

239  
21.

128



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

PAPEL DE LAS PROTEINAS MORFOGENETICAS OSEAS EN LA REGENERACION PERIODONTAL.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

CARLOS ALEJANDRO ROBLES BONILLA

ASESORES: C.D.M.O. MARIA GUADALUPE MARIN GONZALEZ  
DR. C.O.: FILIBERTO ENRIQUEZ HABIB

DECIMO NOVENO SEMINARIO DE TITULACION

MEXICO, D. F.

JUNIO 1997



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

*M. Guadalupe Marin*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Para mi sólo recorrer los caminos que tienen corazón,  
cualquier camino que tenga corazón,  
Por ahí yo recorro, y la única prueba de que vale es  
atravesar todo su largo. Y por ahí yo recorro mirando,  
mirando, sin aliento.*

*Don Juan*

*(Las enseñanzas de Don Juan)*

## *Dedicatorias*

*A ti mamá por ser tú, fuente constante de vida,  
confianza, lealtad y superación, gracias por  
todo tu amor, Te amo.*

*Papá, gracias por el amor que siempre manifiestas,  
por todo tu apoyo y tu presencia en los momentos  
difíciles. Te quiero.*

*Lila, Siempre estás en mi, siempre haces falta,  
siempre te quiero.*

*Héctor, Siempre serás para mí el verdadero hermano  
mayor, gracias por tu apoyo, tu entrega y tu fortaleza  
Te quiero.*

*Dios, Sin esta familia, todo este gozo no sería pleno  
Gracias*

## *Agradecimientos*

*Rebeca, A ti debo gran parte de mi vida profesional,  
eres base en ella, lo cual me enorgullece;  
además de ser un simbolo de constante superación.  
Gracias por ser maestra y sobretodo Amiga, todos estos  
años.*

*Sra. Edith Ruiz, Gracias por su presencia,  
por el consejo preciso y oportuno,  
en los momentos que más lo he necesitado*

*A las familias:*

*Sotres, Anzures, García-Aviles e Hidalgo-Navarro,  
que en todo momento me han hecho sentir como un hijo  
más en su hogar.*

*A los mejores amigos:*

*Lulú, Ale, Lorena, Arturo, Cecilia, Ma de los Angeles, Hugo,  
Quienes son lo más valioso que puedo tener y  
sin ellos mis metas y triunfos no tendrían sentido*

***A la Dra. Guadalupe Marín,  
por su paciencia y dedicación en la asesoría de este  
trabajo.***

***A la Dra. Alma Ayala,  
Gracias por su confianza y paciencia.***

***A la Universidad Nacional Autónoma de México,  
MI SIEMPRE ALMA MATER.***

***A la Facultad de Odontología  
Y a su gente por permitirme un espacio entre ellos.***

***CARLOS A. ROBLES BONILLA***

## **INDICE**

<b>CAPITULO I TEJIDO ÓSEO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 CARACTERÍSTICAS</b>	<b>1</b>
<b>1.2 COMPOSICIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.3 OSTEOGÉNESIS</b>	<b>3</b>
<b>1.4 MATRIZ ÓSEA</b>	<b>8</b>
<b>CAPITULO II ABSORCIÓN ÓSEA</b>	<b>13</b>
<b>2.1 REMODELACIÓN</b>	<b>13</b>
<b>2.2 EL PAPEL DE LAS PROSTAGLANDINAS</b>	<b>14</b>
<b>2.3 FACTORES MICROBIANOS EN LA ABSORCIÓN ÓSEA</b>	<b>17</b>
<b>CAPITULO III OSTEOPROMOCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>CAPITULO IV PROTEINA MORFOGENÉTICA</b>	<b>25</b>
<b>4.1 FACTORES DE CRECIMIENTO</b>	<b>26</b>
<b>4.2. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMPs)</b>	<b>27</b>
<b>4.3 ACTIVIDADES DE LAS BMPs IN VIVO</b>	<b>29</b>
<b>CAPITULO V PROTEINA MORFOGENÉTICA ÓSEA -2</b>	
<b>RECOMBINANTE HUMANO (rhBMP-2)</b>	<b>33</b>

**CAPITULO VI PROCEDIMIENTOS CLÍNICOS REALIZADOS**

<b>CON BMPs</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>43</b>

## INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo, la pérdida de hueso alveolar como secuela de la enfermedad periodontal, ha sido una de las principales preocupaciones para la odontología.

Muchos han sido los procedimientos que se han propuesto para evitar y/o reparar el daño que la enfermedad provoca en el hueso, con éxito variable.

Debemos tener claro el concepto de regeneración, el cual se refiere a la reconstrucción de la arquitectura y funcionamiento de cualquier tejido (en este caso, los tejidos de soporte dental), devolviéndole al diente, niveles de inserción muy similares a los que tenía antes de padecer la enfermedad.

En la enfermedad periodontal, en donde se ha presentado la destrucción ósea, una vez que esta ha sido tratada y aún cuando se ha hecho lo necesario para detener su avance, esto no implica que se haya logrado la formación de hueso nuevo.

Una variedad de sugerencias se han presentado con el propósito de resolver estos problemas. Muchas técnicas se han investigado in vitro, en experimentos en animales y varias de estas se han aplicado clínicamente en humanos.

Gracias a los avances tecnológicos y a las extenuantes investigaciones que se realizan en el campo de la bioquímica, es como se ha podido lograr aquello que durante mucho tiempo era imposible de conseguir: la regeneración periodontal (hueso, cemento y ligamento periodontal).

Con el advenimiento de dispositivos que promueven la regeneración, es que se han podido lograr estos objetivos, la utilización de hueso

comercialmente procesado sugiere una de las terapias con gran éxito debido al enorme potencial osteoinductor que posee.

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas, contenidas en estos preparados óseos (injertos), han llamado la atención debido al enorme potencial terapéutico que tienen, abriendo más las posibilidades de conseguir la regeneración o reconstrucción dental y craneo/maxilofacial también.

Este trabajo, tiene como objetivo la realización de una investigación bibliográfica acerca del uso de estas proteínas morfogenéticas óseas, en investigaciones tanto *in vitro*, como en animales y algunos humanos. Para conocer la importancia de estos factores en la regeneración de los tejidos periodontales.

## CAPITULO I TEJIDO ÓSEO

### 1.1 CARACTERÍSTICAS

El hueso, como los demás tejidos conectivos, están formados por células, fibras y sustancia fundamental, pero a diferencia de los otros, sus componentes extracelulares están calcificados y lo convierten en un tejido duro, firme e idealmente adecuado para su función de soporte y protección.

El hueso tiene una notable combinación de propiedades físicas: alta resistencia a la tracción y a la compresión, además de cierta elasticidad y una ventaja más con respecto al ligero peso que presenta, a pesar de su fuerza y dureza, el hueso es un material vivo y dinámico, el cual es renovado continuamente y experimenta una permanente reconstrucción durante la vida del individuo. A causa de esta reconstrucción interna continua y de su capacidad de responder a estímulos mecánicos, puede ser estimulado por medio de procedimientos quirúrgicos y prótesis ortopédicas. El hueso responde también de forma sorprendente a las influencias metabólicas, nutritivas y endocrinas. (6)

### 1.2 COMPOSICIÓN

El hueso es un tejido conectivo mineralizado especializado que contiene un 33% de matriz orgánica, la cual incluye un 28% de colágena de tipo I. El restante 5% de la matriz orgánica es proteína no colágena, incluyendo osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética ósea, proteoglicano óseo y sialoproteína ósea. La matriz orgánica está impregnada por una hidroxiapatita pobremente cristalizada y deficitaria en calcio, que constituye el 67% restante. (7)

Además de las propiedades antes mencionadas, el hueso es también un importante reservorio de minerales. Sistemáticamente, se encuentra finamente controlado por factores hormonales; y localmente, por fuerzas mecánicas (incluyendo el movimiento de los dientes) y por condiciones de tipo piezoeléctrico.

Aunque las cifras arriba mencionadas sobre la composición del hueso son aproximadas, la relación entre los componentes duros y blandos es suficiente como para asegurar un cierto grado de elasticidad. El hueso resiste a fuerzas compresivas mucho mejor que a las fuerzas tensionales. También resiste a las fuerzas aplicadas a lo largo del eje de su componente fibroso; debido a esto, las posibles fracturas óseas ocurren más fácilmente como respuesta a tensiones y cortes (7).

Como característica, todos los huesos presentan una capa externa densa de hueso compacto y una cavidad medular central. En el hueso vivo esta cavidad está ocupada por una médula roja o amarilla. La cavidad se encuentra interrumpida a lo largo de su trayecto, por una red de hueso trabecular. Estas trabéculas internas actúan como varillas de refuerzo y soportan a la cortical de hueso compacto, externa y más gruesa.

Histológicamente está compuesto por capas microscópicas o laminillas, que en el hueso compacto se encuentran estrechamente empaquetadas. Se reconocen tres tipos de laminillas 1) Circunferenciales, rodeando todo el hueso del adulto, formando su perímetro, 2) concéntricas, las cuales conforman gran parte del hueso compacto y forman la unidad metabólica básica del hueso compacto llamada osteón. El osteón es un cilindro de hueso, generalmente orientado a lo largo del eje mayor del hueso. Y por último las laminillas intersticiales.

### 1.3 OSTEOGÉNESIS

La osteogénesis u osificación se refiere al desarrollo del hueso en condiciones normales de formación y remodelación al que está sometido. El mecanismo por el que se lleva a cabo la osteogénesis, ocurre en dos sitios generales:

- 1) Directamente en el mesénquima vascularizado, y
- 2) En las regiones de osificación centrales de los precursores cartilaginosos de los huesos futuros.

Las células osteógenas también llamadas osteoprogenitoras, son pequeñas, ahusadas y están presentes en toda la superficie del hueso vivo que no se resorbe como componentes de dos membranas: 1) en la capa más profunda del periostio que es la capa que cubre la superficie externa de cualquier hueso, y 2) en el endostio, que reviste todas superficies internas de todas las cavidades intraóseas.

Las células osteógenas también son un componente del estroma de la médula ósea que llena las cavidades de los huesos.

Las células osteógenas del periostio en reposo presentan diferenciación escasa. No obstante, su posición relativa en esta membrana es bien conocida, y los datos de su proliferación y diferenciación, en respuesta a un estímulo activador, ( como fractura, por ejemplo ), pueden apreciarse con facilidad en un corte de hueso.

Cuando las circunstancias hacen que las células osteógenas de periostio o endostio proliferen, estas células dan origen a **osteoblastos** en las regiones ampliamente vascularizadas y a **condroblastos** en las avasculares. Algunas de

sus descendientes se reproducen sin diferenciarse más, lo que garantiza la permanencia de un fondo de células osteógenas para su uso futuro. De tal manera constituyen una población de *células madre bipotenciales* que pueden originar hueso o cartilago según se requiera (8)

Por ejemplo, en los huesos craneales y planos de la cara, así como en el maxilar y las clavículas, se desarrollan directamente en áreas de mesénquima vascularizado por el proceso de *osificación intramembranosa* cuyo nombre se deriva de la capa de mesénquima en que tiene lugar, tal desarrollo se considera como una membrana embrionaria de tejido conectivo. Los demás huesos de los esqueletos axial y apendicular también se originan en el mesénquima, pero su desarrollo es en gran parte *indirecto* e implica un proceso mucho más complejo. (8)

La osificación intramembranosa se inicia a fines del segundo mes de la gestación, en el sitio en donde se desarrolla inicialmente hay una capa de mesénquima laxo, que antes de la osificación tiene aspecto de célula estrellada, ampliamente separada y que se tiñe de color pálido, con prolongaciones citoplasmáticas que las conectan entre sí. Después, se inicia el desarrollo de un *centro de osteogénesis* acompañado de capilares que crecen en el mesénquima.

Las células mesenquimatosas de este centro, son redondas y basófilas, además presentan prolongaciones levemente más gruesas que las conectan entre sí. Las células osteoprogenitoras están activas durante el crecimiento normal de los huesos y pueden ser estimuladas durante toda la vida adulta para la cicatrización interna del hueso, en la cicatrización de las fracturas o en la reparación de otras formas de lesión. Bajo estas condiciones, se multiplican y se transforman en células formadoras de hueso. Tales células pasan

---

imperceptiblemente por la etapa de *célula osteógena* y, a continuación se diferencian en *osteoblastos*, las cuales son células mononucleares que sintetizan proteínas óseas colágenas y no colágenas y dan origen a la matriz orgánica del hueso al medio circundante de estos, formando una capa celular sobre la mayor parte de la superficie del hueso. Una vez que las células quedan rodeadas en la matriz y ésta se calcifica la célula recibe el nombre de *osteocito*.

La matriz orgánica que producen los osteoblastos también se forma alrededor de las prolongaciones que los conectan entre sí. Por lo tanto, una vez mineralizada, la matriz contiene a los conductillos. Los angostos espacios que hay entre las prolongaciones de los osteocitos y las paredes de los conductillos que los circundan se llenan de líquido intersticial derivado de los capilares situados por fuera de las islas de hueso en formación.

La calcificación de la matriz se inicia pronto, pero los osteocitos todavía pueden obtener nutrientes y oxígeno por difusión a lo largo de los conductillos del hueso.

La primera masa pequeña de matriz ósea recién producida adopta la forma irregular de una diminuta *espícula* que se alarga poco a poco hasta constituir una estructura anastomosante más grande, conocida como *trabécula*. El crecimiento continuo origina la formación de una red anastomosante de trabéculas que es característica del tipo de tejido óseo conocido como *hueso esponjoso* (por ejemplo hueso parietal). Cuando ha terminado la formación de este tipo de hueso, son pocas las células derivadas del mesénquima que no se han diferenciado. Sin embargo, antes de que desaparezcan éstas, dejan una descendencia de *células osteógenas* aplanadas y delgadas, en las partes de las superficies trabeculares no ocupadas por osteoblastos. En regiones muy vascularizadas, estas células osteógenas dan origen a los osteoblastos formadores de tejido óseo, mientras que

en las áreas en las que no se establece el riego sanguíneo capilar se originan condroblastos y en consecuencia, cartilago. Las células osteógenas no sólo son *bipotenciales*, sino que también se *reproducen*, de modo que constituyen una población de *células madre* capaces de dar origen a hueso o cartilago. Dado que persisten en la edad adulta, constituyen una fuente potencial de nuevo tejido para la reparación de hueso fracturado, según el caso (8)

La población de células óseas que cubre la superficie de las espículas y trabéculas del hueso en desarrollo, incluyen osteoblastos y células osteógenas. Éstas últimas, proliferan en ambientes muy vascularizados, de modo que pueden dar origen a osteoblastos y, por consiguiente, a que se depositen nuevas capas de matriz en las superficies óseas preexistentes. Por añadidura, este proceso no modifica la posición relativa de las células osteógenas. Este mecanismo de crecimiento por aposición produce la acumulación de una capa de tejido óseo a la vez.

Al mismo tiempo que se deposita nuevo tejido óseo en algunas superficies, en otras, se elimina el preexistente donde ya no es necesario. Esta eliminación progresiva del tejido óseo se inicia tan pronto se deposita el mismo, y evita acumulación innecesaria. Las células encargadas del proceso llamado *resorción ósea* son los *osteoclastos*, los cuales son caracterizados por ser células multinucleares especializadas que tienen la capacidad de erosionar las superficies óseas, estas células son de una importancia excepcional, son células gigantes de 20 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y que pueden tener hasta 50 núcleos, se encuentran en áreas de absorción ósea.

Los osteoclastos se encuentran en cavidades poco profundas de la superficie del hueso, llamadas *Lagunas de Howship*.

El resultado neto de que se deposite tejido óseo en algunos sitios y se resorba en otros es la *remodelación* de las trabéculas. Estos dos procesos ( el crecimiento por aposición y la resorción ósea ), permiten que los huesos conserven su forma y tamaño o los modifiquen en la medida necesaria durante la vida pre y postnatal.

La osteogénesis no tiene lugar sin vascularización previa. Los estudios iniciales realizados por Ham sobre la aportación del periostio a la reparación de fracturas hicieron que se observara que las únicas células osteógenas que dan origen a tejido óseo son las situadas cerca de capilares sanguíneos. El riego sanguíneo capilar de una región constituye su fuente principal de oxígeno, por lo que en un principio se creyó que el determinante primordial que inducía la diferenciación de las células osteógenas en osteoclastos era la alta tensión local de oxígeno, y que el hecho de que fuera baja daría por resultado su diferenciación en condroblastos. Sin embargo, después resulto evidente que hay otros factores, como la compresión. Así se ha apreciado que una combinación de las fuerzas de compresión y de tensión de oxígeno alta y baja fomenta la formación de hueso y cartilago respectivamente ( Bassett y Herrmann, 1961 ).

Es indudable que el oxígeno no es el único componente que llega por los capilares. Hay razones de peso para suponer que éstos últimos aportan de manera continua líquido intersticial fresco, nutrientes y algunos factores de diferenciación o crecimiento que pudieran necesitarse para que se efectúe la osteogénesis (8).

#### 1.4 MATRIZ ÓSEA

La matriz es generalmente referida como un tejido osteoide, estrictamente hablando. Solamente cuando se ha mineralizado puede decirse que es un tejido óseo. El osteoide es producido por osteoblastos (y usualmente, pero no siempre), como un reflejo de la formación de nuevo tejido óseo. Esto es gracias a la colágena, glicosaminoglicanos, agua y osteocitos, incluidos en la matriz ósea.

La sustancia intersticial del hueso está constituida por dos componentes principales: uno es la matriz orgánica, y el otro lo constituyen las sales inorgánicas. Cada uno constituye aproximadamente el 50 % del peso seco de la matriz.

La matriz orgánica está constituida por fibras colágenas embebidas en sustancia fundamental en un 95 % con una periodicidad de 640A<sup>o</sup>, 1% de glicosaminoglicanos, 2% de agua, 2% de células óseas (osteocitos) (10).

Por otra parte, presenta con gran frecuencia resistencia a la tracción, por lo que se requiere un contenido de colágena mayor que el del cartilago. En consecuencia, aproximadamente 90% del contenido orgánico de la matriz ósea es colágena, en contraste con apenas 40 a 70 % del peso seco de la matriz del cartilago. Gran parte de la colágena del hueso es de tipo I, aunque recientemente se ha informado también de pequeñas cantidades de colágena tipo V.

Aproximadamente el 10 % restante del contenido orgánico de la matriz ósea es un componente amorfo que contiene sulfato de condroitina y ácido hialurónico (que potencialmente guarda relación con las proteínas, en los agregados de proteoglicanos ), además de algunas proteínas y glucoproteínas no colagenasas.

La *osteonectina* es una proteína específica de los huesos, que sirve para fijar la colágena de la matriz a los minerales de los huesos. La *osteocalcina* es una proteína fijadora de calcio que, según se piensa, participa en la calcificación de los huesos. Además la matriz ósea también absorbe cantidades identificables de albúmina, del líquido intersticial, durante la formación de los huesos (8)

La colagena del hueso, como la del tejido conectivo común, aparecen en forma de fibras de estricción transversal, de 50 a 70nm de diámetro, con una periodicidad de 67nm. La colágena del hueso es, como se menciono anteriormente, predominantemente del tipo I, pero difiere de este tipo de colágena en algunas propiedades físicas, por ejemplo en la peculiaridad de poseer una mayor adherencia intermolecular.(6)

La osteogénesis generalmente incluye la formación de matriz ósea orgánica y su calcificación subsecuente. Sin embargo también es posible emplear los términos osificación y osteogénesis en forma más restringida, para denotar la producción de células formadoras de hueso y la secreción subsecuente de matriz ósea orgánica. Por añadidura, en condiciones dadas ocurre calcificación ectópica, incluso en tejidos blandos. Es posible la calcificación en ausencia de la osificación, mientras que esta última puede tener lugar sin llegar a la etapa de calcificación.

Una zona de tejido osteoide persiste alrededor de cada osteoblasto y osteocito durante la calcificación normal. Un frente de calcificación, que se extiende a lo largo del límite entre el tejido osteoide y el hueso calcificado circundante, indica donde tiene lugar la calcificación.

Como se mencionó anteriormente, la matriz debe gran parte de su resistencia a la abundancia de colágena y los minerales óseos ( casi 70% de su peso húmedo ). La cuestión del por qué los tejidos del esqueleto y dientes son los

únicos que adquieren dicho alto contenido de minerales, en condiciones normales, es algo que durante mucho tiempo, ha intrigado a investigadores.

El hueso no calcificado aún, se le conoce como *tejido osteoide*. Así, cuando el producto combinado de los iones de calcio y fosfato en el líquido tisular es demasiado bajo, ocurre la osificación sin calcificación, lo que origina la producción de tejido osteoide pero no la de hueso propiamente dicho. Esto tiene importancia por ejemplo para médicos y odontólogos, el hecho de hacer difícil el reconocimiento del tejido osteoide en radiografías, puesto que en estas últimas sólo se observa con claridad los huesos calcificados.

Cierto es que el hueso debe su resistencia al alto contenido de minerales que lo constituye. Como se dijo anteriormente el hueso pasa por dos procesos distintos durante su formación, como lo es la osificación por un lado y la calcificación por otro, brevemente se explicara como se logra la calcificación.

Básicamente, la calcificación consiste en la formación de depósitos extracelulares de hidroxapatita. Gran parte de las primeras investigaciones sobre la calcificación se basaron en el supuesto de que hay sólo un mecanismo universal subyacente a la mineralización de hueso y cartilago, que también explicaría la calcificación de los tejidos blandos que se degeneran. Sin embargo existe aún una gran controversia al respecto.

Actualmente, se piensa en la posibilidad de que en lugar de un sólo conjunto de condiciones que se aplican en toda situación, diversos factores actúen de manera sinergista o intercambiable para activar la mineralización. Al parecer, en condiciones normales, las concentraciones de calcio y fosfato en sangre y líquido intersticial es suficiente para que el fosfato de calcio se cristalice o precipite de manera espontánea. El factor decisivo es el producto iónico ( $\text{Ca}^{2+}$ ) x (P), al que comúnmente se hace referencia como producto  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando este

producto iónico aumenta como resultado de la acción de diversos factores locales. el fosfato de calcio se separa en la fase sólida y después experimenta transición de dicha e interconversión en diversas formas cristalinas opcionales de complejidad variable. Una vez que se inicia la formación de microcristales de hidroxiapatita, estos pueden cursar por dos etapas: unos continúan creciendo y otros catalizan la cristalización adicional del fosfato de calcio, incluso en los sitios en que el producto iónico mencionado no es mayor que la concentración plasmática respectiva (8)

Las dos teorías de aceptación más generalizadas sobre la forma en que aumenta dicho producto iónico en el nivel local, no son en realidad mutuamente excluyentes, es decir, son aplicables una u otra, o ambas según las circunstancias prevalecientes. Ambas teorías implican la captura de  $Ca^{2+}$  y P en concentraciones que desencadenarían la formación de depósitos de fosfato de calcio en la fase sólida, seguido de la conversión a hidroxiapatita cristalina. Sin embargo, en una de las teorías se plantea que un componente celular es la causa directa de la nucleación, mientras que la otra se basa en el concepto de que tal nucleación depende de propiedades específicas de algún componente macromolecular, de origen celular, de matriz orgánica madura.

Hasta hace poco, la atención se centraba casi exclusivamente en estructuras de origen celular, llamadas vesículas de la matriz. Éstas son pequeñas estructuras limitadas por membranas, que se han observado libres en la matriz, de muchos sitios donde se tiene lugar la osificación. Al parecer surgen como protuberancias redondeadas de la membrana plasmática de los osteoblastos. Éstas vesículas contienen enzimas, las cuales podrían actuar como iniciadoras de la calcificación.

La primera enzima que se supuso participaba en la calcificación fue la *fosfatasa alcalina*, ya que se presenta en casi todos los sitios donde existe la calcificación. Se ha comprobado que esta enzima hidroliza una amplia gama de sustratos orgánicos fosfatados y que reside principalmente en las vesículas de la matriz.

Las vesículas de la matriz también acumulan calcio y es posible que su membrana posea sitios fijadores apropiados para la nucleación de los cristales de hidroxapatita. Se ha planteado que la base de tal nucleación podrían ser los sitios fijadores de  $\text{Ca}^{2+}$  y P de las moléculas ácidas de fosfolípidos o proteolípidos, en las membranas de las vesículas. Así también las mitocondrias y otros componentes macromoleculares contribuyen al almacenamiento del calcio y la calcificación ósea.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la matriz ósea presenta un 90% aproximado de contenido orgánico en su estructura, como pueden ser colágena, proteínas, etc.

Es factible que una proteína de la matriz ósea induzca la formación de células osteógenas. El tejido óseo no sólo se reproduce durante la reparación de una fractura, sino que también está sometido a un proceso de remodelación a lo largo de toda la vida. El número necesario de células osteógenas para tales fines es tan grande que, a menos que se formaran nuevas células, podría disminuir su población. Dos conjuntos de datos hacen pensar que estas últimas se derivan de células progenitoras mesenquimatosas más primitivas durante la vida posnatal.

## **CAPITULO II**

### **ABSORCIÓN ÓSEA**

#### **2.1 REMODELACIÓN**

Además de la remodelación estructural que acompaña al crecimiento de los huesos, estos se adaptan continuamente a los factores estresantes prevaletentes mediante la remodelación de su estructura interna, además de una serie de factores locales que pueden intervenir directa o indirectamente en dicho proceso.

En condiciones normales, los cambios notables en dichos factores pueden originar la formación de depósitos o la resorción decompensatoria de hueso compacto, así como cambios en la alineación de las trabéculas óseas en el hueso esponjoso.

Los huesos están sujetos a un proceso de remodelación interna continua a lo largo de su vida, porque el tejido óseo se debilita y algunos osteocitos mueren, lo que hace indispensable en cierta medida su reposición diaria. Los osteoclastos absorben parte del hueso en todo momento y dicho tejido es sustituido por otro nuevo del mismo tipo. Este último se deposita en forma de osteóns en los túneles (cavidades) de resorción que originan los osteoclastos. En general, es posible diferenciar estos túneles de los conductos de Havers o Volkman, primeramente gracias a sus bordes irregulares y en segunda, por la presencia de osteoclastos en lugar de osteoblastos o células osteógenas. No obstante, las células osteógenas y los osteoblastos invaden rápidamente las cavidades de resorción y las llenan de nuevas osteonas (8)

Es un hecho que la resorción ósea continúa a lo largo de la vida como parte intrínseca del proceso de remodelación. Sin embargo, la mayor parte de las

veces es escasa la variación de la masa ósea total de un día para otro en la edad adulta, lo que hace suponer que, que en tales situaciones, un mecanismo regulador local ajusta la cantidad de hueso nuevo que se forma a la del hueso viejo que se pierde por medio de la resorción. En recientes investigaciones, se ha comprobado que el hueso en resorción de hecho libera un *factor de acoplamiento* macromolecular, probablemente una proteína, que provoca la formación compensatoria de depósitos de nueva matriz ósea por parte de los osteoblastos. Por lo tanto hay razones de peso para pensar que las moléculas indicadoras, que producen las células formadoras de hueso y se liberan durante la degradación de la matriz ósea, poseen la capacidad de acoplar directamente la formación compensatoria de de hueso a la resorción ósea, con lo que se origina la sustitución de hueso específicamente (8)

De tal manera, en condiciones generales y normales, los estímulos causantes de resorción originan un *aumento acoplado en la formación de hueso*, lo mismo pasa en el recambio óseo, en vez de provocar *pérdida de masa ósea*. En los trastornos clínicos que se acompañan de pérdida ósea neta, dicho mecanismo de acoplamiento supuestamente no funciona de manera adecuada.

## 2.2 EL PAPEL DE LAS PROSTAGLANDINAS

Hasta el momento, los osteoclastos parecen ser los únicos responsables de la resorción ósea y los osteoblastos parecen participar también en la regulación de éste proceso. Los osteoblastos actúan posiblemente como transductores de mensajes celulares los cuales coordinan las señales hormonales y liberan a los factores de resorción.

Dziak y col, en 1984 realizaron unos estudios en células osteoblásticas de cráneo neonatal de ratón y en la colágena de estos roedores con células

osteoblásticas de osteosarcoma, sugirieron que la síntesis endógena de *prostaglandinas E2* (PGE2) podrían ser un importante regulador de la resorción. Los factores que controlan la producción de PGE2 en las células osteoblásticas *in situ*, aún no es clara. Sin embargo, los datos que obtuvieron, revelan que las *prostaglandinas* actúan como un factor de acoplamiento entre la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos, además de servir como un potente regulador del metabolismo óseo (11)

Las prostaglandinas son unos ácidos grasos formadas de 5 anillos y 2 cadenas alopáticas. Se forman esencialmente a partir de ácidos grasos polinsaturados y parece ser que se localizan en todo el cuerpo. La mayor parte de las prostaglandinas, desarrollan actividades biosintéticas dentro o de manera adyacente a la membrana celular.

Las prostaglandinas tienen una gama sorprendente de actividades biológicas, las pruebas actuales señalan que pueden ser consideradas importantes en los mecanismos involucrados en las lesiones periodontales, así como en muchas otras formas de inflamación crónica. Las prostaglandinas se encuentran en grandes concentraciones en la encía humana inflamada, y en varios exudados inflamatorios, también han sido involucradas tanto como mediadoras como moduladoras de diversos procesos biológicos, incluyendo la inflamación aguda y crónica. (12)

Las prostaglandinas pueden ser metabolizadas por ambas formas, endógena y exógena vía ácido araquidónico, tienen un patrón de ciclooxigenasa tanto para las PGE2 y F2 así como para las Prostaciclina (PGI1). Estas prostaglandinas han sido ampliamente implicadas en la regulación del metabolismo de las células óseas. Ellas estimulan directamente la resorción ósea osteoclastica por medio de un proceso que es inhibido por la calcitonina y que

relativamente disminuye las altas concentraciones de colágena formadora de hueso. Las prostaglandinas han sido propuestas como mediadores de la hipercalcemia y el incremento de la resorción ósea en ciertas enfermedades malignas de animales y humanos, en la pérdida de hueso en enfermedades periodontales crónicas y artritis reumatoide, entre otras. (11)

De todos los procesos biológicos de las prostaglandinas, su papel en la inducción de la resorción ósea es quizá el de mayor importancia para el entendimiento de la lesión periodontal inflamatoria. La morfología de la resorción inducida es similar a la observada *in vivo*, y la reacción de los cultivos a la hormona paratiroidea, vitamina A, metabolitos de vitamina D, tirocalcitonina y el disosfenato son comparables a las observadas en el hueso. Las concentraciones de prostaglandina PGE1 o PGE2 en la gama de  $10^{-10}$  a  $10^{-6}$  M induce una resorción sorprendente en estos cultivos. Estos efectos son inhibidos por la tirocalcina y el cortisol y parecen ser mediados por el cAMP. (12)

Dziak explica que hay un incremento en la síntesis endógena de prostaglandinas en un cultivo de hueso largo de rata en presencia de complemento y anticuerpos, además también las fuerzas mecánicas incrementan los niveles de prostaglandinas en hueso y de esta manera desempeñan un papel importante en la remodelación.

La información sobre la naturaleza de la síntesis de prostaglandinas de las células y la respuesta en los incrementos de los niveles han sido difíciles de obtener, debido a que se logran de hueso intacto, pero en años recientes se ha aislado y caracterizado a las células que repueblan, esto ha ayudado a aclarar el posible mecanismo de acción de las prostaglandinas sobre el hueso. Por ejemplo se ha investigado que las células del osteosarcoma con características osteoblástica sintetizan relativamente grandes cantidades de PGE2, las cuales

pueden actuar como un factor de resorción, se han realizado estudios donde la síntesis de prostaglandinas y la acción en el enriquecimiento de la población de células osteoblásticas y osteoclasticas son obtenidas por una adaptación en la secuencia de la digestión de colagenasa con la técnica de Luben y col. Los estudios de Dziak revelan que las células osteoblásticas sintetizan significativamente grandes cantidades de PGE2 que enriquecen a la población osteoclastica.(11).

Estos estudios sugieren que la síntesis endógena de las prostaglandinas quizá regulen los movimientos cálcicos cruzando las membranas de las células osteoblásticas. Quizá exista un control negativo en la retroalimentación entre los efectos en la compresión de calcio de las prostaglandinas exógenas y la síntesis de las prostaglandinas endógenas. Cuando la síntesis de las prostaglandinas endógenas es baja, las células responden a las prostaglandinas exógenas con un incremento en el calcio comprimido, pero cuando la síntesis endógena es alta, la respuesta en la regulación del calcio sérico para los niveles exógenos de prostaglandinas, es bajo.

### **2.3 FACTORES MICROBIANOS EN LA ABSORCIÓN ÓSEA**

Varios mecanismos pueden intervenir solos o de manera conjunta para producir la destrucción de los tejidos periodontales. Estos mecanismos de destrucción pueden ser clasificados como directos o indirectos. los mecanismos *directos* resultan de las acciones de los componentes bacterianos que dañan de forma directa a los tejidos. En contraste, los mecanismos *indirectos* son las respuestas destructivas del huésped, desencadenadas con frecuencia por los microorganismos infectantes. (13)

Los factores liberados por los microorganismos dañan directamente a los tejidos, estas sustancias pueden incluir a las enzimas histolíticas, las endotoxinas, las exotoxinas como

pueden ser cierto tipo de colagenasas entre otras. Los componentes bacterianos como las endotoxinas, el ácido lipoteicoico, y otras moléculas son poderosos estimuladores de la resorción ósea.

Aunque generalmente se acepta que las sustancias bacterianas dentro de la placa dental constituyen mas bien el principal agente etiologico causante de la enfermedad gingival y periodontal, no quedan claros algunos factores, como pueden ser la susceptibilidad del huésped ante algunas cepas de microorganismos, la prevalencia, extensión y severidad de la enfermedad, la edad y los factores intrínsecos, entre otros.

En la realidad, los datos existentes en la actualidad señalan que las sustancias derivadas de los microorganismos son patogénicas debido a que poseen la capacidad de activar ciertos mecanismos de defensa del huésped que sirvan como amplificadores e inducen a daños tisulares

Las sustancias derivadas de los microorganismos existentes en la bolsa periodontal parecen tener la capacidad de atravesar el epitelio de unión y entrar a los tejidos, tanto a los normales como a los alterados patológicamente, estas sustancias pueden reaccionar con diversos tipos de células.

Los individuos con enfermedad periodontal tienen células circulantes que pueden presentar estas reacciones, incluyendo la producción de linfocinas y la placa microbiana existente.(12)

Al establecerse la enfermedad, los monocitos pueden activarse, producir y secretar enzimas lisosómicas y colagenasas. Estas sustancias poseen la capacidad de inducir cambios destructivos dentro de la sustancia del tejido conectivo, característica de la enfermedad. Además de activar macrófagos con la capacidad de producir prostaglandinas, y por lo tanto contribuir a la resorción ósea, disminuir los niveles de formación de hueso e inhibir la actividad de los fibroblastos.

Las repercusiones destructivas indirectas, o mediadas por el huésped en los tejidos resultan de la inducción, estimulación o activación de las células del huésped o de factores humorales que después ocasionan destrucción del tejido periodontal del lugar. Muchos de estos son procesos inmunitarios que producen alteraciones patológicas de los fibroblastos, activación de macrófagos con liberación de colagenasas y otras enzimas hidrolíticas, activación de linfocitos, modulación del crecimiento de fibroblastos, y síntesis de colágena, así como resorción ósea estimulada por productos de las células mononucleares activadas, como la interleucina-1, prostaglandinas, factor de necrosis tumoral (TNF) y otros factores endógenos de resorción ósea

La remodelación ósea en estado de salud está controlada por varias hormonas, entre ellas la paratiroidea, los metabolitos de la vitamina D, la calcitonina, los esteroides sexuales, los glucocorticoides y las hormonas del crecimiento. La resorción ósea también se encuentra influida por factores locales como el estrés y las prostaglandinas. (13)

La resorción ósea como un proceso patológico se presenta cuando se rompe el equilibrio entre la resorción y el depósito, prevaleciendo la primera. Cuando la proporción de pérdida excede a la de la formación en una zona localizada, ésta es causada generalmente por factores locales, entre los que se

incluyen las prostaglandinas y las citocinas IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF). La resorción ósea localizada, mediada por prostaglandinas o por citocinas ocurre en la enfermedad periodontal cuando la pérdida de hueso de soporte alveolar parece ser muy independiente de la renovación sistémica del hueso.

Varios mecanismos participan en la resorción ósea en la enfermedad periodontal. La mayor parte de cambios óseos que se observan en la enfermedad periodontal se relacionan con la liberación de factores que estimulan la resorción ósea, inhibir el depósito de hueso alveolar. Entre estos factores locales se encuentran los relacionados con bacterias periodontopáticas y otros componentes de la placa, los derivados del ácido araquidónico y los modificadores de la respuesta biológica, como la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales son estimulados durante la inflamación periodontal. (13)

### CAPITULO III

## OSTEOPROMOCIÓN

Como se mencionó anteriormente, es factible que una proteína de la matriz ósea induzca a la formación de células osteógenas, el tejido óseo no sólo se reproduce durante la reparación de una fractura, sino que también está sometido a un proceso de remodelación a lo largo de su vida. El número necesario de células osteógenas para tales fines es tan grande que, a menos que se formaran nuevas células podría disminuir su población.

Existen una serie de datos que provienen principalmente de las investigaciones de Urist y col (1980-85), así como las de Reddi et al (1972) (8); Los estudios de este último demostraron que el polvo de hueso desmineralizado tiene la capacidad de inducir la formación de nuevo tejido óseo *in vivo*. Las investigaciones de Urist lograron identificar y caracterizar parcialmente una proteína o glucopolipéptido no colagenoso relacionado, en concentraciones bajas, con la colágena de la matriz ósea y la dentina, además de que se libera durante la resorción ósea. Le llamaron *Proteína Morfogénica Ósea* (BMP), indicando con ello que induce la formación de hueso totalmente nuevo. Este nombre también tiene implícito el hecho de poseer la capacidad de iniciar lo que se denomina *fase morfogenética* del desarrollo óseo, que incluye migración, agregación y proliferación de células mesenquimatosas y su diferenciación en células osteógenas. Uno de los sitios en que persisten tales células mesenquimatosas primitivas es el tejido conectivo laxo perivascular de los capilares y otros vasos sanguíneos de poco calibre. También resulta interesante que la concentración de ésta proteína en la matriz ósea disminuye con la edad, fenómeno que guarda paralelismo cronológico con la reducción de la densidad ósea que acompaña al

envejecimiento. Los datos revelan que una respuesta inmunitaria a la BMP reduciría la formación de hueso en ciertas variantes de osteoporosis. (8)

El principal obstáculo para la cicatrización, y la formación de nuevo hueso, es que en contraste con la osteogénesis, la formación de tejido conectivo se presenta con mayor rapidez. Por lo que el crecimiento de tejido blando puede alterar o evitar totalmente que tome lugar la osteogénesis en un defecto o un área de la herida, lo cual dará como resultado aberraciones anatómicas y alteraciones funcionales, que en muchas ocasiones requieren de otro procedimiento quirúrgico para su corrección.

En la enfermedad periodontal por ejemplo, en donde se ha presentado la destrucción ósea, una vez que esta ha sido tratada aún cuando se ha hecho lo necesario para detener su avance, esto no implica que se haya logrado la formación de nuevo hueso.

Una variedad de sugerencias se han presentado con el propósito de resolver estos problemas. Muchas técnicas se han investigado en experimentos con animales y varias de estas se han aplicado clínicamente. Por lo que se han reportado variados éxitos con los diferentes métodos para mejorar la cicatrización ósea y la capacidad regenerativa.

El uso de medios físicos para sellar un sitio anatómico - el sitio donde se intenta que el hueso se forme, con el fin de que otros tejidos (principalmente el conectivo), interfieran con la osteogénesis, así como la formación directa de hueso se le denomina *osteopromoción*. (14)

La búsqueda de un material ideal para la creación de un injerto data de antes de siglo, en la actualidad se han logrado injertos de hueso y médula, así

como de materiales sintéticos, tal es el caso de la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico.

La importancia relativa de las fases orgánica e inorgánica del hueso en la regeneración fue reportada por Glimcher y Krane en 1968. Urist y col. en 1967 quienes describieron una preparación de hueso descalcificado en combinación con proteínas morfogenéticas que inducían de manera activa la formación de nuevo hueso (13) Ellos encontraron que si el hueso reducido a partículas de tamaño adecuado se desmineralizaba, ciertas proteínas están disponibles para inducir la formación de hueso nuevo cuando el injerto está en contacto con el hueso del sitio receptor. Numerosos estudios han indicado que las células de la médula ósea en hueso esponjoso e injertos de médula pueden crecer para formar nuevo hueso o estimular su formación.

El efecto inductor de los diversos materiales para injerto se puede categorizar bajo tres títulos. El primero como ya lo vimos en capítulos anteriores es la *osteogénesis*, la cual ocurre, en el caso de utilizar un injerto, cuando las células de este último sobreviven al trasplante y contribuyen en el proceso de reparación.

El segundo término es la *osteoinducción*, la cual ocurre cuando dos o más tejidos de diferente naturaleza o propiedades se relacionan íntimamente, dando como resultado alteración en el curso del desarrollo de tejidos. (13) Urist y col. (1967) notaron una mejoría en los efectos osteoinductores cuando el hueso estaba desmineralizado para exponer las proteínas de la matriz. El hecho de que los injertos de hueso esponjoso estén mejor dispuestos para contribuir a un efecto activo osteogénico pueden reflejar su mayor superficie en relación a la masa, más que la acción de cualquier componente celular. (Farley y col) (13).

La osteoconducción o efecto de "entrelazado" ocurre con el crecimiento interno de capilares en el tejido conectivo nuevo. El patrón proporcionado por el injerto puede encontrarse con diversos injertos óseos o no óseos como con los materiales sintéticos. Con los injertos de hueso, este proceso es seguido de resorción simultánea del hueso "entrelazado" sintético y la deposición de lámina ósea nueva.

" Los estudios en animales proporcionan información útil en cuanto a que pueden indicar el potencial de un injerto para producir resultados favorables. Cerca del 75% de estudios realizados en las últimas décadas, comparan los procedimientos de injertos y los que no utilizaron, en defectos óseos periodontales creados artificialmente en animales, obteniendo resultados favorables en aquellos donde se colocaron injertos comparativamente con aquellos donde se dejaron solos. Sin embargo, todos los experimentos con animales deben verse con cierto grado de precaución, y los resultados pueden no extrapolarse directamente a los seres humanos. Sólo cuando se haya probado en seres humanos controlados con evaluaciones clínicas se podrá valorar de manera objetiva el potencial verdadero de cualquier material óseo de injerto." (13)

**CAPITULO IV**  
**PROTEINA MORFOGENÉTICA**

El hueso es un tejido dinámico y viviente, con una capacidad substancial para la regeneración, formación y resorción. Está involucrado en la regulación del cálcico sérico, y es capaz de remodelarse con el fin de responder a los cambios de tensión física a los que está sometido, tratando de reparar microfracturas y fracturas esenciales dentro de su estructura. (1)

Aún cuando la regulación hormonal sistémica de los diferentes tipos de células y funciones están bien comprendidas, la regulación local de las células óseas por los factores de crecimiento, han tenido una creciente atención y parecen convertirse en un foco de investigación en las décadas venideras.

Los avances en biología molecular han incrementado los conocimientos acerca del funcionamiento de las células de crecimiento y de las interacciones entre las matrices extracelulares y las células en cicatrización (15). Los reportes han evaluado o discutido los posibles efectos de los modificadores en fibroblastos gingivales, ligamento periodontal o células de hueso alveolar ya sea in vivo o in vitro. Inclusive a los datos con respecto a los efectos de cada agente en las heridas periodontales, son escasos.

#### 4.1 FACTORES DE CRECIMIENTO

Como se sabe, la matriz ósea contiene numerosos factores de crecimiento

(1). Estos factores incluyen:

- 1) Factores de crecimiento ácidos y básicos de fibroblastos ( FGGb y FGFa).
- 2) Factores de crecimiento similares a la insulina I y II, (IGF-I, IGF-II).
- 3) Factores de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ s)
- 4) Factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs)
- 5) Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

Se sabe que todos estos factores residen en el hueso. Aunque de alguna manera no sea clara si son depósitos que afectan específicamente la función de las células óseas o simplemente los depósitos sean secuestrados dentro de la hidroxiapatita o por componentes de la matriz extracelular.

Una definición que podría explicar el papel fisiológico de los factores de crecimiento se ha utilizado para examinar sus efectos en varios tipos de células óseas *in vitro*. La mayoría de los factores de crecimiento se encuentran dentro de la matriz ósea, y se ha visto que tienen efectos en uno o más tipos de células óseas. La IGF-I y la IGF-II, son formadas por células óseas, así como por otro tipo de células. *In vitro* hay un incremento de la colágena tipo I y síntesis de matriz por osteoblastos, de la misma forma se reduce la degradación de colágena. Estos también son mitogénicos para los precursores de osteoblastos.

Los factores de crecimiento ácidos y básicos de fibroblastos (FGFs), por lo general son mitogénicos ya que se ha demostrado que estimulan la replicación de los osteoblastos así como también su población progenitora

De las múltiples formas de derivados de plaquetas (PDGF), que existen, únicamente el derivado de plaquetas de cadena A (PDGF-AA), es producido por las células óseas. A diferencia de otros factores de crecimiento, no únicamente aumenta la proliferación de las células osteoprogenitoras sino también la actividad de resorción del hueso en cultivos de órganos *in vitro*

El factor de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ), es abundante en la matriz ósea y tienen efectos complejos en una variedad de tipos celulares óseos *In vitro*, tienen efectos bifásicos en las células óseas y pueden aumentar o disminuir la proliferación. Primordialmente aumenta la síntesis de la matriz por los osteoblastos. El factor de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ), reside dentro de la matriz ósea en una forma latente. Debido a que puede activarse localmente y tiene efectos tanto en las células que forman y absorben hueso, es una molécula candidata para ser involucrada en el mecanismo de acoplamiento del remodelado óseo.

#### 4.2. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMPs)

Aún cuando los factores de crecimiento, han demostrado tener efectos en las células *in vitro*, un procedimiento alterno ha llevado al descubrimiento de una familia de factores de proteína, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). La capacidad del hueso para inducir nuevo cartilago y formación de hueso cuando se implanta ectópicamente dentro de un animal se ha conocido por algún tiempo y esta capacidad se ha demostrado subsecuentemente y reside en un componente de proteína extractable de la matriz ósea (1).

Los análisis usados para la purificación de la actividad osteoinductiva fué analizada ectópicamente en tejido de rata. Donde los materiales que eran analizados, fueron implantados con una colágena subcutáneamente en ratas. El punto final del análisis es la observación histológica. ( de 7 a 14 días después) de la nueva formación de cartilago y/o hueso. Usando hueso de bovino como una fuente de actividad osteoinductiva y una variación de éste bioanálisis, resultó en una extensiva purificación de un compuesto de proteínas. Usando una secuencia de información aminoácida derivada desde esta alta purificación, pero con material compuesto, tenemos clones derivados de cDNA, los cuales se codifican en ocho proteínas individuales. Cada una de estas proteínas esta presente en el extracto oseo. La secuencia aminoácida de estas proteínas, como se deduce de los clones de cDNA, indica que siete de estas ocho proteínas BMP-2 a la BMP-8 están relacionadas entre sí, Tienen características similares en su estructura, una secuencia líder secretoria hidrofóbica, una región larga propeptide y una región madura; esta región madura contiene el componente activo de la molécula, dentro de esta región o campo, residen siete residuos de cisteina posicionados similarmente a estos en otros miembros de la superfamilia de (TGF- $\beta$ ) de factores de crecimiento y diferenciación.

Examinando las relaciones de las proteínas BMP asignadas entre si, se han organizado en tres grupos basados en su secuencia homóloga de aminoácidos. La BMP-2 y BMP-4 son proteínas muy similares, siendo casi idénticas en su cisteina siete y mostrando mayor variabilidad en la región amino-terminal de la proteína madura. Similarmente, la BMP-5 así como la BMP-8 proporcionan una gran distribución de la secuencia homóloga, formando otro subgrupo de la BMPs. Estos dos subgrupos (BMP-2/BMP-4 y BMP-5, así como las BMP-8) están más estrechamente relacionadas con la BMP-3 (osteogenina), la cual por si misma forma el tercer subgrupo.

Las proteínas morfogenéticas óseas residen en la superfamilia del factor de crecimiento de transformación beta (TGF- $\beta$ ), comprende una subfamilia basada en secuencia de aminoácidos. De hecho están relativamente distanciadas en relación con los propios TGF- $\beta$ s y tienen actividades biológicas muy distintas.

Las BMP, son proteínas dimericas glicosiladas. Ya que las proteínas individuales de BMP se sintetizan por células. Estas se dimerizan y se vuelven glicosiladas. Debido a la naturaleza dimerica de las BMPs, es posible que existan tanto en la forma homodimerica y heterodimerica. Múltiples ejemplos de ambos (Homodimericas y heterodimericas), existen dentro de la superfamilia del TGF- $\beta$ , incrementando el posible número de actividades biológicas resultado de un número ilimitado de productos de genes.

#### **4.3 ACTIVIDADES DE LAS BMPs IN VIVO**

La clonación biológica de las proteínas como se describió con anterioridad, y su expresión subsecuente en el sistema de recombinación han permitido analizarlos en una variedad de escenarios. La mayoría de las BMPs han sido expresadas usando sistemas de expresión de células mamarias, tal vez debido a lo complejo, cada paso envuelve su expresión normal, incluyendo la dimerización, la glicosilación y el doblamiento correcto.

La proteína BMP-2, será utilizada como representativo de las actividades de la familia de proteínas morfogenéticas óseas. La BMP-2 recombinante humano (rhBMP-2), se ha producido utilizando un sistema de expresión celular de hamsters chinos (CHO). Esto facilita la purificación de la homogenicidad de esta proteína y sus pruebas de diversas situaciones in vivo.

Un sistema utilizado comúnmente (y el único utilizado durante la purificación de hueso de bovino), fué implantado en la combinación de portadores de matriz con BMP en algunos sitios subcutáneos de rata. En diferentes tiempos, los implantes fueron removidos y se analizaron histológicamente, para observar la formación de nuevo cartilago y hueso. En este sistema, la rhBMP-2 ha demostrado la habilidad que posee para inducir la secuencia completa de osificación y producción de cartilago nuevo (1).

La implantación de grandes cantidades de rhBMP-2 resulta en una formación concurrente de cartilago y hueso. Estos resultados sugieren que esta puede influenciar el camino directo de la formación ósea (hueso intramembranoso) así como la secuencia endocondral. Usando esto como un sistema de prueba, se ha encontrado que la mayoría de las proteínas morfogenéticas óseas, incluyendo BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, inducen la formación de hueso de una manera similar. Actualmente otras BMPs son investigadas y han demostrado que cicatrizan defectos segmentales, por ejemplo la BMP-7/OP ha demostrado cicatrizar defectos de huesos largos en conejos y primates.

#### **4.4 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS BMPs.**

Los efectos de las BMPs en diferentes tipos de células *in vitro* han sido examinadas en orden, para comprender el mecanismo celular de la respuesta osteo-inductiva en animales. La mayoría de estos estudios se han enfocado a observar células óseas y de cartilago, y sobre linajes de células osteoblasticas y condroblastos, donde las marcas fenotípicas y los efectos de otros factores de crecimiento osteo-tropicos y hormonales son bien conocidas. Las BMPs, han demostrado que afectan la diferenciación en las células de linaje condrocítica.

Además de la diferenciación de las células dentro del linaje condrocítico, las BMPs han sido presentadas para diferenciar directamente a estas dentro de las células fenotípicas de los osteoblastos. Ambas células primarias y células lineales derivadas de diversas fuentes anatómicas de células precursoras de hueso, han sido reportadas para responder a las BMPs

Las BMPs, son los únicos factores que se sabe podrían inducir la expresión de osteocalcina, la mayoría marca a los osteoblastos maduros. La diferenciación de las células de hueso y cartilago también pueden responder a las BMPs. La BMP-2 es mitogénica para varias células derivadas del cráneo, y varias BMPs han mostrado ser mitogénicas para células primarias de cráneo fetal de rata. Los efectos sobre el fenotipo son más variables ; en general, las BMPs tienden a mejorar la expresión de la diferenciación de las marcas fenotípicas de ambos, condroblastos y osteoblastos.

Estos estudios indican que las acciones primarias de las BMPs son diferenciar a las células precursoras del mesénquima a células formadoras de cartilago y hueso. La habilidad de las células embriológicas para responder a las BMPs por diferenciación dentro de las células de cartilago o hueso, sugieren que las BMPs son envueltas en el desarrollo del sistema del esqueleto embriológico. Esto está soportado porque el factor de mRNA de las BMP ha sido localizado en los sitios de la formación esquelética en el esqueleto del embrión(1). La BMP-2 y la BMP-4, por ejemplo, están presentes en el mesénquima interdigital en el desarrollo de los miembros del embrión, rodeando las áreas de condensación las cuales podrían ser elementos cartilaginosos. Más tarde en el desarrollo, la mayoría de los mRNA de las BMPs están presentes rodeando las regiones de desarrollo de los huesos. Interesantemente, una variedad de los mRNA de las BMPs se encuentran para ser específicamente presentes en tejidos blandos durante el desarrollo, incluyendo el corazón, los folículos pilosos, y riñones.

sugiriendo que posiblemente tienen un papel en el desarrollo de tejidos, órganos y sistemas distinguiéndolos del sistema esquelético.

Los factores de crecimiento y la citocinesis están constantemente bajo investigación, como un potencial terapéutico para sitios específicos de la regeneración de hueso alveolar. Muchos de estos factores incluyendo a los TGF- $\beta$ , PDGF, IGF-1, IGF-2 y FGF influyen en el crecimiento y resorción de hueso, así cada uno de ellos puede ser empleado en los procesos de regeneración. Sin embargo estas moléculas tienen efectos en muchos otros tipos de células y tejidos. En contraste, las BMP representan la única forma para diferenciar los factores que inducen a la formación de nuevo hueso en el sitio de implantación donde se han colocado o cambiando los índices de crecimiento del hueso pre-existente. Como se mencionó anteriormente la rhBMP-2 ha demostrado su capacidad para inducir la formación de hueso ectópico en un sitio *in vivo*. El estudio en el cultivo de las células indican que las rhBMP-2 pueden iniciar la diferenciación de las células precursoras del mesénquima dentro del cartilago - y formar células óseas. En estudios adicionales en animales han demostrado que las rhBMP-2 son capaces de repoblar grandes defectos en caninos mandibulares (2.5 cm), cicatrizando una variedad de defectos de huesos largos en modelos animales ortopédicos, y reparando defectos óseos en modelos animales de pérdida ósea debido a enfermedades periodontales. Estos resultados sugieren que la rhBMP-2 ha abierto un potencial terapéutico para la reconstrucción dental y craneo/maxilofacial también.

**CAPITULO V**  
**PROTEINA MORFOGENETICA ÓSEA -2**  
**RECOMBINANTE HUMANO (rhBMP-2)**

Como se describio con anterioridad, las BMPs comprenden una familia de proteínas con una actividad única. La capacidad de inducir formación de tejidos de cartilago y oseos cuando se implanta dentro de un sitio de tejido blando. Los estudios biologicos de las BMPs in vitro e in vivo indican que estas funcionan diferenciando células que forman hueso y cartilago. Este concepto sugiere que las rhBMP-2 pueden tener un enorme potencial terapéutico en la reconstrucción dental y periodontal. La necesidad de reemplazamiento del hueso alveolar perdido debido a la enfermedad periodontal se ven plenamente realizados (1)

La proteína morfogenética osea - 2 recombinante humano (rhBMP-2) se ha utilizado para inducir la formación ectópica de hueso precedida por cartilago en roedores.

Las concentraciones del incremento de rhBMP-2 podrian mejorar la formación de hueso en la rata. Cuando se utilizan grandes dosis, la formación de cartilago y hueso ocurren simultaneamente. De esta manera, se manifiesta que la rhBMP-2 quizá influya en las diferentes formaciones de hueso intramembranoso y endocondrial. Además, la rhBMP-2 ha demostrado que induce la formación ósea

Podemos decir de manera breve que la rhBMP-2, induce la formación ósea en fémur de roedores y ovejunos, defectos segmentales de mandíbula en perros, además de defectos craneales en roedores y perros. El hueso regenerado se integra con el hueso circunvecino existente. Las evidencias radiográficas, histológicas y biomecánicas sugieren similitud con el hueso normal. (1,4,5)

---

Esto ha sugerido que las BMPs podrían iniciar (disparar) eventos necesarios para la regeneración periodontal.

La acción morfogénica de las BMPs tienen investigaciones dirigidas a la evaluación de ellas mismas, como auxiliares o adjuntos en la terapia de reconstrucción periodontal; desde luego mejoran la regeneración periodontal como se ha demostrado después de la implantación quirúrgica de BMPs.(3)

Para entender esto, debemos explicar que los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y de transformación beta ( $TGF-\beta$ ), afectan a las células ya diferenciadas o a las células formadoras de hueso presentes en el mismo (osteoblastos), causando que estas se dividan y/o aumenten la secreción de molécula de matriz extracelular, afectando células del hueso por sí mismo, estas tienen de alguna manera capacidad limitada para la regeneración.

Por otro lado, la rhBMP-2, afectará a las células *precursoras*, principalmente las células del medio medular y el tejido blando circunvecino al sitio del defecto, para así infiltrarse en el área del defecto, y diferenciarse en cartilago y células óseas. Por lo tanto, la proximidad del hueso existente es menor que un factor de la regeneración y las rhBMP-2 teóricamente pueden regenerar una cantidad ilimitada de hueso (1,3).

Siggurdsson y col(5) sugieren que la colocación de un dispositivo que contenga rhBMP-2 no sólo puede regenerar la altura original de hueso perdido, sino también el aparato de inserción periodontal. Otras posibilidades de la aplicación de rhBMP-2 se pueden incluir en la ayuda de la colocación de implantes dentales. Esto es, en el incremento de la cresta o en los procedimientos de elevación de seno para proveer así suficiente hueso para la colocación de implantes, o colocar rhBMP-2 dentro de alveólos posterior a una extracción o alrededor de implantes para acelerar el tiempo de la oseointegración. Además

necesitamos complementar la evaluación de estudios preclínicos y clínicos del componente de este potente osteoinductor (1).

Concluimos que la proteína morfogenética ósea 2 con recombinante humano (rhBMP-2) tiene un potencial terapéutico importante para la estimulación de la regeneración periodontal y puede abrir completamente nuevas dimensiones en la terapia reconstructiva (5).

## CAPITULO VI

### PROCEDIMIENTOS CLÍNICOS REALIZADOS CON BMPs

En el siguiente capítulo se describen algunos artículos donde se reportan estudios que se han practicado en animales de experimentación, la mayoría de estos estudios evalúa los niveles cuantitativos, así como los cualitativos de hueso nuevo, además, describen la ganancia en cuanto a niveles de inserción o la presencia de fibras del ligamento que pudieran llegar a existir, por lo que se presume que en algunos casos se lograron cantidades considerables de hueso, posiblemente con la presencia de anquilosis, en la mayoría de los casos lograron *regenerar* a los tejidos involucrados en el soporte dental, por lo que en ambos casos se puede hablar de un éxito considerable.

Este tipo de estudios podrían contribuir a la explicación del porque se obtienen mejores resultados al combinar materiales que estimulen la regeneración periodontal, no para utilizar a los aloinjertos únicamente como "sosten o soporte" de las membranas utilizadas en la regeneración tisular guiada por ejemplo, sino por el verdadero potencial terapéutico que representa el contenido de estos preparados óseos y la capacidad que presentan para inducir la osteopromoción

Shigeyama y Col.(1995), desarrollaron estudios en hueso preparado comercialmente, donde revelaron que los resultados en el buen establecimiento de la implantación de matriz de hueso desmineralizado en los sitios no esqueléticos que resultaron en formación de cartilago y hueso, fueron atribuidos a factores de la proteína morfogenética ósea. Los materiales como los injertos de hueso desmineralizado comercialmente disponibles, son comunmente utilizados para regenerar o reconstruir hueso. Los estudios aquí descritos se enfocaron en el establecimiento de la actividad biológica de los extractos de proteína

preparados de materiales como injertos óseos in vitro obtenidos comercialmente. Además, la actividad biológica de estos extractos de proteína in vitro fueron comparados con extractos similares, (preparados de hueso fresco obtenido de humanos). La actividad biológica de las proteínas de la matriz ósea examinada, incluye su capacidad para promover la proliferación, adherencia y migración de fibroblastos gingivales usando un sistema in vitro. Se uso Guanidina seguida de guanidina/EDTA para separar proteínas de la matriz osea en proteínas asociadas con los tejidos blandos del hueso y proteínas retenidas en los compartimentos minerales, respectivamente. Dos preparaciones de cada material iniciador fueron probados y la actividad biológica de cada preparación fue evaluada por triplicado. Los resultados revelaron que el material preparado comercialmente contenía colágena tipo I, fibronectina, *BMP-2, 4 y BMP-7*. Sin embargo el extracto preparado de hueso fresco mostro que tenía mayor concentración de *BMPs*. La capacidad de los extractos comerciales para promover la proliferación celular, aún cuando son significativos, estan limitadas y son significativamente menores cuando se compara con extractos similares preparados, obtenidos de hueso fresco.

Todos los extractos promovieron significativamente la adhesión celular, aún cuando ninguno de los extractos promovieron las migración cèlular. Asi, el material preparado comercialmente retuvo proteínas que tenían la capacidad para influenciar en el comportamiento de las células in vivo. Sin embargo, algunas actividades biológicas como las medidas in vitro por el procesamiento tisular.(16)

Por otro lado, Sigurdsson y col, han demostrado clinicamente la regeneración clínica de hueso y cemento en defectos periodontales suparalveolares creados artificialmente; después de la implantación quirúrgica de rhBMP-2 en contenedores de *sangre autóloga y micropartículas bioadheribles*.(4), estos mismos autores evaluaron también el potencial biológico

de una membrana de politetrafluoretileno- expandido (PTF-e), la cual provee el espacio necesario para la regeneración y rhBMP-2 para estimular la regeneración periodontal y reportaron una regeneración clínica significativa de hueso y cemento con ambos procedimientos. La regeneración ósea fué mas extensa en los defectos tratados con proteínas rhBMP-2 que en los defectos tratados únicamente con membranas (5)

Los estudios revelaron que el hueso regenerado bajo la membrana apareció denso con muchas osteonas primarias, mientras que el hueso estimulado con rhBMP-2 tuvo una apariencia entrelazada con espacios medulares amplios. Para ambas condiciones, el trabeculado óseo estuvo limitado con células parecidas a osteoblastos y matriz osteoide, sugiriendo una aposición continua de hueso.(3,4,5)

Las fibras del ligamento periodontal orientadas funcionalmente no fueron frecuentes en ambas condiciones experimentales, sin embargo, cuando estaban presentes aparecieron más obvias en los defectos tratados con membranas más que en los tratados con rhBMP-2, únicamente.

Otro hallazgo importante que puede relacionar la regeneración periodontal extensa es la reducción en la resorción radicular observada en ambas condiciones experimentales.

Sin embargo, las necesidades clínicas requirieron el estudio adicional de sistemas portadores de rhBMP-2 que dirigían la regeneración periodontal. Algunas necesidades clínicas (no limitantes) incluyen el manejo clínico y físico en la integridad estructural del portador. Por otro lado la selección de un portador posiblemente, influya en el resultado de la regeneración.(2)

Otro estudio realizado también por Siggurdsson y Col(4), en perros sabueso, evaluó los portadores de rhBMP-2 y su papel en la regeneración periodontal.

Estudios previos sostienen que el potencial de regeneración del hueso alveolar y de cemento mejora en presencia de un espacio que proporcione el establecimiento de un coagulo estable y en combinación con rhBMP-2, impiden la invasión de células no deseables en dicho lugar, así también permiten la diferenciación de células del mesénquima Ninguno de los portadores de la proteína son considerados como óptimos en todos los aspectos Este estudio sólomente evaluó la cantidad y la calidad de las rhBMP-2 para inducir la regeneración de hueso y fibras periodontales, las cuales pueden ser afectadas por los materiales que son utilizados durante el estudio. (3)

En otro estudio realizado por Brugnani y col (18), evaluaron la formación de nuevo hueso en un alveolo de hueso humano tratado con injerto de hueso seco congelado desmineralizado (DFDBA) y de membrana. Las biopsias de tejido duro de 7 sitios en 6 pacientes se obtuvieron de 14 semanas a 13 meses con el procedimiento de colgajo y extracción. Los análisis histológicos revelaban que las partículas individuales de DFDBA eran discernibles después de los 13 meses *in situ*. En todas las muestras, todas las partículas de DFDBA estaban bien incorporadas dentro del hueso nuevo, el cual exhibía osteocitos contenidos en las lagunas, líneas cementantes claras y distintas, demarcaban las partículas de DFDBA de los alrededores, del hueso entrelazado y lamelar intimamente aposicionado. La médula presentaba un ligero grado de fibrosis sin signos de inflamación, así como también una notable ausencia de encapsulación de material del injerto, se observó también, una pequeña osteoclastis. Los resultados obtenidos mostraron que el hueso seco congelado desmineralizado, obtenido comercialmente tiene el potencial para funcionar físicamente como un foco para

apositionar el crecimiento del hueso nuevo en los alveólos, después de la extracción del diente.

Un total de 38 secciones histológicas fueron evaluadas. Los análisis histológicos fueron comprometidos en un intento para determinar el papel del DFDBA en combinación con las membranas en el tratamiento de lesiones en humanos. Los hallazgos son apoyados con estudios previos en humanos (18). Simon y col reportaron que los nodulos aparentes de mineralización para levantarse dentro de las partículas de DFDBA tienden a ser confluentes con la transformación de las partículas de DFDBA a hueso mineralizado viable. Con esto se llegó a la conclusión de que, aunque el autoinjerto de hueso preparado de una cantidad grande o densa de hueso en formación, el hueso seco congelado desmineralizado (DFDBA), mejora la regeneración ósea, comparada con la terapia de membrana sola, después de 6 meses de cicatrización. Similarmente, Gelb observó hueso trabeculado viable, conteniendo numerosos osteocitos dentro de sus lagunas. Las áreas de remodelación estaban presentes y no se presentaban células inflamatorias.

Existen otros reportes como los realizados por Mellado en la Universidad de Temple, Filadelfia en donde utilizó ambas modalidades para la regeneración de lesiones periodontales en 6 hombres y 5 mujeres obteniendo mayor éxito en los pacientes en donde utilizó ambos dispositivos, que utilizando únicamente membranas de politetrafluoretileno-e. (17)

**CONCLUSIONES**

Los avances en biología molecular han incrementado los conocimientos acerca del funcionamiento de las células de crecimiento y de las interacciones entre las matrices extracelulares y las células en cicatrización (15). Los reportes han evaluado o discutido los posibles efectos de estos modificadores en fibroblastos gingivales, ligamento periodontal o células de hueso alveolar ya sea *in vivo* o *in vitro*.

La revisión de los reportes, así como los datos y resultados de cada uno de ellos aportan elementos para considerar a las proteínas morfogenéticas óseas como un potente terapéutico en la regeneración ósea. Sin embargo, existen otros elementos de muchísima importancia, utilizados también para promover la regeneración, los estudios histológicos y los análisis bioquímicos, han ayudado a comprender, valorar y determinar los procedimientos más adecuados para cada caso en particular.

Los factores de crecimiento representan en la actualidad el mejor recurso (y si se combina con otros dispositivos, aún mejor), para regenerar los tejidos perdidos por la enfermedad periodontal. Al parecer cada factor de crecimiento favorece la proliferación específica de células, favoreciendo de alguna manera la exclusión, necesaria para lograr el éxito en este tipo de terapias

- Los estudios en animales proporcionan información útil en cuanto a que pueden indicar el potencial de un injerto para producir resultados favorables. Cerca del 75% de estudios realizados en las últimas décadas, comparan los procedimientos de injertos y los que no utilizarán, en defectos óseos periodontales creados artificialmente en animales, obteniendo resultados favorables en aquellos donde se colocaron injertos comparativamente con aquellos donde se dejaron

---

## CONCLUSIONES

sólos. Sin embargo, todos los experimentos con animales deben verse con cierto grado de precaución, y los resultados pueden no extrapolarse directamente a los seres humanos. Sólo cuando se haya probado en seres humanos controlados con evaluaciones clínicas se podrá valorar de manera objetiva el potencial verdadero de cualquier material óseo de injerto - (13)

Concluimos que la proteína morfogenética ósea 2 con recombinante humano (rhBMP-2) tiene un potencial terapéutico importante para la estimulación de la regeneración ósea/periodontal y puede abrir completamente nuevas dimensiones en la terapia reconstructiva (5)

**REFERENCIAS**

- 1) Wozney JM "The potencial role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction". J Periodontology 1995, 66:506-510.
- 2) Cho M, Lin WL, Genco RJ " Platelet- derived growth factor-modulated GTR therapy" J Periodontol 1995, 66:522-530.
- 3) Sigurdsson TJ,DDS, Nygaard L,DDS, Col " Periodontal Repair in Dogs: Evaluation of rhBMP-2 Carriers ". J. Periodont Rest Dent 1996; 16:525-537.
- 4) Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K. "Periodontal Repair in Dogs: Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein - 2 Significantly enhances periodontal regeneration "" J. Periodontol 1995; 66: 131-138.
- 5) Sigurdsson Tj, Tatakis D.N, Lee M.B. " Periodontal regenerative potencial of space-providing expanded polytetrafluoroethylene membranes and recombinant human bone morphogenetic proteins " J. periodontol 1995; 66:511-521
- 6) Don W. Fawcett, M.D., Bloom. "Tratado de Histología" .Decimoprimerá edición.Ed. Interamericana - Mc Graw Hill 1992.
- 7) Ten Cate. " Tratado de Histología Oral". Segunda Edición, Ed. Médica Panamericana 1986
- 8) Ham, Cormack, D. " Histología de Ham". Novena Edición, Edit. HARLA Mex. 1988
- 9) Peacock, E. MD. " Wound Repair ". Third Edition, W.B. Saunders Company 1984

- 
- 10) Jowsey, Jenifer, D.P. " *Metabolic Diseases of Bone*". Vol 1 in the series. " Saunders Monographs In Clinical Orthopedics"Edit W.B. Saunders Company 1977
- 11) Rubin,Ronald; Weiss, G; Putney, S. " *Calcium in Biological Sistem*".Edit Plenum Press, New York 1985
- 12) Schuluger,Saul. " *Enfermedad Periodontal*". Edit. Compañía editorial continental, México 1984
- 13) Genco, Robert,J. " *Periodoncia*". Edit. Interamericana Mc Graw Hill 1993
- 14) Lindhe A., Alberius P., Dahlin C., Bjurstaam K. " *Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane healing an bone neogenesis* " J.Periodontol 1993, 64; 1116-1128
- 15) Clark RAF, Henson PM. " *The molecular and Cellular Biology of Wound Repair* ". New York , Plenum press 1988
- 16) Yoichiro Shigeyama, D'Errico J:A, Stone R. " *Commercially-Prepared Allograft Material Has Biological Activity In Vitro*" J. Periodontol 1995; 66; 478-487
- 17) Mellado José, Salkin, L; Freedman. " *A Comparative Study of ePTFE Periodontal Membranes With and Without Decalcified Freeze-Dried Bone Allografts for the Regeneration of Interproximal Intraosseous Defects*" J. Periodontol 1995; 66:751-755
- 18) Brugnamì,Federico, Then, P.R; Moroi, H, Leone, C. " *Histologic Evaluation of Human Extraction Sockets treated with Dimeralized Freeze- Dried Bone Allograft (DFDBA) and Cell Occlusive Membrane* " J. Periodontol 1996; 67: 821-825.
-