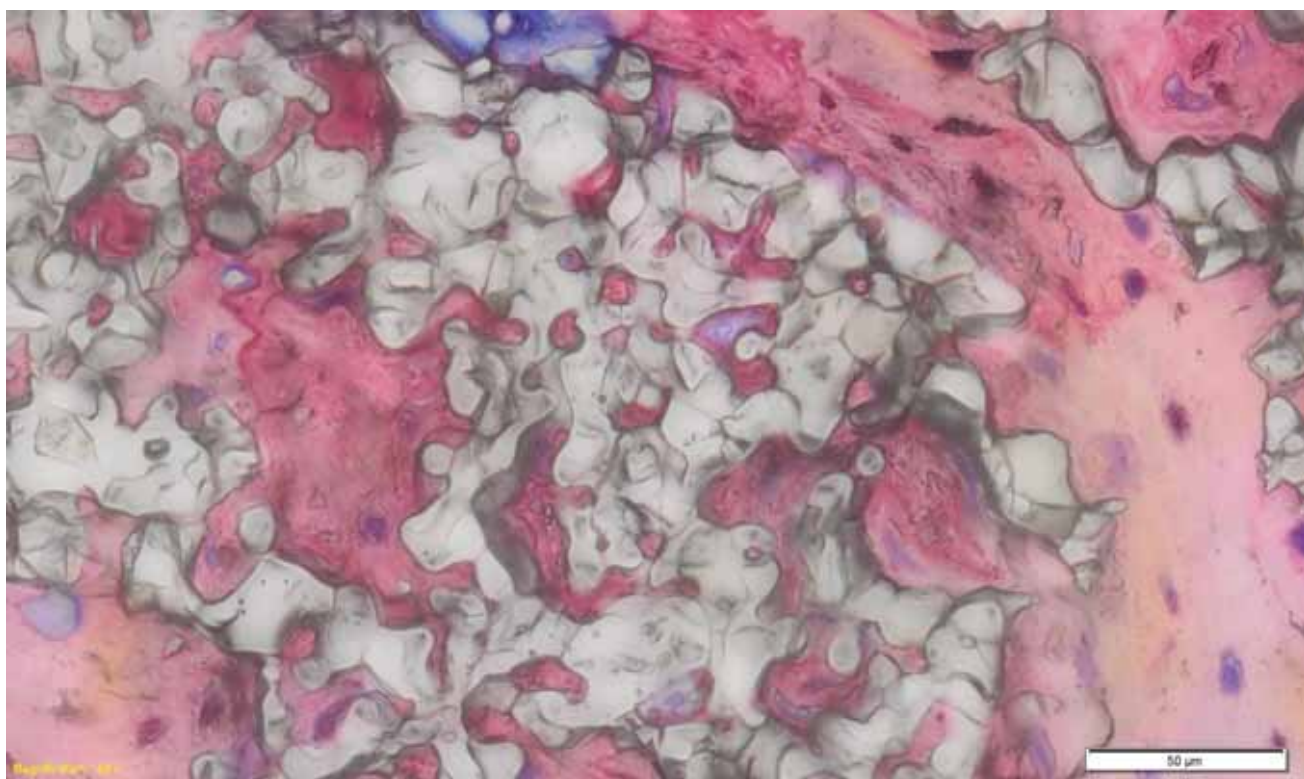


Figura 8 *suplemento* – Imagem histológica em maior aumento do grupo TCP.

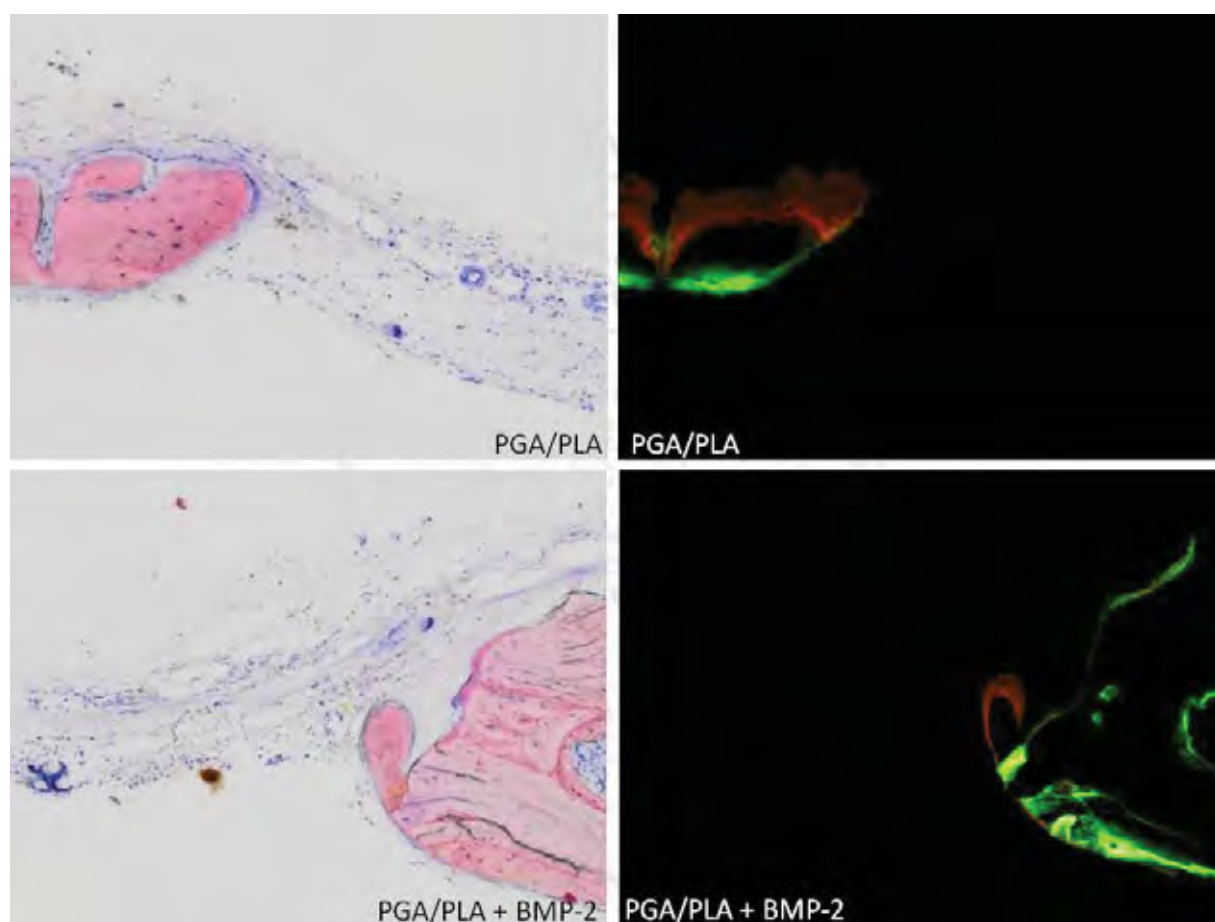


Figura 9 *suplemento* – Imagens histológicas em maior aumento dos grupos PLA/PGA e PLA/PGA + BMP-2.

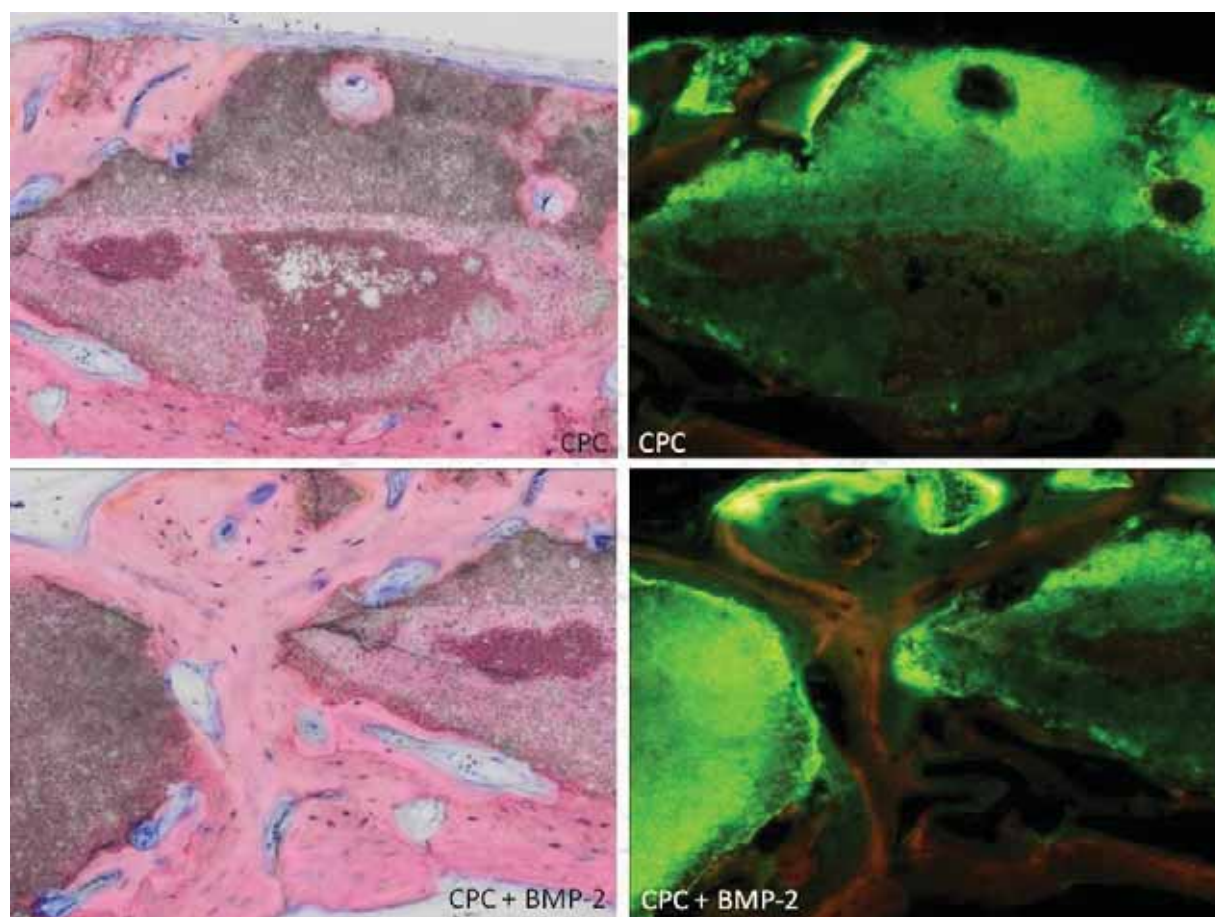


Figura 10 *suplemento* – Imagens histológicas em maior aumento dos grupos CPC e CPC + BMP-2.

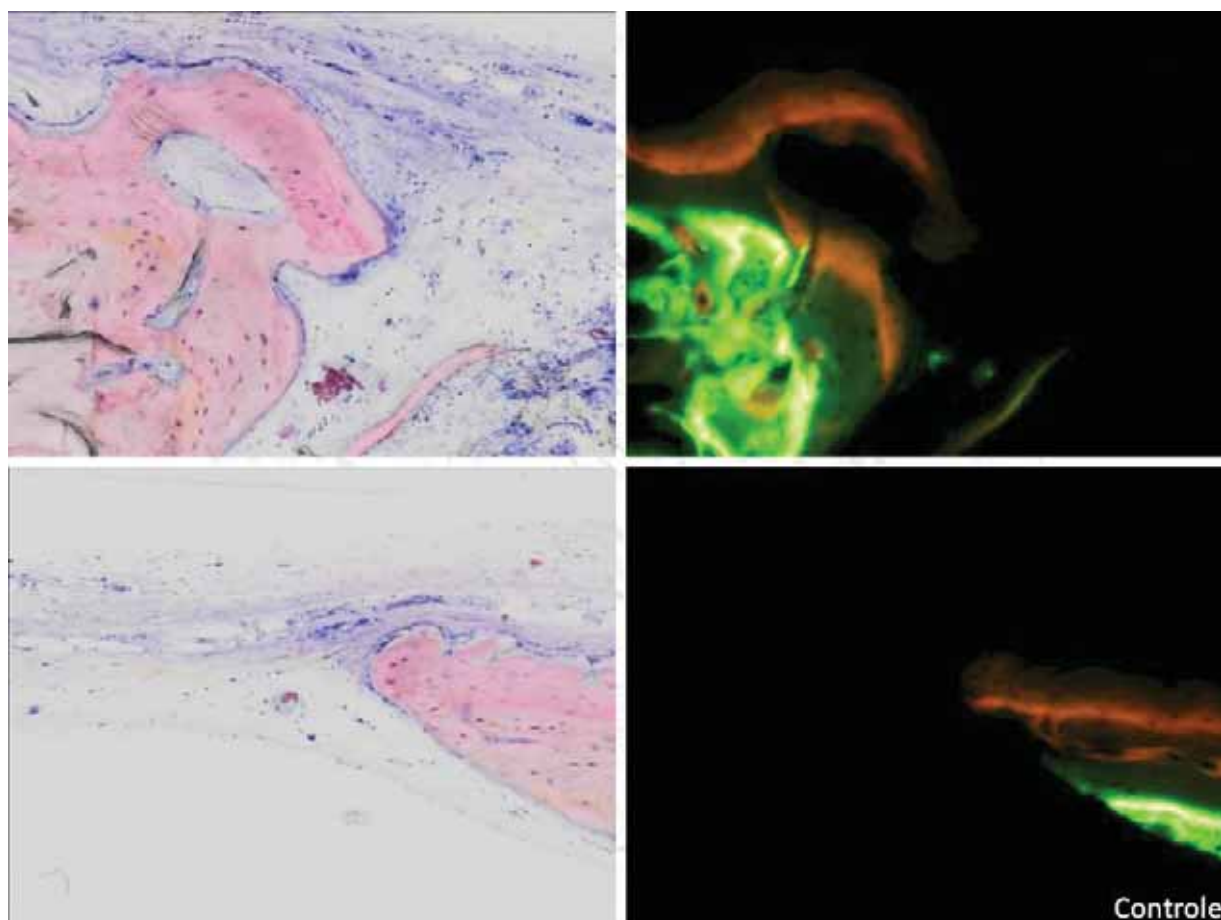


Figura 11 *suplemento* – Imagem histológica em maior aumento do grupo controle sem tratamento.

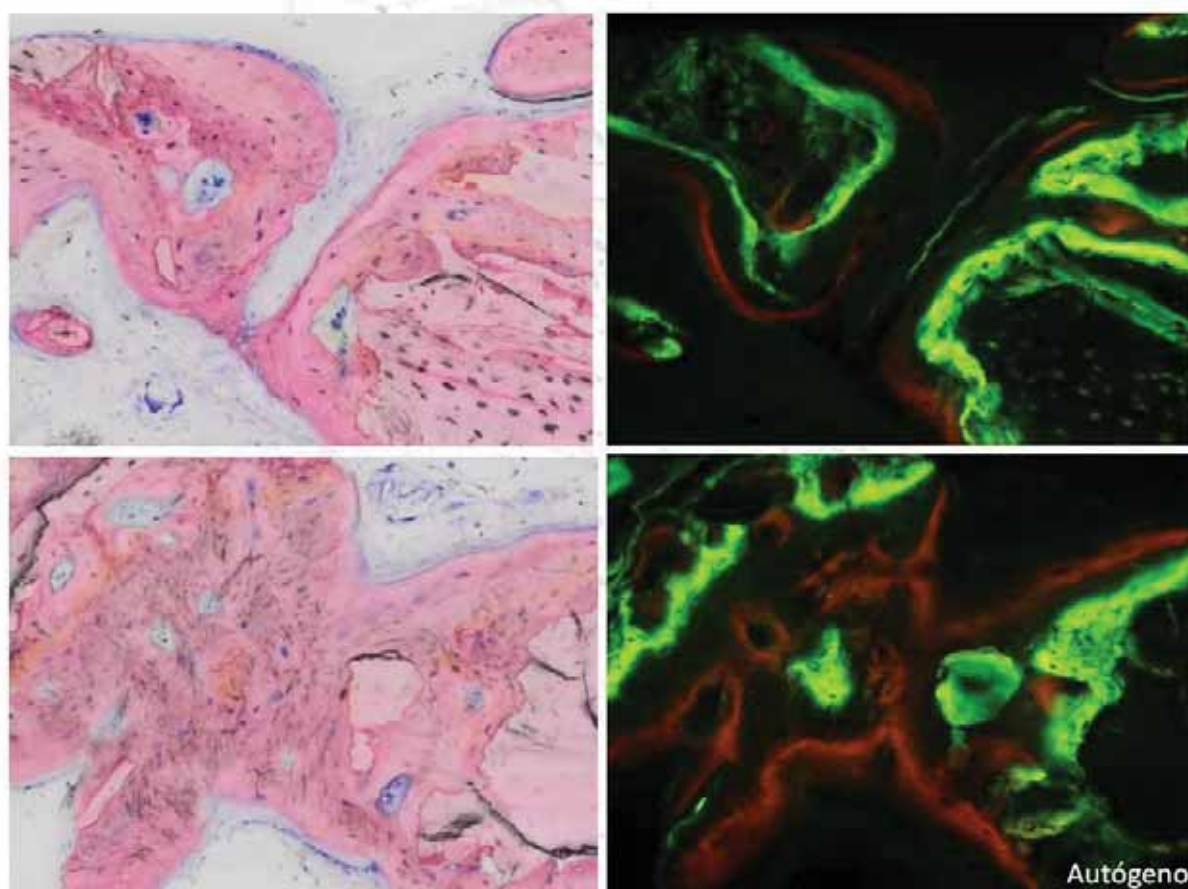


Figura 12 *suplemento* – Imagens histológicas em maior aumento do grupo osso autógeno particulado



Figura 13 *suplemento* – Imagem histológica em maior aumento do grupo osso autógeno particulado.

Anexo A

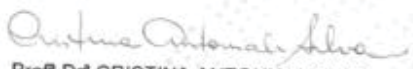
unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba 

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CARREADORES PARA BMP-2 NO PROCESSO DE REPARAÇÃO ÓSSEA EM CAVIDADES CIRURGICAMENTE CRIADAS. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA, IMUNOISTOQUÍMICA E COM FLUOROCROMOS EM CALVÁRIAS DE RATOS" sob responsabilidade de Dra ROBERTA OKAMOTO e colaboração de Prof Dr IDELMO GARCIA JÚNIOR e PROF DR EDUARDO HOCHULI VIEIRA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA de acordo com o protocolo no. 2008- 004517.

Araçatuba, 10 de julho de 2008.


Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Anexo B

Biomaterials 32 (2011) 3855–3861

Contents lists available at ScienceDirect

Biomaterials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomaterials

The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects

Eloa R. Luvizuto^{a,d}, Stefan Tangl^{a,b}, Gerald Zanoni^c, Tetuo Okamoto^{d,e}, Celso K. Sonoda^g,
Reinhard Gruber^{a,b,*}, Roberta Okamoto^{d,e}

^a Department of Oral Surgery, Medical University of Vienna, Austria
^b Austrian Cluster for Tissue Regeneration, Austria
^c Ludwig Boltzmann Institute for Experimental and Clinical Traumatology, Vienna, Austria
^d Department of Surgery and Integrated Clinic, Aragona Dental School, UNESP-Univ Estadual Paulista, Brazil
^e Department of Research and Post-Graduation, Universidade do Sagrado Coração, Bauria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 17 January 2011
 Accepted 31 January 2011
 Available online 3 March 2011

Keywords:
 Animal model
 Bone regeneration
 BMP (bone morphogenetic protein)
 Calcium phosphate cement
 Poly(lactic acid)
 Bone tissue engineering

ABSTRACT

Bone formation in critical-sized calvaria defects is strongly dependent on the osteoconductive properties of grafts. It remains a matter of controversy whether biomaterials can replace autografts and whether the supplementation of biomaterials with Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) is necessary to enhance bone formation. We examined rat calvaria critical-sized defects (5-mm-diameter) treated with β -tricalcium phosphate (TCP; Cerasorb® M), poly(lactic and polyglycolic acid) gel (PLA/PGA; Fisiograft®) and calcium phosphate cement (CPC; Norian® CRS®), either alone or in the presence of 5 μ g of BMP-2 after 45 days. Autografts and untreated defects served as controls. Bone formation was evaluated based on μ CT analysis, histomorphometric analysis and fluorescence analysis. We report that TCP supported bone formation more efficiently than did autografts. Bone formation in the presence of TCP alone reached a maximal level, as BMP-2 supplementation failed to enhance bone formation. By contrast, no significant difference in bone formation was observed when PLA/PGA and CPC were compared to autografts. Moreover, the presence of BMP-2 did not substantially change the osteoconductive properties of PLA/PGA or CPC. We conclude that the osteoconductive properties of TCP are superior to those of autografts and that TCP does not require BMP-2 supplementation. Our findings also show that the decreased osteoconductive properties of PLA/PGA and CPC cannot be overcome by BMP-2 supplementation in rat calvaria defects.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The use of biomaterials instead of autografts is a long-awaited hope in reconstructive surgery [1]. Biomaterials can provide an osteoconductive matrix that guides new bone into the defect or augmented area. Improving the osteoconductive properties of biomaterials is a major task in biomaterial research and development. It is not surprising that biomaterials are supplemented with growth factors to enhance the process of bone formation and, thus, graft consolidation. The major task, however, lies in providing a biomaterial with favorable osteoconductive properties that are similar or even superior to autografts and avoiding growth factor supplementation.

Growth factors, including bone morphogenetic proteins (BMPs), can support the process of bone formation; however, concerns about their use have been raised. For example, it is not always clear that the possible enhancement in bone formation justifies the costs and possible side effects associated with the use of growth factors. The FDA has approved a combination of BMPs and collagen for orthopedic [2] and dentistry [3] applications. However, combinations of BMPs and other biomaterials have not been approved [1,4,5].

Initial attempts to identify appropriate carriers for BMPs were performed with high expectations. For example, TCP [6,7], PLA/PGA [8,9] and calcium phosphate cement [10,11] have been tested for their capacities to support the osteoinductive properties of BMP-2 in preclinical models. However, the findings of these studies are not convincing because bone formation is not necessarily enhanced by BMP-2 supplementation [7,9,11,12]. Thus, not all biomaterials support the osteoinductive properties of BMP-2. Currently, it remains unclear which of the three commercially available carriers (TCP, Cerasorb® M; PLA/PGA; Fisiograft®; CPC, Norian® CRS®) allow

* Corresponding author. Department of Oral Surgery, Medical University of Vienna, Währingerstrasse 25a, A-1090 Vienna, Austria. Tel.: +43 1 400 70 2621; fax: +43 1 400 70 4109.
 E-mail address: reinhard.gruber@meduniwien.at (R. Gruber).

0142-9612/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
 doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.076

maximum bone formation and if their supplementation with BMP-2 causes a substantial enhancement in bone formation at a defect site.

Animal models have been the basis of studying the impact of biomaterials loaded with BMP-2 on bone formation [13]. There is a consensus that proof-of-principle studies should follow the phylogenetic tree, starting with rodent models [14]. The rat calvarium is exemplary for use in a critical size defect model in which BMP-2 can exert its osteoinductive capacity [9,15,16]. Even though this is an orthotopic defect model, the small borders between the biomaterial and residual calvaria bone provides a challenging situation for new bone to span the entire defect site. Another advantage of the rat calvaria model is its reproducibility and the ability to evaluate the study outcome based on μ CT and histomorphometric analyses in a standardized manner, keeping the inner experimental variation low [14]. These arguments support the use of the rat calvaria defect model for our study.

In the present study, we compared the osteoconductive properties of autografts with those of three commercially available biomaterials, which were tested alone or when supplemented with BMP-2. We chose surgically-created defects in rat calvaria to evaluate bone formation by means of μ CT, histomorphometry and fluorescence microscopy analyses.

2. Material and methods

2.1. Study design and ethics

Twenty Wistar rats (90 days old) that were acquired from the Animal Center of São Paulo State University were maintained at a temperature of 22 °C in a 12-h light/12-h dark cycle with free access to water and rodent food. A total of 40 calvaria defects (5-mm-diameter) were randomly divided into 8 treatment groups, with a total of 5 defects per treatment group ($n = 5$). The treatment groups were as follows: [1] 500–1000 μ m β -tricalcium phosphate (TCP) (Cerasorb[®] M, Cerasan Ltd, Germany); [2] TCP plus 5 μ g BMP-2 (RBD Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA); [3] poly(lactic and polyglycolic acid) (PLA/PGA) gel (Filiograft[®], Ghimara SPA, Italy); [4] PLA/PGA plus BMP-2; [5] calcium phosphate cement (CPC) (Morian[®] CDS[®], Cerasorb[®] Repair System[®], Germany); and [6] CPC plus BMP-2. The other two treatment groups were the empty control (untreated) [7] and the autograft control [8]. The present study complied with the principles of laboratory animal care and national laws on animal use, and the study was authorized by the Animal Research Ethics Committee of the São Paulo State University, Brazil (protocol #2008-004512).

2.2. Surgical procedures and fluorescence labeling

After general anesthesia with xylazine (0.03 ml/100 g body weight [bw]/intraperitoneal [ip]); Dopasol[®] Laboratories Calles SA, Barcelona, Spain) and ketamine (7 μ g/kg bw/ip; Fort Dodge Saúde Animal Ltd, Brazil), the animal skulls were shaved and disinfected with polyvinylpyrrolidone iodine (Indústria Química e Farmacêutica Bioquímica Ltd, Brazil). Using aseptic technique, an incision was made through the skin of the calvaria and periosteum, and full-thickness flaps were reflected. Under copious sterile saline irrigation, two 5-mm-diameter bone defects were prepared with a trephine bur (3i Implant Innovations, Inc., Palm Beach Gardens, USA) in each animal, one in each parietal region. The defects were treated as described above before the periosteum was repositioned and sutured using poly(lactic acid) sutures (Vycril 5.0, Ethicon, Johnson Prof., São José dos Campos, Brazil). The skin was closed using nylon sutures (Nylon 5.0, Mononylen, Ethicon). All animals received a single dose of 30,000 IU of penicillin G benzathine (Penabiotéc, Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltd, Campinas, Brazil) by intramuscular injection. Rats received 20 mg/kg body weight of calcitonin and alizarin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) at the 15th and 30th postoperative day, respectively. The rats were euthanized by anesthetic overdose after the 45th postoperative day.

2.3. Sample processing

The relevant part of the skull was removed and fixed in neutral buffered 4% formalin solution. The calvarias were divided in half using a high-precision saw (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Germany). The samples were dehydrated in ascending grades of alcohol and embedded in light-curing resin (Technovit 7200 VLC + BPO, Hülster & Co., Hanau, Germany). The blocks were scanned with a μ CT system (vivoCT 75, Scanco Medical AG, Basserdorf, Switzerland) at 70 kV/114 μ A with an integration time of $t = 380$ ms at high resolution (pixels = $21 \times 21 \mu$ m). The blocks were processed with the Exakt-Cutting and Grinding Equipment (Exakt Apparatebau) according to a standardized method [17]. Sections were prepared in

parallel to the sagittal suture and reduced to a thickness of approximately 40 μ m before being stained with Leva-Lactaco stain.

2.4. Histomorphometric analysis

Blinded analyses were performed. Stained sections were examined by light microscopy (Nikon Microphot-FXA, Nikon, Tokyo, Japan), and images were obtained with a digital camera (Nikon DXM 1200) coupled with a motorized stage (Märzhäuser Weizlar GmbH & Co. KG, Weizlar, Germany). Single pictures were assembled to generate large overview images (Lucia G 4.71, Laboratory Imaging Ltd, Brno, Czech Republic) at a resolution of 800 pixels/mm. Analysis was restricted to the gap bridged between both edges of the drilled hole, based on interactively drawn false color images (Adobe Photoshop, Adobe, San Jose, CA, USA). Bone tissue and bone substitutes were measured with histomorphometry software (Definens Developer 7, Munich, Germany). Two-dimensional measurements of the defect closure (μ CT DC) and three-dimensional measurements of the amount of mineralized volume per tissue volume (μ CT MV/TV) were calculated from the μ CT samples. Mineralized volume per tissue volume (MV/TV), bone volume in the defect (bone volume [BV] in mm^3 , bone volume per tissue volume [BV/TV]), bone substitute volume in the defect (bone substitute volume [SV] in mm^3 and bone substitute volume per tissue volume [SV/TV]) were calculated from the histological samples. Fluorescence qualitative analyses were performed with the epifluorescence mode of a Nikon Microphot-FXA microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

2.5. Statistics

Data were analyzed with Multiple Comparisons of Means by Tukey contrasts. Significant difference was assigned at the level of $p = 0.05$.

3. Results

3.1. μ CT analysis

The 2-dimensional view from above provides information about overall defect closure. Complete defect closure was observed only with TCP alone and TCP supplemented with BMP-2. Autografts, PLA/PGA and CPC failed to provide sufficient support for the bone to completely close the defect. In addition, in the samples in which PLA/PGA and CPC were supplemented with BMP-2, no defect closure was observed (Fig. 1; Fig. 1 Supplement).

We next performed a quantitative 3-dimensional analysis of the amount of mineralized tissue in the defect. The analysis revealed that autografts, TCP alone, and TCP supplemented with BMP-2 had a trend toward more mineralized tissue than PLA/PGA and CPC, even when supplemented with BMP-2 (Fig. 2). Importantly, no significant differences were observed when defects filled with autografts, TCP alone or TCP supplemented with BMP-2 were compared. Overall, these data provide the first evidence that TCP alone and TCP supplemented with BMP-2 have comparable performances to autografts.

3.2. Qualitative and quantitative histology

To better understand the osteoconductive properties of the biomaterials, histological examinations were performed. As expected from the μ CT analysis, the defect site that was originally treated with TCP was fully bridged by a conglomerate of biomaterial and new bone tissue. Remnants of TCP were visible and were in intimate contact with the bone tissue. In addition, in the group with TCP combined with BMP-2, the observations were similar. Defects that were filled with PLA/PGA showed no residual biomaterial, only a thin, soft tissue that closed the defect. In this group, biomaterial supplementation with BMP-2 might have promoted bone formation, which was observed in some samples; CPC also showed osteoconductive properties, but the defects were not fully bridged by bone tissue. The histology analyses also provide the impression that BMP-2 supplementation enhanced the degradation of CPC, which was confirmed by histomorphometry. As expected, no substantial bone formation was observed in empty defects, while autografts resulted in closure of the original defects (Fig. 3).

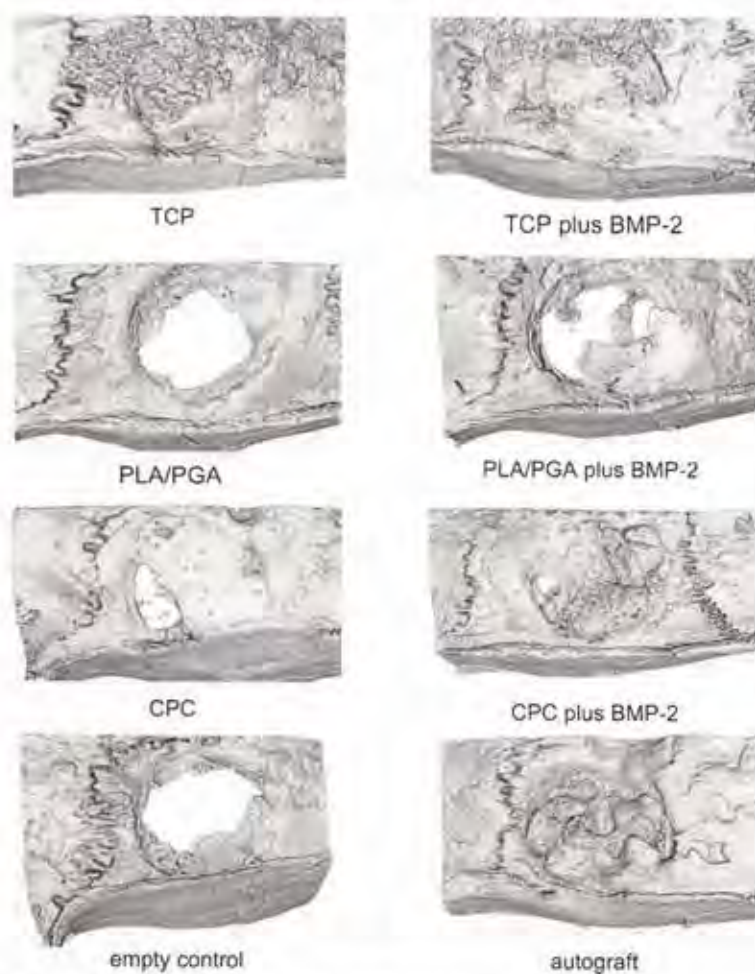


Fig. 1. μ CT images of treated and untreated rat calvaria defects: Calvaria defects at day 45 post-surgery were scanned using μ CT. Representative images indicate that complete defect closure was achieved in the two TCP groups and in the autograft group.

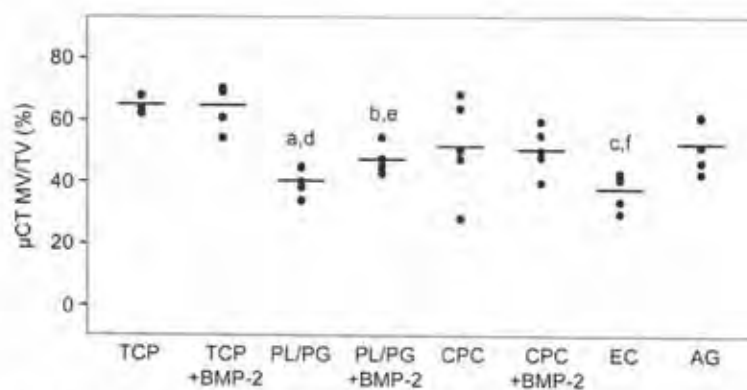


Fig. 2. Quantitative μ CT analysis of total mineralized tissue in rat calvaria defects: statistical analysis indicated statistical significance $*P < 0.05$ between TCP compared to PL/PG (a), PL/PG + BMP-2 (b) and empty control (EC) (c), and between TCP + BMP-2 compared to PL/PG (d), PL/PG + BMP-2 (e) and EC (f) by Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts test.



Fig. 3. Histological images of treated and untreated rat calvaria defects: Calvaria defects at day 45 post-surgery were subjected to histological analysis. Representative images indicate that complete defect closure was achieved only in the two TCP groups and the autograft group (Leval-Laczkó stain).

The histomorphometric examinations showed that the overall mineralized volume, which contains the biomaterial and newly formed bone, reflects the findings of the 3-dimensional μ CT analysis (Fig. 4). Again, TCP alone resulted in more mineralized tissue volume than PLA/PGA (independent of BMP-2) but similar amounts compared to CPC (independent of BMP-2) and autografts. Similar findings were observed for TCP supplemented with BMP-2. Together, these data suggest TCP has favorable osteoconductive properties in this defect model.

We next distinguished between new bone and residual biomaterial in the defect site. The TCP group showed more bone volume than the other groups (PLA/PGA, CPC, autografts and the respective combinations with BMP-2). Supplementation with BMP-2 did not change the absolute (BV) and relative (BV/TV) amounts of bone formation for any of the biomaterials. Eventually, a trend toward a positive effect of BMP-2 was observed with PLA/PGA. Interestingly, new bone formation was similar in empty defects and defects

treated with autografts. Thus, TCP supports new bone formation more efficiently than the other biomaterials and more efficiently than autografts (Fig. 5a,b).

When focusing on biomaterial degradation, one effect becomes obvious. Supplementation of CPC with BMP-2 supported biomaterial degradation, which was not the case in the TCP and PLA/PGA groups. These data suggest that BMP-2 could not effectively support bone formation but enhanced the degradation of CPC (Fig. 5c,d).

3.3. Fluorescence staining

To understand the impact of biomaterials on the active process of graft consolidation, bone formation was marked with fluorochromes. In agreement with the morphologic analysis, bone formation, as indicated by green and red staining, was robust and occurred throughout the defects filled with TCP, independent of the presence of BMP-2. Defects containing PLA/PGA showed only weak staining,

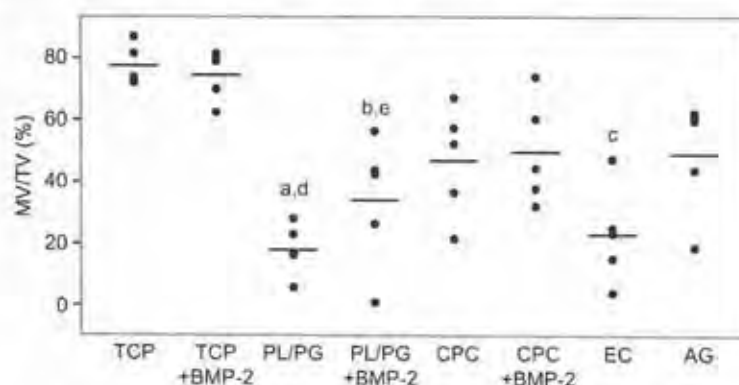


Fig. 4. Quantitative analysis of the total amount of mineral tissue volume per tissue volume (MV/TV) in rat calvaria defects: Histomorphometric examinations showed that the overall mineralized volume of the TCP group was higher than the volumes observed in the other groups. Statistical analysis indicated statistical significance $*P < 0.05$ between TCP and PL/PG (a), PL/PG + BMP-2 (b) and EC (c) and between TCP + BMP-2 and PL/PG (d) and PL/PG + BMP-2 (e). Multiple Comparisons of Means; Tukey Contrasts test.

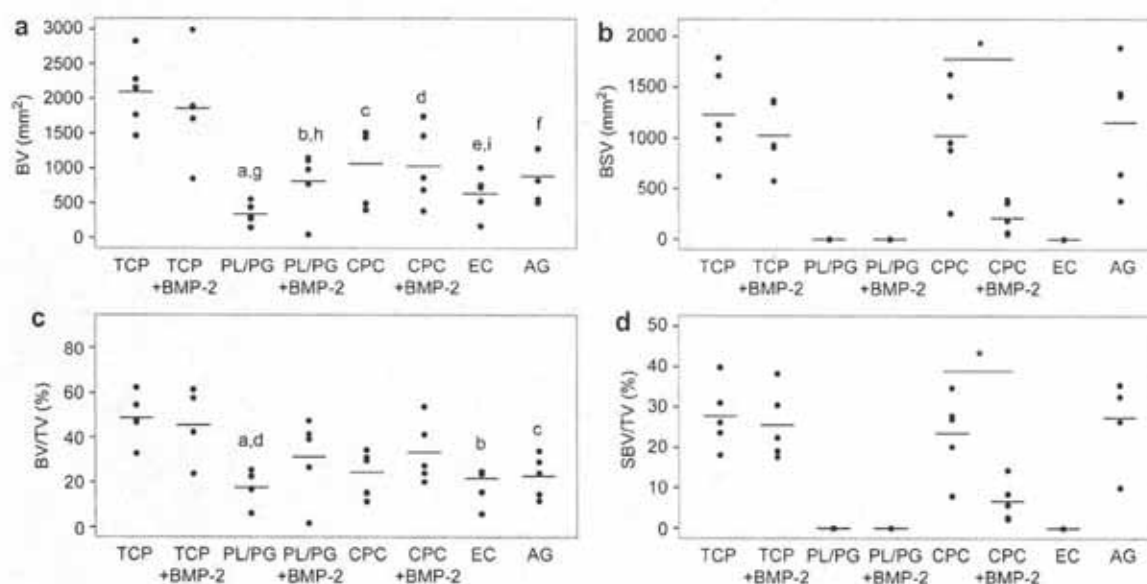


Fig. 5. Quantitative analysis of new bone and the residual biomaterial in the defect site: Histomorphometric examinations showed a high level of bone formation in the TCP group. a) bone volume (BV), b) BV/tissue volume (BV/TV), c) bone substitute volume (BSV), d) BSV/tissue volume (BSV/TV). A) Quantitative analysis of BV (mm³) showed statistical significance difference **P* < 0.05 between TCP and PL/PG (a), PL/PG + BMP-2 (b), CPC (c), CPC + BMP-2 (d), empty control (EC) (e), autograft (AG) (f) and between TCP + BMP-2 and PL/PG (g), PL/PG + BMP-2 (h), EC (i). B) Quantitative analysis of BV/TV (%) showed statistical significance difference **P* < 0.05 between TCP and PL/PG (a), EC (b), AG (c) and between TCP + BMP-2 and PL/PG (d). C) and D) Quantitative analysis of BSV (mm³) and BSV/TV (%) showed statistical significance difference **P* < 0.05 between CPC and CPC + BMP-2. Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts test.

which was congruent with the morphological analysis, and no effects of BMP-2 supplementation were observed. Fluorochrome staining also occurred in defects filled with CPC, but by visual inspection, more fluorochrome was incorporated in specimens containing BMP-2. Moreover, the staining pattern indicated more remodeling with BMP-2 than in the respective CPC controls. The distribution of green and red staining indicates that bone formation occurred continuously between day 15 and day 30 post-surgery, independent of the biomaterial, but occurred most effectively in the two TCP groups (Fig. 6).

Higher magnification images highlight the fact that the histological findings and fluorochrome staining findings are congruent. The areas where bone formation was indicated by dark red staining in histology samples also accumulated green and red fluorochromes. These detailed analyses provide deeper insight into the osteoconductive properties of TCP and the lack of visible changes after the addition of BMP-2 (Fig. 7).

4. Discussion

BMP-2 is considered an osteoinductive factor that enhances the process of graft consolidation. BMP-2 is applied with a collagen sponge that is not space maintaining. Hence, newer concepts focus on mineralized, osteoconductive biomaterials to serve as BMP-2 carriers. However, questions arise, such as which biomaterial can serve as a suitable carrier for BMP-2 and if biomaterial supplementation with BMP-2 provides a substantial advantage for the overall process of graft consolidation. This study in rats demonstrates that TCP processes the most favorable osteoconductive properties compared to PLA/PGA, CPC and autologous bone. Moreover, this main finding was independent of the presence of BMP-2. Specifically, the results of our study strongly suggest that TCP alone causes complete mineralization of critical size calvaria defects in rats. Hence,

TCP is an effective biomaterial because a complete successful defect closure can be achieved by 45 days post-surgery.

Our findings are important because TCP performed better than two other biomaterials as well as autografts. If we consider that autograft harvesting is associated with donor site morbidity and has the drawback of limited amounts of available material, our findings suggest that TCP may serve as an alternative to autografts, at least in the proposed experimental conditions. Our findings are also important because the osteoconductive properties of TCP could not be further enhanced by the addition of BMP-2, a growth factor that is expensive and associated with side effects. Thus, our data suggest that it is not necessary or even useful to supplement TCP with BMP-2 in the proposed experimental conditions. These two major findings support the contention that we have identified an available biomaterial that is approved for clinical applications that promotes targeted growth of new bone in a surgical defect site.

The observation that TCP performed better than autografts in the rat calvaria model is at least partially consistent with previous studies showing that TCP and autografts equally support bone formation [13,18–20]. Also in agreement with our observations are findings that TCP combined with autografts performed better than autografts alone [21], supporting the potent osteoconductive properties of this biomaterial. Supplementation of BMP-2 with TCP in the dose used in this study (5 µg) and an even higher dose (15 µg) performed in a manner similar to autografts [7]. This finding is consistent with our study, where we observed that TCP plus BMP-2 did not improve bone formation. Only TCP loaded with a much higher dose of BMP-2 showed a satisfactory increase in bone formation compared to TCP alone [6,7,22]. In addition, supplementation of PTH with TCP did not improve bone formation compared to TCP alone [23].

CPC alone is not superior to autografts, which is in agreement with previous studies [24]. Moreover, CPC and PLA/PGA loaded

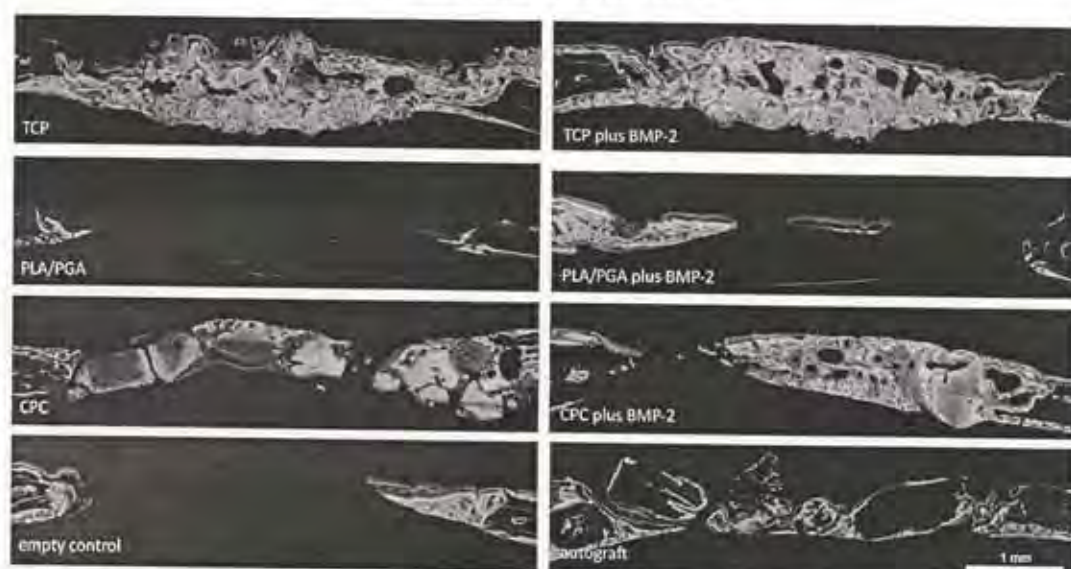


Fig. 6. Fluorescence staining of treated and untreated rat calvaria defects: In agreement with the morphologic analysis, bone formation, as indicated by green and red staining, was robust and occurred throughout the defects filled with TCP, independent of the presence of BMP-2. Defects containing PLA/PGA showed only weak staining, which was congruent with the morphological analysis, and no effects of BMP-2 supplementation were observed. Fluorochrome staining also occurred in defects filled with CPC, but by visual inspection, more fluorochrome staining was incorporated into specimens containing BMP-2. Moreover, the staining pattern indicated more remodeling in the presence of BMP-2 than in the respective CPC controls. The distribution of green and red staining indicates that bone formation occurred continuously between day 15 and day 30 post-surgery, independent of the biomaterial, but was most effective in the two TCP groups. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

with BMP-2 did not improve bone formation, in contrast to previous studies that showed better results after supplementation with BMP-2; however, the observed effects are dose dependent [8–12]. Previous studies together with our study suggest that TCP is

a biomaterial that can perform as well as or better than autografts. The clinical relevance of these findings is based on the worldwide use of TCP, PLA/PGA and CPC as autograft alternatives. It is likely that the osteoconductive properties of these biomaterials are not

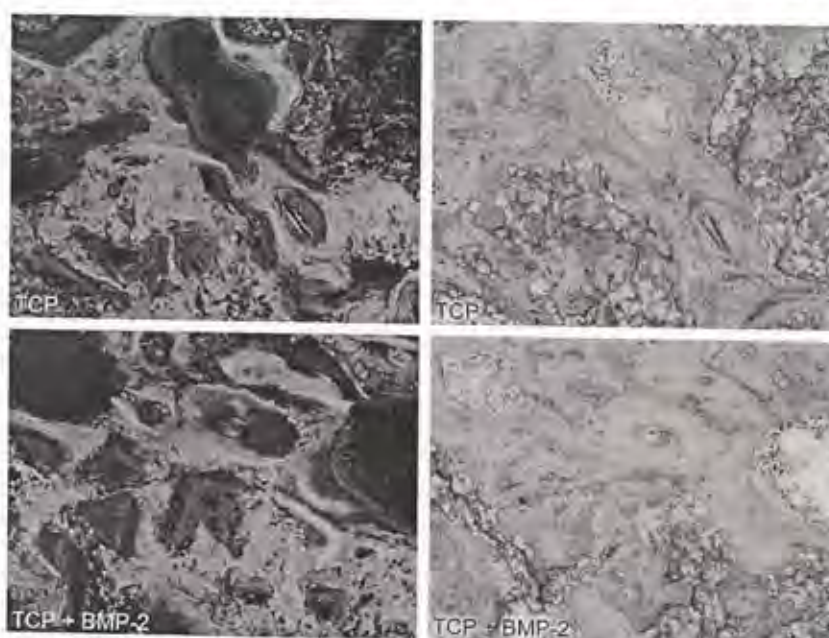


Fig. 7. High-resolution fluorescence staining of TCP-treated rat calvaria defects: Histological findings and fluorochrome staining are congruent. The areas where bone formation is indicated by dark red staining in the histology samples also accumulated green and red fluorochrome staining. These detailed analyses provide a deeper insight into the osteoconductive properties of TCP and the lack of visible changes after addition of BMP-2. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

substantially (if at all) affected by the defect site. This finding suggests that in a clinical scenario, TCP may provide favorable osteoconductive properties. Also of potential clinical relevance is the fact that the osteoconductive properties of TCP cannot be enhanced with the indicated dosage of BMP-2, suggesting that no further efforts are necessary to improve the clinical outcome parameter of bone formation.

Considering the limitations of this study, this suggestion is based on findings from a rat calvaria model, which does not fully represent all human defects. Even though the rat calvaria are of critical size, and the conditions for bone formation are very stringent, the defect site is restricted to 5 mm, which might be smaller than the defects affecting humans. Moreover, blood vessel support and thus the presence of osteoblast progenitors are favorable in rat calvaria, which might not be the case in elderly patients with compromised regenerative capacity. Thus, it cannot be ruled out that supplementation of TCP and other biomaterials with BMP-2 may provide a beneficial effect on the graft consolidation process. In our rat model, bone regeneration could be considered normal. Another limitation of our study is the study design. We selected one observation period and only five defects per treatment group, which is a low power for a study. However, the differences among the groups were large, allowing a statistical analysis to be undertaken. The limitations provide a basis for future studies. Based on our findings, future studies should evaluate whether TCP performs favorably without BMP-2 in rat models of compromised regeneration, e.g., cases of ovariectomies, diabetes, and glucocorticoid-treated rats. Moreover, data on BMP-2 dosing and earlier observation periods might extend the current findings. A future study should also determine the osteoconductive properties of TCP alone and with BMP-2 supplementation in larger defects, such as those that may occur in human patients.

5. Conclusion

The findings presented here indicate that bone formation reached a maximum level when rat calvaria defects were filled with TCP. Neither PLA/PGA nor CPC alone nor the same biomaterials in the presence of 5 µg of BMP-2 could improve upon the findings observed with TCP alone. Moreover, the ability of TCP to directly support bone formation in calvaria defects in a manner superior to that of autografts supports our hope that we might overcome the need to harvest autografts, at least when treating small critical-sized defects. Thus, we need a more differentiated view regarding autografts as the gold standard.

Acknowledgments

The authors would like to thank Patrick Heimel, B.Sc., for his calculations based on the Definiens Developer software, Mag. Petra Pokorny for statistical support, Toni Dobsak for illustration support, Dr Georg Watzek (the head of the Oral Surgery Department of the Medical University of Vienna) that allowed the authors to develop the most part of the experimental evaluation at the Institution lab and Dr Hanns Plenck for histological support. This research was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) project number 2008/10516-6.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.076.

References

- [1] Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett* 2009;31:1817–24.
- [2] Axelrad TW, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:481–8.
- [3] Triplett RG, Nevins M, Marx RE, Spagnoli DB, Oates TW, Moy PK, et al. Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:1947–60.
- [4] Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol Lett* 2009;31:1825–35.
- [5] Issa JP, Bentley MV, Iyomasa MM, Sebald W, De Albuquerque RF. Sustained release carriers used to delivery bone morphogenetic proteins in the bone healing process. *Anat Histol Embryol* 2008;37:181–7.
- [6] Sohier J, Daculsi G, Sourice S, de Groot K, Layrolle P. Porous beta tricalcium phosphate scaffolds used as a BMP-2 delivery system for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2010;92:1105–14.
- [7] Dohzono S, Imai Y, Nakamura H, Wakitani S, Takaoka K. Successful spinal fusion by E. coli-derived BMP-2-adsorbed porous beta-TCP granules: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 2009;467:3206–12.
- [8] Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 1988;257–65.
- [9] Schliephake H, Weich HA, Dullin C, Gruber R, Frahe S. Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid—an experimental study in rats. *Biomaterials* 2008;29:103–10.
- [10] Bai B, Yin Z, Xu Q, Lew M, Chen Y, Ye J, et al. Histological changes of an injectable rhBMP-2/calcium phosphate cement in vertebroplasty of rhesus monkey. *Spine* 2009;34:1887–92.
- [11] Seeherman HJ, Azari K, Bidic S, Rogers L, Li XJ, Hollinger JO, et al. rhBMP-2 delivered in a calcium phosphate cement accelerates bridging of critical-sized defects in rabbit radii. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88:1553–65.
- [12] Sorensen RG, Wikesjö UM, Kinoshita A, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: evaluation of a bioresorbable calcium phosphate cement (Ceredex) as a carrier for rhBMP-2. *J Clin Periodontol* 2004;31:796–804.
- [13] Jensen SS, Brogini N, Hjorting-Hansen E, Schenk R, Busch D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2006;17:237–43.
- [14] Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:123–45.
- [15] Schwarz F, Ferrari D, Sager M, Herten M, Hartig B, Becker J. Guided bone regeneration using rhGDF-5- and rhBMP-2-coated natural bone mineral in rat calvarial defects. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1219–30.
- [16] Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhary A, Turek T, Schaub RG, Ron E. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniofacial defects in rats. *J Biomed Mater Res* 1994;28:1127–38.
- [17] Donath K. Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 1988;34:197–206.
- [18] Schlegel KA, Rupprecht S, Petrovic L, Honert C, Srou S, von Wilmsky C, et al. Preclinical animal model for de novo bone formation in human maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:37–44.
- [19] Weijjs WL, Siebers TJ, Kuijpers-Jagtman AM, Berge SJ, Meijer GJ, Borstlap WA. Early secondary closure of alveolar clefts with mandibular symphyseal bone grafts and beta-tri calcium phosphate (beta-TCP). *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:424–9.
- [20] Szabo G, Huys L, Coulthard P, Maiorana C, Garagiola U, Barabas J, et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:371–81.
- [21] Dai LY, Jiang LS. Single-level instrumented posterolateral fusion of lumbar spine with beta-tricalcium phosphate versus autograft: a prospective, randomized study with 3-year follow-up. *Spine* 2008;33:1299–304.
- [22] Zhao J, Hu J, Wang S, Sun X, Xia L, Zhang X, et al. Combination of beta-TCP and BMP-2 gene-modified hMSCs to heal critical size mandibular defects in rats. *Oral Dis* 2010;16:46–54.
- [23] Yun JI, Wikesjö UM, Borke JL, Bisch FC, Lewis JE, Herold RW, et al. Effect of systemic parathyroid hormone (1–34) and a beta-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *J Clin Periodontol* 2010;37:419–26.
- [24] Aftab AM, Gordon CR, Pryor LS, Sweeney W, Papay FA, Zins JE. Calcium phosphate cements in skull reconstruction: a meta-analysis. *Plast Reconstr Surg* 2010;126:1300–9.

ANEXO C

Biomaterials

Guide for Authors



ISSN: 0142-9612

Imprint: ELSEVIER

Facts & Figures

Impact Factor: 7.365

5-Year Impact Factor: 8.153

Issues per year: 36

The peer review submission system for *Biomaterials* is located here: <http://ees.elsevier.com/biomat/>

The Elsevier Editorial System (EES) is a web-based submission and review system. Authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process.

Please register at: <http://ees.elsevier.com/biomat/>

Referees, whose names are not normally disclosed to the authors, will study all contributions which the Editor-in-Chief deems to be of sufficient significance and interest to be sent for peer review. The criteria by which this initial assessment is made include relevance to the scope of the journal, the originality of the work and its significance to the broad development of the field of biomaterials.

Before You Begin

All authors, especially those submitting to the journal for the first time, are encouraged to read the following document authored by the Editor in Chief, which gives an overview of the journal as well as the writing and selection process of academic publishing as it relates to *Biomaterials*: [Writing Papers for Biomaterials](#).

Ethics in Publishing: For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/authorethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and

result in a corrigendum.

Mandatory Author Declaration: In addition to uploading manuscripts and figures, it is required that the corresponding author of each manuscript uploads a separate [Author Declaration](#). All authors must sign this declaration; the corresponding author may not sign on behalf of other authors.

This Declaration covers a number of logistic and ethical issues. Please use the template given above for this Declaration. Authors may save this template, obtain the required signatures and then upload it as an integral part of their submission. The editorial process will not begin until and unless all authors have signed the declaration.

N.B.: The Author Declaration is independent of, and in addition to, the "Journal Publishing Agreement" agreement which is issued on acceptance.

Amendments to Manuscripts

In order to maintain the integrity of the scientific record, the version that is published in an issue on ScienceDirect and in print MUST be identical. One set of page proofs will be sent to the corresponding author. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return, but corrections are restricted to typesetting errors only. Proofs are NOT to be considered as drafts. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the responsibility of the corresponding author.

Copyright

All authors must sign the "Journal Publishing Agreement" before the article can be published. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with an agreement form or a link to the online version of this agreement. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Role of the Funding Source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding Bodies Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 12 or 10 pt. Files prepared in LaTeX are not supported. Figure captions should be in Arial font 9pt. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). However do use bold face, italic, subscripts, superscripts etc. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. The Editors reserve the

right to adjust style to certain standards of uniformity. The preferred style is: Surname, Initials, Department, Institution, City/State, Postal Code, Country. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

English Language: Manuscripts should be proof-read and have English language errors corrected before submission as we may have to return papers due to poor language usage. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information.

Paper Length: Authors are urged to write as concisely as possible.

Abstracts: All manuscripts are to be supplied with an Abstract of about 100-200 words in length.

Keywords: Authors must provide 4-6 keywords for indexing purposes. A keyword list can be found at the end of these instructions. ([click here](#)).

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Appendix (where necessary), Figures, Figure Captions and Tables, Supplementary Data. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. An abbreviated title for use as a running headline should also be supplied. Authors are requested to acknowledge funding sources for the work.

Units: The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and must not be used. If a large number of symbols are used it is helpful if authors submit a list of these symbols and their meanings.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to references by a number in square brackets on the line (e.g. Since Peterson[1]), and the full reference should be formatted according to the permutation of the Vancouver reference system with numbers in the text. It is suggested that authors refer to the following link for a comprehensive overview of the Vancouver reference styles: [Vancouver Reference Styles](#)

Examples of formatting follow:

1. Driessens FCM, Boltong MG, Bermudez O, Planell JA. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. *J Mater Sci: Mater Med* 1993;4:503-508.
2. Nancollas H. In vitro studies of calcium phosphate crystallisation. In: Mann S, Webb J, Williams RJP, editors. *Biomaterialization. Chemical and biochemical perspectives*. New York: VCH, 1989. p. 157-182.
3. Brown W, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. US Patent No. 4612053, 1986.

N.B.: ?Et al? must be used after the first 6 authors have been named. *Biomaterials* does not use the publication month or day.

Online Sources: References to online sources should contain at a minimum the full URL and year the source was accessed. Furthermore, if known, the following information should be given: author names, dates, reference to a source publication. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Examples of formatting follow:

1. UK House of Commons Science and Technology Committee. *Scientific Publications: Free for All? Tenth Report of Session 2003-4 Volume 1*. London: The Stationary Office Ltd. Online. 2004 July. Available from URL: <http://www.publications.parliament.uk/pa/cm200304/cmselect/cmsctech/399/39902.html>
2. Wellcome Trust. *Economic Analysis of Scientific Research Publishing*. Histon, UK: Wellcome Trust. Online. 2003. Available from URL: http://www.wellcome.ac.uk/doc_wtd003181.html

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Video Data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research.

Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed.

All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. Files can be stored on diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh).

After Acceptance

Proofs: One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author and should

be returned within 48 hours of receipt. The average amount of time between acceptance and receipt of typeset proof is 6 working days. Papers are published in print within another 8 weeks upon receipt of author corrections. Corrections should be restricted to typesetting errors. Any queries should be answered in full. Please note that authors are urged to check their proofs carefully before return.

Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader® version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemregs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Track a Paper: Authors can track their paper status online after the paper has been accepted and forwarded to the Publisher. Enter your Elsevier reference number (JBMT xxx) and the Corresponding author's family name at the following web page: <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Corresponding authors will receive an acknowledgement email from Elsevier with the reference number and the family name on it. Authors can also go to the 'track a paper' page by clicking onto the 'track a paper' button on the left hand side of the journal home page. .

Offprints: The corresponding author will be provided with a PDF of the article via email. The PDF is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Author Enquiries: For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.