



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA ÓSEA.**

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

ZATZULI ISAYRIC SUÁREZ MIRANDA

TUTORA: Dra. LAURA ESTHER VARGAS ULLOA

ASESORA: Mtra. ROSA ISELA LUPERCIO LUNA



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.

Lo que Dios te ha prometido tus ojos lo verán

Salmos 33:4

A mi única y gran amiga, compañera y guía, mami sé que esto para ti es un gran orgullo gracias por insistir tanto en que lo volviera a intentar, luchar y ver la manera de llegar a esta meta, por confiar y creer siempre en mí, gracias por todo el amor que me has brindado desde pequeña, por todos tus desvelos solo por apoyo a no dejarme sola haciendo tarea por siempre estar presente en todos los momentos fáciles y difíciles de mi vida por aceptarme como soy, sé que no soy perfecta pero ante tus ojos lo soy y tú lo eres para mí gracias por tanto mami te amo.

A mi gran pilar, a mi consejero a mi héroe, papi muchas gracias por siempre ser mi respaldo la mano que no me deja caer y el que siempre me obliga a creer en mí, gracias por ser mi paciente más valiente, por impulsarme y guiarme en este camino, gracias a eso soy lo que soy hoy, gracias por tu confianza, pero sobre todo por todos tus consejos, soy muy afortunada por tener un papá tan trabajador y cariñoso como tú te amo papi.

A mi abí, si admiro a una mujer es a ti, gracias por todo tu apoyo incondicional por procurarme y preocuparte por mí por ser la abuela más consentidora y a la vez regañona por nuestro bien te agradezco todo lo que con amor haces por mí, mi mama y hermanos, siempre serás mi gran amor eterno.

A mis hermanos: Que son mi mayor herencia mi más grande fuente de alegría y mi gran orgullo.

A mi hermano Mishael mi compañero de vida no sé qué hubiera sido de mi infancia sin ti te amo y te agradezco que siempre estés al pendiente de nosotras eres el mejor hermano.

A mi pequeña hermana Denimaetzi, gracias por ayudarme en todo, estar conmigo en las buenas y en las malas, sé que no soy el mejor ejemplo de una hermana mayor pero sé que tomarás lo mejor de mí y serás mejor que

yo te admiro porque a pesar de ser más pequeña siempre estás para aconsejarme, cuidarme, tenderme tu mano, tu hombro y amor cuando lo necesito te amo mi pequeña hermanita, mejor amiga y compañera de aventuras.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de México y a la facultad de odontología quien me brindo el conocimiento y las herramientas necesarias para alcanzar mis metas siempre será mi segunda casa “Por mi raza hablará el espíritu.”

Al grupo interdisciplinario de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, con la colaboración de adscritas al laboratorio de biomateriales dentales de la DEpI.

A mi tutora la Dra. Laura Esther Vargas Ulloa quien tuvo la paciencia y enseñanza necesaria para apoyarme en este trabajo, muchas gracias por todas sus aportaciones.

A la Dra. Juana Paulina Ramírez, Ortega quien me brindó su tiempo y conocimiento para la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Margarita V. García Garduño, quien me brindó su conocimiento y apoyo para la elaboración de este trabajo, gracias por sus palabras positivas.

A la Dra. María Concepción Peña Juárez quien participo en la elaboración de este trabajo.

A mi asesora la Mtra. Rosa Isela Lupercio Luna, por brindarme su disponibilidad para la elaboración de este trabajo gracias por su comprensión.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVO	9
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	10
CAPÍTULO 2. Biología Ósea	13
2.1 Células óseas y de la matriz ósea.....	14
2.1.1 Osteoblasto.....	14
2.1.2 Osteocito.....	15
2.1.3 Osteoclastos.....	16
2.1.4 Matriz ósea.....	17
2.2 Regeneración, cicatrización y reparación ósea.....	18
2.2.1 Regeneración.....	18
2.2.2 Reparación.....	20
2.2.3 Cicatrización.....	21
2.3 Remodelado óseo.....	23
2.3.1 Fases de remodelado.....	23
CAPÍTULO 3. Proteínas morfogenéticas óseas	25
3.1 Estructura.....	25
3.2 Subgrupos o clasificación.....	27
3.3 Funciones de las proteínas morfogenéticas óseas.....	29
3.4 Mecanismos de acción.....	31

CAPÍTULO 4. Métodos de obtención de las proteínas morfogenéticas óseas	34
4.1 Descripción de la obtención de las proteínas morfogenética óseas a partir de hueso congelado.....	36
4.2 Descripción de la obtención de las proteínas morfogenéticas óseas a partir de hueso bovino.....	37
4.3 Descripción de la Obtención de las proteína morfogenética ósea dos recombinante.....	41
4.3.1 Contraindicaciones	41
4.3.2 Precauciones.....	41
CAPÍTULO 5. Aplicación de las proteínas morfogenéticas óseas en odontología	42
5.1 Reconstrucción de fisuras alveolares.....	42
5.2 Regeneración periodontal	43
5.3 Fijación del implante con proteínas morfogenéticas óseas.....	43
5.4 Aumento del seno maxilar.....	44
5.5 Aumento del reborde alveolar.....	44
5.6 Trauma maxilofacial	45
5.7 Endodoncia	45
CAPÍTULO 6. Efectos adversos de las proteínas morfogenéticas óseas	46

CONCLUSIONES.....48

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....49

GLOSARIO DE TÉRMINOS



INTRODUCCIÓN

La ingeniería genética y reconstrucción tisular se han enfocado en restablecer la función, morfología y estética del aparato estomatognático.

Los factores de crecimiento transformante – beta (TGF- β), son proteínas que tienen la capacidad de promover el crecimiento de células óseas, dentro de estos factores, se encuentran los factores de osteoinducción más potentes, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

Las BMPs se encuentran desde la etapa prenatal del ser humano y otras especies, además se ha demostrado que algunas de estas proteínas se encuentran en la etapa posnatal e incluso en los seres humanos adultos.

La purificación, clonación genética y la expresión de las proteínas morfogenéticas óseas han permitido el desarrollo y las bases para el estudio de la regeneración ósea, ya que es uno de los principales iniciadores y percusores de la osteoinducción en el cuerpo humano.

La disponibilidad de las BMP proporciona retos y oportunidades para mejorar los conocimientos que regulan la regeneración ósea con el fin de optimizar los resultados en el paciente.

Entre las aplicaciones clínicas de las BMPs en el área odontológica se encuentran elevaciones de seno, aumento de reborde alveolar, para la inducción de la dentinogénesis, periodoncia entre otras, con el objetivo de formar hueso. En la actualidad, la BMP recombinante humana (rhBMP) ha sido aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para utilizarla en humanos. El uso de injertos es una práctica consolidada y utilizada en diversas especialidades como lo son odontología y cirugía maxilofacial.



OBJETIVO

- Describir los métodos de obtención de las proteínas morfogenéticas óseas.



CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

Desde los tiempos de Hipócrates se ha sabido que el hueso tiene un potencial considerable para la regeneración y reparación.¹

La historia de las proteínas morfogenéticas óseas comenzó en 1989 con las investigaciones del cirujano americano Senn quien intentó reparar defectos óseos en pacientes con osteomielitis crónica, utilizó implantes de hueso tratados con ácido clorhídrico con el fin de promover la antisepsia.²

Los descubrimientos importantes de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP, por sus siglas en inglés) para uso clínico, comenzó en 1965, con las investigaciones del Dr. R. Marshall Urist, pionero en el concepto de las sustancias presentes naturalmente en el hueso, descubrió que extractos de proteínas provenientes del hueso podían inducir la formación de cartílago y hueso, al implantar matriz ósea desmineralizada extraída de bovino a nivel intramuscular en ratas y conejos; se observó la producción ósea ectópica en el sitio de implantación, que en 1971 lo denominó osteoinducción. Llamó a esta sustancia el principio inductor óseo BMP, con la introducción del nuevo término para describir la naturaleza de este factor inductivo óseo y dió inicio a una búsqueda de estas moléculas.^{3,4}

En 1982, Urist y cols. aislaron una proteína procedente de la matriz de hueso desmineralizado que denominaron proteína morfogenética ósea.⁵

Los avances en biología molecular en los años 80 y principios de los noventa permitieron la secuenciación y la clonación de las BMPs. Clonadas por primera vez en 1988 por un equipo de investigación del Instituto de Genética



dirigido por el Dr. John Wozney, las BMP pertenecen a la familia de los factores de crecimiento transformante β .⁴

Antes del desarrollo de técnicas de ingeniería genética, la purificación de las BMPs, se realizaban a partir de diversas fuentes: osteosarcoma humano, osteosarcoma de Dunn , matriz ósea desmineralizada y hueso bovino. En los últimos años, los avances en el campo de la biología molecular han permitido obtener estas proteínas a partir de técnicas de ADN recombinante.⁶

En la década de los 80, se logró adquirir la secuencia de homólogos humanos de BMP bovina, las cuales se introdujeron en células mamíferas para inducir la secreción de BMP. Esta herramienta de recombinación genética permitió generar una mayor concentración de BMP y de mejor calidad en términos de su homogeneidad de acuerdo a Wozney y cols.

Actualmente, las proteínas morfogenéticas recombinantes humanas (rhBMP) más estudiadas y utilizadas son los tipos rhBMP-2 y rhBMP-7 de acuerdo a Davies y cols. en 2010.⁴

En 2002, la Agencia Administradora de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) autorizó el uso de INFUSE® Injerto Óseo para la fusión vertebral lumbar anterior con la caja intersomática LT-CAGE® como sustituto del injerto óseo autólogo en adultos con enfermedades degenerativas de disco sometidos al menos a 6 meses de tratamiento no quirúrgico de dicha enfermedad. La autorización estaba basada en un estudio multicéntrico, prospectivo, aleatorio, no ciego de 279 pacientes con enfermedad de disco degenerativo, que mostraba que este injerto óseo es equivalente a un injerto autólogo ya que facilita la fusión intervertebral anterior, que reduce el dolor y mejoran los resultados clínicos por la fusión lumbar anterior.^{1,7}



En 2004, un estudio multinacional, aleatorio, controlado, y ciego de 450 pacientes con fractura sagital abierta de tibia demostró que al combinar rhBMP-2 con la fijación de clavos intramedulares (IM) y el tratamiento rutinario de los tejidos blandos aumenta la probabilidad de cura de la fractura. La Agencia Administradora de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) autoriza el uso de INFUSE® Injerto óseo para el tratamiento de fracturas de tibia grave en adultos, como complemento de los cuidados estándares de reducción de la fractura abierta y fijación con clavos intramedulares.⁷

En 2007, este producto es una alternativa a la utilización de injerto óseo autólogo en osteoplastia de aumento de los senos paranasales y de aumento de las crestas alveolares por defectos asociados a extracciones dentales.⁷

Zimmerman y cols, en 2009 evaluaron la eficacia de BMP-7, en comparación con el autoinjerto en pacientes con retraso en la unión de fractura de tibia.⁸

En 2012, se reportaron las complicaciones por el uso de INFUSE® en la base de datos de la FDA. Las complicaciones reportadas fueron por edema, eritema, dolor, infección del sitio quirúrgico o complicaciones de la herida, fracaso del injerto o pseudoartrosis en diferentes cirugías del área maxilofacial.⁴



CAPÍTULO 2. BIOLOGÍA ÓSEA

El tejido óseo, también llamado hueso, se forma a partir del mesénquima, es un tipo especializado de tejido conjuntivo formado por células y material intercelular, conocido con el nombre de matriz ósea.⁹

Histológicamente, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada.¹⁰

El tejido óseo tiene una capacidad única de auto remodelación y regeneración.¹¹

La porción inorgánica del hueso, que constituye alrededor de 65% de su peso seco, se integra sobre todo de calcio y fósforo, el otro 35% son componentes orgánicos.¹²

Composición química

Contiene 25 % de agua, 45 % de materia inorgánica: minerales como fosfato y carbonato de calcio y 30 % de materia orgánica: células óseas, colágeno y otras proteínas (figura 1).¹³

Constituyentes orgánicos

El principal componente de la matriz ósea es el colágeno tipo I que supone entre el 90 y 95% de la matriz orgánica. Las fibrillas de colágeno son similares a las que se presentan en otros tejidos y están distribuidas aleatoriamente formando un entramado. Otro componente de importancia es la osteonectina, una fosfoproteína que puede interactuar tanto con el colágeno como con las sales inorgánicas. Es una proteína altamente reactiva que se localiza preferentemente en las áreas de mayor grado de calcificación. Otras proteínas no colagenosas son la osteopontina que es producida por los osteoblastos, y las proteínas óseas morfogenéticas (BMPs) juegan un papel similar al de los factores de crecimiento.¹³

Materia orgánica (30%)	OSTEOBLASTOS OSTEOCITOS OSTEOCLASTOS TEJIDO CONECTIVO
Materia inorgánica (45%)	Hidroxiapatita
Agua (25%)	

Figura 1 Tabla de composición química ósea.

2.1 Células óseas

Las células del hueso son células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.¹²

En el hueso coexisten varios tipos de células. Las células óseas se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indefinidas. Estas células mesenquimales pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos.¹⁰

2.1.1 Osteoblasto

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante.¹⁰ Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares.¹⁰

Los osteoblastos derivan de las células osteoprogenitoras y se desarrollan bajo influencia de la familia de la proteína morfogenética ósea y el factor β de crecimiento transformador,¹² Figura 2.

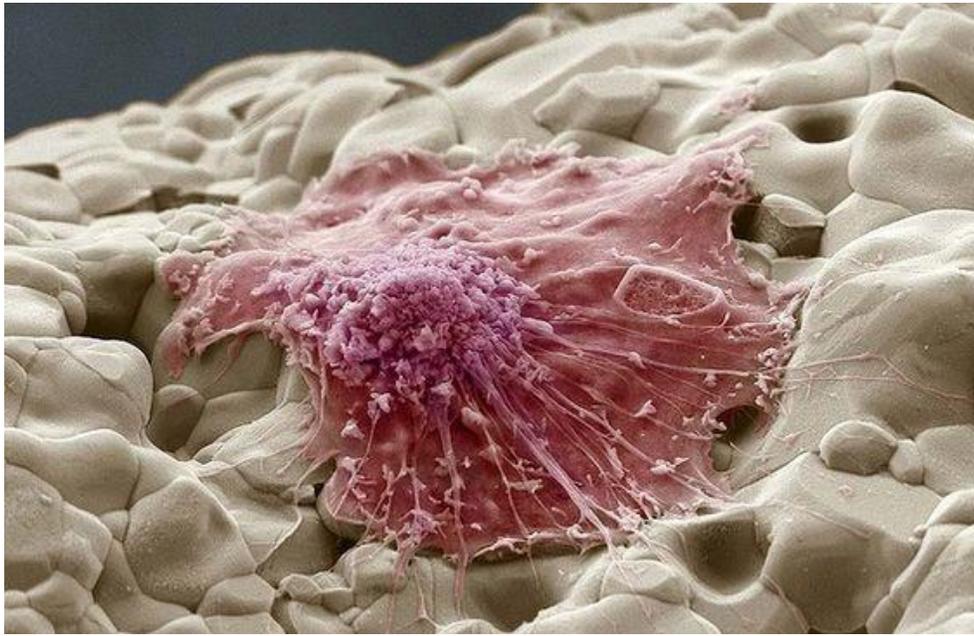


Figura 2 MEB. Osteoblasto sobre andamio de hidroxipatita.¹⁴

2.1.2 Osteocito

El osteocito es la verdadera célula ósea.¹⁵ Los osteocitos son células óseas maduras, derivadas de osteoblastos, que se alojan en lagunas dentro de la matriz ósea calcificada.¹¹

Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos),¹⁰ Figura 3.

Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectan las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominada mecanotransducción.¹⁰



Figura 3 MEB. Célula osteocítica rodeada de tejido óseo¹⁶

2.1.3 Osteoclastos

Son células gigantes multinucleadas que degradan al hueso. De tamaño y forma muy variable.⁹

El osteoclasto es la célula encargada del mantenimiento de la homeostasis ósea. Son capaces de sintetizar y reabsorber, en forma limitada, componentes de la matriz ósea (osteólisis osteocítica) que regula la calcemia. Su vida media es de varios años, incluso décadas; es incapaz de renovarse; su reemplazo se hace a través de la diferenciación de las células precursoras de los osteoblastos, (figura 4). Se localizan en depresiones superficiales de la matriz ósea llamadas lagunas de Howship, adosadas a la superficie de tejido óseo que debe ser removido. La actividad de los osteoclastos está coordinada por citocinas (proteínas pequeñas de señal que actúan localmente) y por hormonas como la calcitonina (producida por la glándula paratiroides).¹⁷

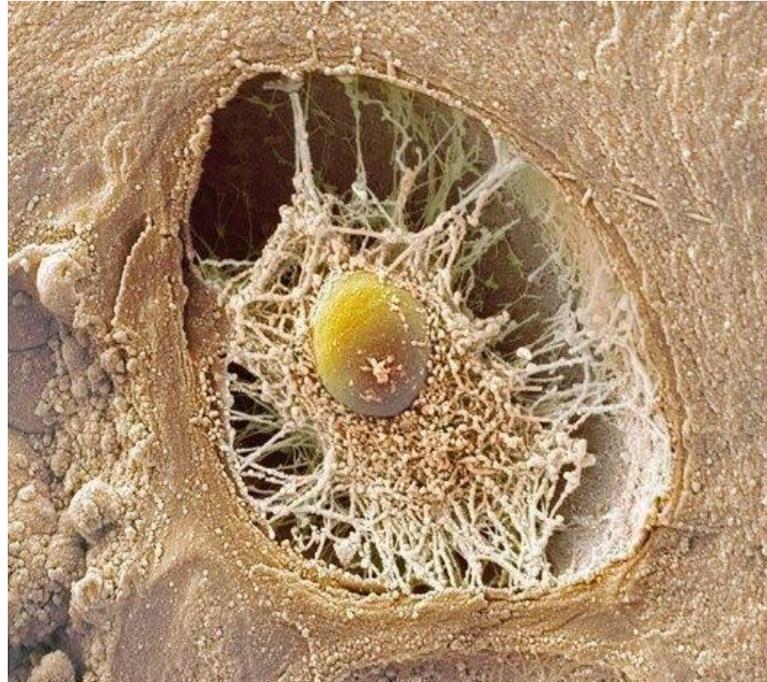


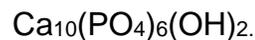
Figura 4 MEB. Osteoclastos comiendo matriz extracelular.¹⁸

2.1.4 Matriz ósea

La parte inorgánica representa aproximadamente el 50% del peso de la matriz ósea.¹⁹

Se compone de matriz orgánica y de sales inorgánicas; la primera está formada por fibras de colágeno tipo I en 95%.^{9,19}

Los iones más abundantes son el fósforo y el calcio, éstos forman cristales que en estudios de difracción de rayos X muestran la estructura de la hidroxiapatita con la siguiente composición.¹⁹



Las proteínas de la matriz específicas del hueso son la osteocalcina y la osteopontina que se unen firmemente a la hidroxiapatita mineral y tienen secuencias de unión que parecen estar implicadas en la fijación de los osteoblastos y osteoclastos de la matriz ósea. Las proteínas de la matriz

específicas de hueso son la osteocalcina y la osteoponina, que se unen firmemente a la hidroxiapatita mineral y tienen secuencia de unión que parecen estar implicadas en la fijación de los osteoblastos y los osteoclastos de la matriz ósea, (figura 5).⁹



Figura 5 Características de la matriz ósea. La materia inorgánica del hueso consiste en hidroxiapatita, que se encuentra en forma de cristales cilíndricos, los cuales se disponen a lo largo de las fibras de colágeno.

2.2 Regeneración, cicatrización y reparación ósea

2.2.1 Regeneración

La regeneración es la respuesta que consigue la restitución e integración del tejido posterior a un trauma, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial, con características diferentes al original.



En este sentido el hueso es el único tejido del organismo, a excepción del tejido embrionario, que se restituye totalmente después de una lesión.¹⁰

La regeneración del tejido óseo se basa en tres vértices:

- Existencia de células competentes
- Presencia de matriz celular insoluble
- Moléculas reguladoras de la función celular

En el caso particular del tejido óseo también debemos considerar unos factores locales importantes, como son el mecánico y el vascular, tanto por el efecto adverso de las fuerzas que pueden incidir sobre el hueso, como por la comprometida y, en ocasiones difícil vascularización ósea. Tal es el caso de enfermedades óseas como la osteoporosis, la ontogénesis imperfecta o radiaciones. Podemos definir en el tejido óseo tres mecanismos relacionados con la regeneración del tejido óseo: ontogénesis y osteoconducción, osteoinducción.²⁰

Ontogénesis

Depende de las células componentes, en este caso los osteoblastos, cuya fuente son los injertos óseos autólogos.¹⁷

Osteoconducción

Depende de la matriz celular insoluble, en este caso son los materiales que hacen de guía para el crecimiento óseo y permiten que se deposite hueso nuevo, es el caso del hueso autólogo, las hidroxiapatitas, las cerámicas de calcio, las fibrinas, el hueso desmineralizado y también nuevas superficies de implantes.²⁰

Osteoinducción

Depende de las moléculas reguladoras del metabolismo óseo, que son un grupo importante de moléculas cuyo estudio ha ocupado gran parte de las



líneas de investigación actuales. Estas moléculas cabe dividir las en dos grupos: por una parte, el de los factores de diferenciación, que corresponde a las proteínas morfogenéticas (BMP), que se refiere a las proteínas que pueden promover la diferenciación de células mesenquimales indiferenciadas en líneas osteoblásticas. El otro grupo son los factores de inducción, que son proteínas que están implicadas en el metabolismo óseo, pero no influyen en la diferenciación de líneas celulares: facilitan el desarrollo del tejido óseo, como son el factor de crecimiento transformante beta (TGF) la fuente de estas proteínas son los injertos autólogos, el plasma rico en factores de crecimiento y las BMPs obtenidas mediante técnicas de ingeniería genética.

20

1.2.2 Reparación

La reparación del hueso incluye la formación intramembranosa y endocondral del hueso.¹² Ante una agresión que supone una pérdida de la sustancia el organismo responde con un proceso de restauración del tejido afectado.²⁰

Para que se inicie la reparación, el coágulo sanguíneo y los restos celulares de la matriz deben ser eliminados por los macrófagos. El periostio y el endostio próximos a la zona de fracturas, responden con una proliferación intensa construyendo un tejido rico en células osteoprogenitoras que forman un collar alrededor de la fractura y que penetran entre los extremos del hueso fracturado. Posteriormente, surge un tejido óseo inmaduro debido a la osificación endocondral de los pequeños fragmentos de cartílago existentes como la osificación intramembranosa. Al cabo de un cierto período de tiempo, este proceso evoluciona hacia la formación de un callo óseo que rodea a la extremidad de los huesos fracturados.¹⁹ Figura 6.

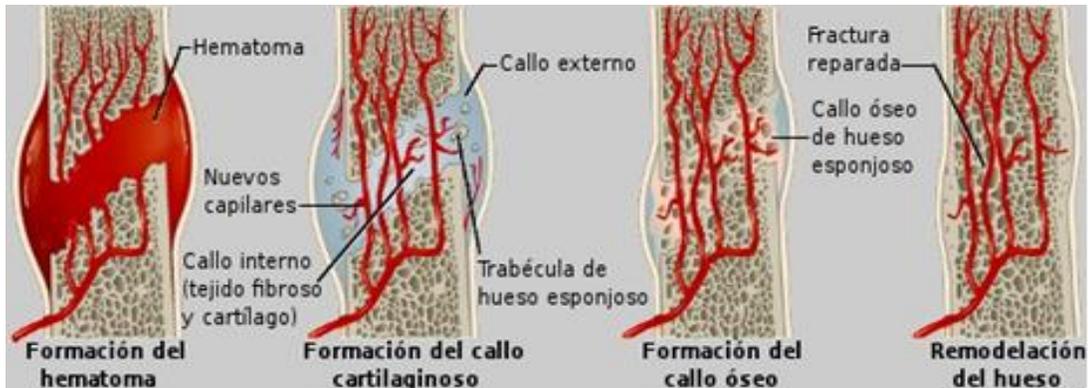


Figura 6 Esquema en los que se muestra el proceso de reparación de una fractura por formación de tejido óseo nuevo.²¹

2.2.3 Cicatrización

La cicatrización ósea es un proceso complejo que requiere la acción sinérgica de las células, citoquinas y factores de crecimiento (GFs). En las últimas décadas, la aplicación terapéutica de los GFs para la regeneración ósea, ganó creciente atención en la comunidad científica, por su capacidad para desencadenar células que facilitaran la transducción de señales intracelulares para la formación ósea endocondral e intramembranosa. Entre los varios factores de crecimiento implicados en el remodelado esquelético y la reparación, el descubrimiento por Urist de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) a finales del siglo XIX fue de gran importancia en la comprensión de la compleja cascada biológica de la osteogénesis.¹⁷

Las etapas de la cicatrización son:

1. Coagulación de la sangre del hematoma.
2. Organización de la sangre del hematoma.
3. Formación del callo fibroso.
4. Formación del callo óseo primario.
5. Formación del callo óseo secundario.
6. Reconstrucción funcional del hueso fracturado.¹²



Osificación Intramembranosa

Los huesos planos del cráneo, partes del maxilar inferior y la mayor parte de la clavícula se desarrollan por osificación intramembranosa y deben denominarse huesos mesenquimáticos.¹⁵

La denominación intramembranosa se debe a que la formación de los huesos comienza dentro de una placa membranosa densa del mesénquima que rodea el cerebro.⁹

Osificación endocondral

Todos los demás huesos del organismo se forman por osificación endocondral y se denominan complejos osteocondrales.¹⁵

La osificación endocondral comienza sobre una pieza de cartílago hialino de forma parecida a la del hueso que va a constituir, pero de menor tamaño. Durante el desarrollo, el cartílago es sustituido por hueso, excepto en las superficies articulares.⁹

Las diferencias entre estos huesos de distinto origen se encuentran en la carga funcional y la vascularización. Por ejemplo, el hueso intramembranoso tiene una vascularización mayor que el de las extremidades, lo que puede ser un factor determinante en cuanto a permitir una mayor concentración de BMPs a nivel local.¹³

Este tejido dañado no conserva ni su arquitectura, ni su función original, sus propiedades y características no se corresponden al original existían; en éste se ha producido una reparación del tejido. En algunos casos, el proceso de restauración tiende hacia la creación de un tejido similar al original y no hay diferencia alguna con el tejido circundante, en este caso se habla de regeneración del tejido. Es precisamente esta diferencia entre reparación y



regeneración lo que nos lleva a estudiar cuál es la fisiología de los tejidos óseos para conseguir la regeneración.²⁰

2.3 Remodelado óseo

El crecimiento de los huesos consiste en la formación de tejido óseo nuevo con reabsorción parcial del tejido ya formado; de esta manera, los huesos mantienen su forma al tiempo que crecen.¹⁹

2.3.1 Fases de remodelado

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases.²²

Fase quiescente: Se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no están presentes.²²

Fase de activación: El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros, estructuras existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada, se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos.²²

Fase de reabsorción: Los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es realizado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).²²

Fase de formación: Simultáneamente en las zonas reabsorbidas, se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos

y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas.²²

Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular, Y de nuevo empieza la fase quiescente o de descanso, (figura 7).²²

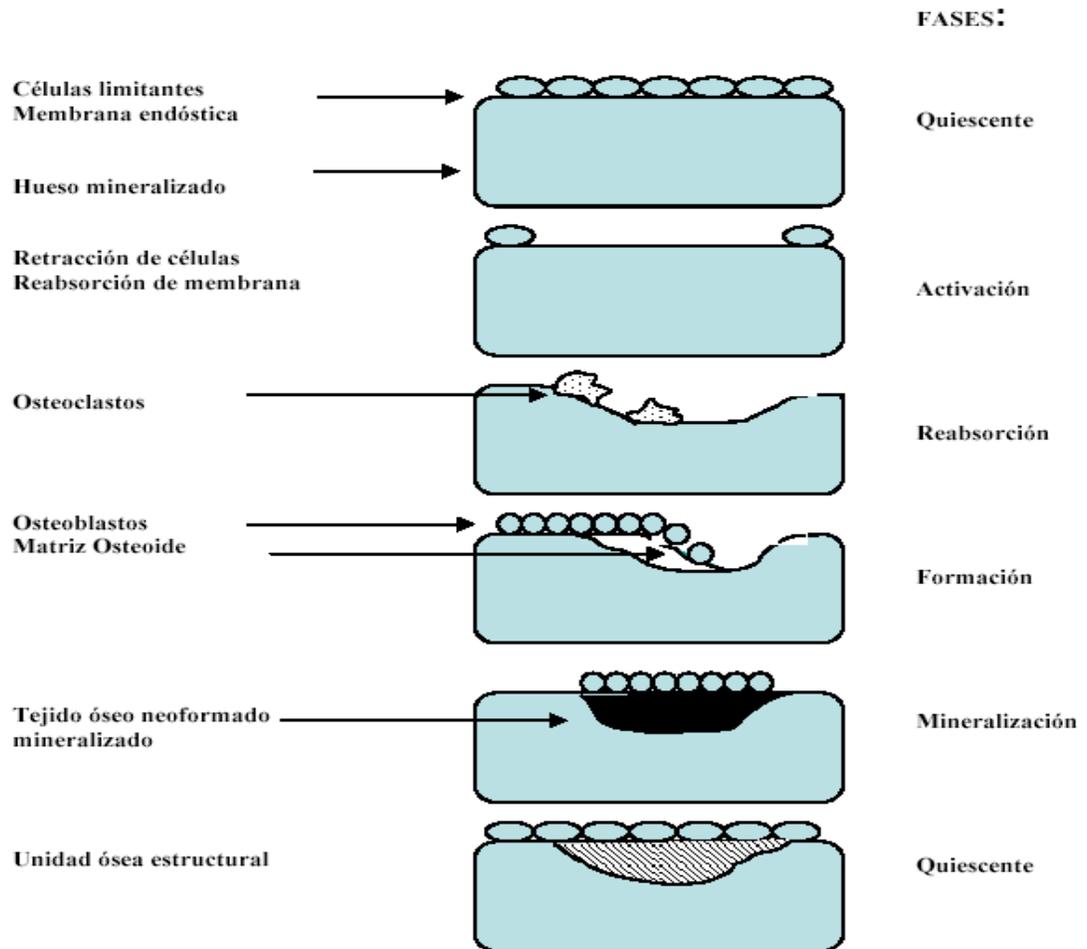


Figura 7 De las Fases de remodelado óseo.

CAPÍTULO 3. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son un conjunto de proteínas endógenas que pertenecen a los factores de crecimiento transformante beta (TGF-B) y que tiene la capacidad de inducir formación del hueso, corazón, riñones, ojos, piel, dientes, cartílago y el tejido conectivo.⁴ Entre los tipos celulares productores de los factores de crecimiento están los fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y leucocitos.⁵

3.1 Estructura

Las proteínas morfogenéticas óseas, en términos generales son moléculas diméricas constituidas por aproximadamente 120 aminoácidos, y es una secuencia de aminoácidos muy estable; se calcula que existe hace 600 millones de años.⁴

En el tejido óseo, las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, los condrocitos, plaquetas y células endoteliales producen BMP.⁷

Las BMP se sintetizan dentro de la célula en una forma precursora mediante un líder hidrofóbico secretor y pro- péptido con secuencias unidas a la región madura, figura 8.²³

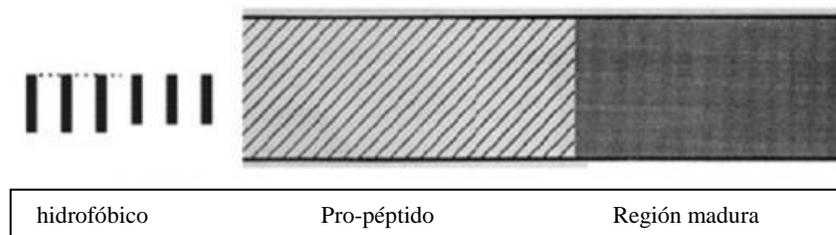


Figura 8 Forma precursora de proteínas morfogenética óseas.

Un denominador común entre las BMPs, es la presencia de un nudo de cisteína que implican 6 residuos de cisteína, así como un sitio de unión a heparina.¹¹

Las BMP se producen como proteínas precursoras grandes, que sufren dimerización de los enlaces de disulfuro proteolíticamente del consenso sitio Arg-XX-Arg, produciendo dímeros maduros. Se ha puesto de manifiesto que con la producción de la proteína madura procesada es controlada por la región N-terminal y la eficiencia de la división, se determina por la secuencia al sitio de escisión.²⁴

Las BMP se distinguen de otros miembros de la familia por tener, en general, siete, en lugar de nueve, cisteínas conservadas en la región madura. Las BMPs consisten en dímeros, cuyas cadenas están conectadas por enlaces disulfuro, y esta dimerización es un requisito previo para la inducción ósea. El monómero presenta tres enlaces disulfuro, el nudo de cisteína que constituye el núcleo de monómero, y cuatro hebras B-hoja antiparalela, que emanan desde el nudo que forman dos proyecciones similares a dedos, (figura 9).²³

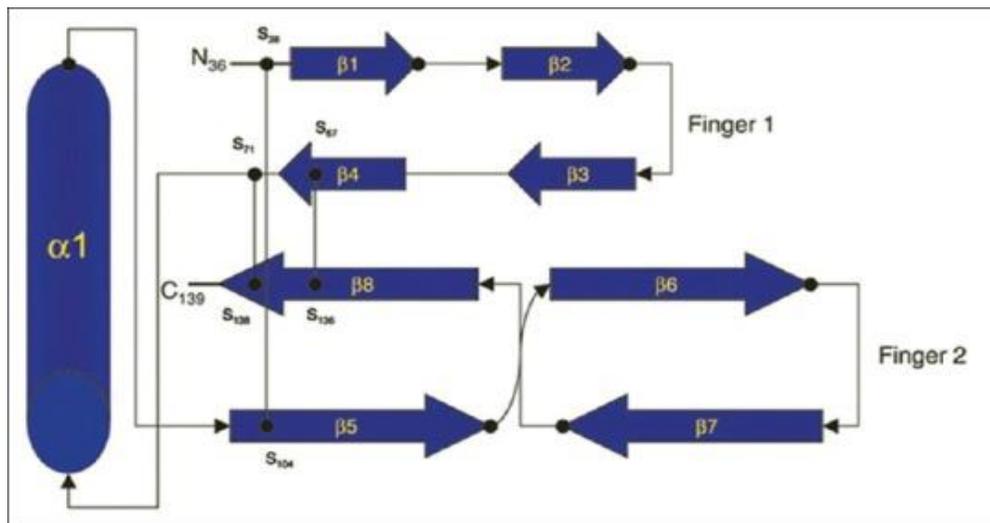


Figura 9 Forma madura de las proteínas morfogenéticas óseas.



3.2 Subgrupos o clasificación

Se han identificado más de 15 proteínas relacionadas con BMP, varias de las cuales inducen la formación de hueso,^{1,8} como se ve en la tabla 2.

Las BMP pueden clasificarse en cuatro subgrupos, tanto las BMP-2 como en BMP-4 tienen 80% de hemoglobina, forman parte del primer subgrupo.¹

La BMP-2 juega un papel fundamental en los procesos de condrogénesis y osteogénesis, la BMP-2 es considerada esencial en la reparación de fracturas.⁸

El segundo subgrupo incluye BMP-5,-6,-7(OP-1) y 8 (OP-2). La medida de la hemoglobina de secuencia de aminoácidos es de 78%.^{1,8}

La BMP-7 (OP-1), estimulan la producción de eritropoyetina, (hormona producida en el riñón) para la generación de eritrocitos desde células precursoras y tratamiento de la falla renal crónica.⁸

Las BMP-9,-10 forman el tercer grupo osteogénico, mientras que BMP-3 u osteogenina forman el cuarto grupo, es significativamente diferente de los otros miembros de la familia BMP y generalmente está solo.^{1,8}

Los otros miembros de la familia carecen de actividad osteogénica (BMP-12,-13,-14,-15,).⁸

La BMP-1 no es un miembro de la BMP, sino más bien una enzima proteasa C procolágeno, implicada en el procesamiento proteolítico de procolágeno soluble, que conduce al autoensamblaje de fibras de colágeno insolubles en la matriz extracelular.²⁵

No todas las diferentes BMP conocidas hasta la fecha son capaces de inducir la formación de hueso en sitios ectópicos. Este fenómeno solo está bien establecido para las BMP-2, BMP-4, BMP5, BMP6, y BMP-7. De todas ellas hay sólo dos proteínas que están implicadas en la actualidad en ensayos clínicos y sobre las que se han centrado la inmensa mayoría de las pruebas preclínicas publicadas, BMP-2 y BMP-7,²⁶ Figura 10.



BMP	CARACTERÍSTICAS
BMP-1	No pertenece a la familia TGF-B
- *BMP-2	Osteoinductiva, diferenciación osteoblástica, apoptosis.
BMP-3	BMP más abundante en hueso, inhibe la osteogénesis.
*BMP-4	Osteoinductiva, desarrollo del pulmón y ojo.
*BMP-5	Condrogénesis.
*BMP-6	Diferenciación osteoblástica, condrogénesis.
- *BMP-7	Osteoinductiva, desarrollo de riñón y ojo.
BMP-8	Osteoinductiva.
BMP -9	Sistema nervioso, sistema retículoendotelial hepático.
BMP- 10	Desarrollo cardiaco.
BMP- 11	Tejidos neuronales.
BMP-12	Formación de tejidos de tendón iléacos.
BMP-13	Formación de tejidos de tendón y ligamentos.
BMP-14	Mejora la cicatrización del tendón y la formación de hueso.
BMP-15	Estimula la actividad hormonal.

Figura 2 Clasificación de las BMPs En la siguiente tabla observamos las principales BMP.²⁰

*Mayor influencia osteoinductiva.
 - BMP recombinante



3.3 Funciones de las proteínas morfogenéticas óseas

Se ha demostrado que las BMP son factores de crecimiento secretados e implicados en la diferenciación de células madre mesenquimatosas; también se informa que participan en la diferenciación de células madre de cáncer.²⁷

Regula varias actividades mesenquimales osteoblásticas como las siguientes:

1. Quimiotaxis
2. Anclaje de células dependientes de fijación (fibronectina)
3. Replicación celular (mitosis)
4. Diferenciación de los osteoblastos
5. Actividad de la fosfatasa alcalina
6. Síntesis / mineralización de osteocalcina

Las BMP también juegan un papel crítico en la morfogénesis del diente. Las BMP 2, 4 y 7 se expresan en epitelio dental y las BMP 2 y 4 recombinantes pueden usarse como sustituto del epitelio dental para inducir la diferenciación del mesénquima. Las BMP-3 y BMP-7 han sido "inmunes" localizadas en el desarrollo de ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Por otra parte, BMP-2 se localizó sólo en el hueso alveolar durante la morfogénesis de la raíz. Un papel de BMP-3 en el linaje de cementoblastos ha sido sugerido por su localización en las células de revestimiento de las raíces.²⁵

BMP-I

Proteasa, puede funcionar como una proteínasa del procolágeno eliminando los grupos carboxílicos propeptídicos del procolágeno 1,11 y activa las demás BMP. Y no es osteoinductiva. Su ausencia puede tener relación con el Síndrome Langer-Giedion.²⁰ El síndrome de Langer-Giedion es una condición que causa anomalías en los huesos además de rasgos faciales distintivos.²⁸



BMP-2 (OP-2)

Osteoinductora. Tienen la función en embriogénesis y en la formación ósea mediante la diferenciación de osteoblastos, adipocitos, y condrocitos. Puede influir en la actividad osteoclástica. Participa en la diferenciación neuronal. Puede inhibir el sangrado óseo. Participa en la reparación de huesos blandos, reborde alveolar y procedimientos de injertos sinusales. Se localiza en huesos, bazo, hígado, cerebro, riñón, corazón y placenta.²⁰

BMP-3 (Osteogenina)

Osteoinductora. Interviene en la diferenciación condrogénica. Se localiza en pulmón, riñón, cerebro e intestinos.²⁰

BMP-4

Osteoinductora. En la embriogénesis interviene en la formación de la gástrula, el mesodermo se produce en la aorta dorsal, interviene en el proceso de reparación de fracturas. Su aumento tiene relación con las osificaciones ectópicas en el Síndrome de Fibrodisplasia osificante progresiva. Se localiza en meninges, pulmón, riñón e hígado.²⁰ La fibrodisplasia osificante progresiva (FOP) es una enfermedad muy poco frecuente del tejido conectivo caracterizada por malformaciones congénitas bilaterales del dedo grande del pie y osificaciones progresivas de los tejidos blandos músculos, tendones, fascias.²⁹

BMP-5

Osteoinductora. Funciona en la embriogénesis. Se localiza en pulmón, riñón e hígado.²⁰



BMP-6

No osteoinductora. Interviene en embriogénesis, maduración neuronal y regula la diferenciación de los condrocitos. Se localiza en pulmón, cerebro, riñón, útero, músculos y piel.²⁰

BMP-7 (OP-1)

Osteoinductora. Tiene la función en embriogénesis, reparación de huesos largos, del proceso alveolar y fusión de espina. Interviene en la diferenciación de los osteoblastos, condroblastos y adipocitos. Se localiza en las glándulas adrenales, cerebro, ojo, riñón, pulmón, placenta, bazo y musculatura estriada.²⁰

BMP-8

Osteoinductora. Participa en embriogénesis y espermatogénesis del ratón. En la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis en el ratón.²⁰

BMP-9

Osteoinductora. Estimula la proliferación de los hepatocitos, su crecimiento y función.²⁰

BMP-12 Y BMP-13

Inhibe la diferenciación de los mioblastos.²⁰

3.4 Mecanismo de acción

La matriz extracelular proporciona señales reguladoras e instrucciones y una superficie de anclaje para factores solubles como BMPs y factores de crecimiento. La unión de estos factores de la matriz puede facilitar su liberación controlada en respuesta a demanda local. Los mecanismos homeostáticos que rigen el funcionamiento de las BMPs y factores de crecimiento, su almacenamiento, protección, cinética de liberación e inactivación implica a la matriz y a las células, así como a sus receptores que son los que responden a dichas proteínas. Para lograr la regeneración son fundamentales las células, la sustancia fundamental insoluble, las moléculas



solubles, el entorno mecánico y vascular. Existen tres mecanismos relacionados con el éxito de la regeneración ósea y son la osteogénesis, la osteoinducción y la osteoconducción. La acción iniciada por factores de crecimiento plaquetarios será continuada a partir del tercer o cuarto día por factores de crecimiento liberados por macrófagos, los cuales son atraídos al foco por PDGF. La diferencia de gradiente de oxígeno entre coágulo y lecho receptor bien oxigenado atrae macrófagos ricos en PDGF, TGFbeta I, IGF-1 T y beta FGF, luego el coágulo es invadido por neovasos, durante este período por células osteocompetentes. Desde el día 10 hasta el final de la segunda semana ocurre la revascularización con anastomosis. Se completa el entramado trabecular de colágeno. Existe buena oxigenación equilibrándose el gradiente de oxígeno lo que limita la actividad de macrófagos. El pH se ha equilibrado, se frena la angiogénesis, los osteoblastos migran por la trama colágena y comienza así la formación de la matriz extracelular; la epitelización se ha completado.²²

A la tercer y cuarta semana se ha formado un hueso tipo I inmaduro. La fase de osteoconducción finaliza y comienza formación de hueso maduro tipo II. A la cuarta semana se inicia y completa la fase de sustitución progresiva y los monocitos se agregan transformándose en osteoclastos. Todavía el hueso es desorganizado, las trabéculas se van ordenando durante el segundo y tercer mes hasta completar hueso maduro. En este hueso existe menos células y más matriz extracelular, menos osteoclastos y más osteocitos.²²

Los receptores tipo II BMP son consecutivamente quinasas activas que transfosforilan receptores de tipo I en la unión del ligando. La unión óptima de la BMP se produce en presencia de receptores de BMP de tipo I y II.²³

La proteína quinasa receptora de tipo I de BMP fosforila la sustancia de señalización intracelular.²⁵

La unión óptima de la BMP se produce en presencia de receptores de BMP tipo I y II. Una vez que los receptores de BMP de tipo I y II se han unido a BMP, los receptores tipo II transfosforilan el tipo I. El receptor de tipo I fosforila varios mensajeros intracelulares: Smads 1, 5 y 8. El patrón de activación de Smad depende de qué BMP con el receptor Tipo I está activado. Las Smads intracelulares 1 y 5 son activados por los receptores de BMP-Ia y BMP-Ib, mientras que Smads 1, 5, y 8 son activadas por receptores quinasa-2 similares al receptor. Después de la fosforilación, el receptor Smads forma complejos heteroméricos con Smad-4, un co-Smad, antes de la translocación en el núcleo de la célula. Una vez dentro del núcleo, la transcripción se activa; el patrón de transcripción depende de la línea celular y el ligando utilizado, (figura 11).^{23,25}

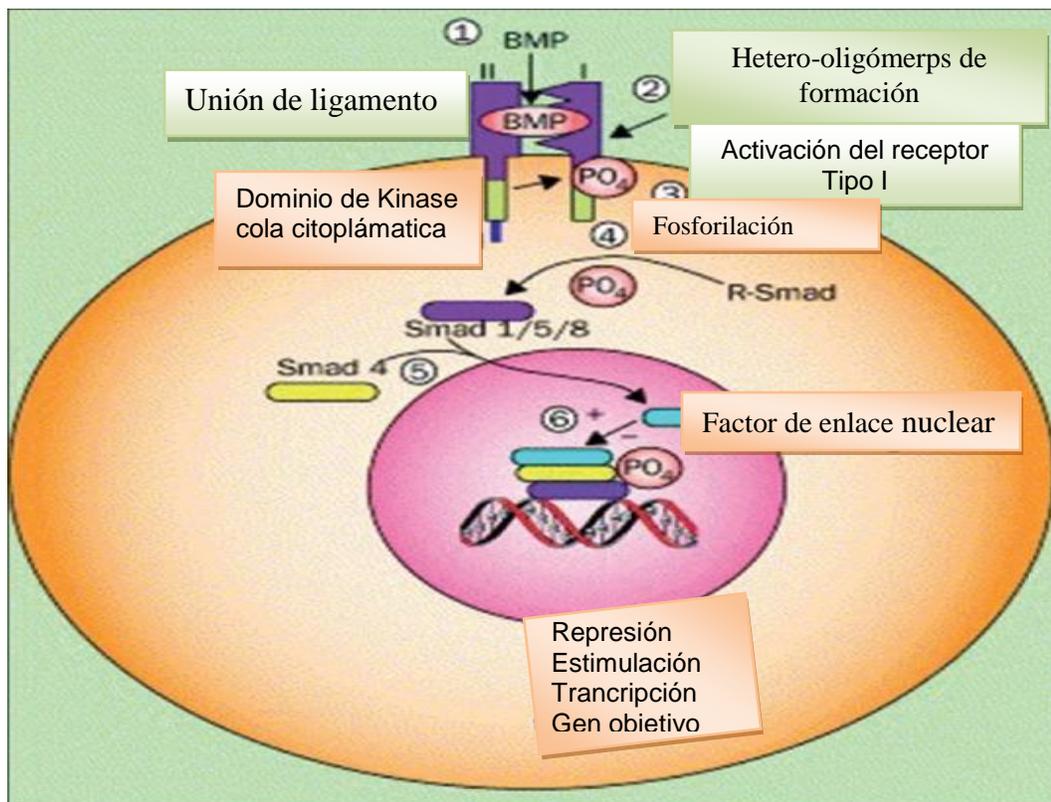


Figura 11 Mecanismo de acción de la proteína morfogenética ósea.



El mecanismo de acción de las BMP es mediado por la quimiotaxis de monocitos, los cuales producen TGF- β y a su vez promueven la quimiotaxis y proliferación de células mesenquimáticas. Las BMP inducen la diferenciación de éstas células a condrocitos, dicho fenómeno es seguido por una hipertrofia de los condrocitos, calcificación de la matriz ósea, diferenciación de osteoblastos y finalmente la formación ósea. La calidad del tejido óseo formado con BMP es indistinguible del tejido óseo formado sin BMP; sin embargo, las diferencias radican en la velocidad y en la dirección de la formación del tejido óseo.⁴

CAPÍTULO 4. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS

Las BMP se pueden obtener tanto por métodos enzimáticos como no enzimáticos y por medio de técnicas recombinantes, a pesar de los avances en las técnicas recombinantes para la producción de BMP, los mejores resultados clínicos se han obtenido con BMP de procedencia humana o animal, además la poca disponibilidad de productos recombinantes hace necesaria la continuación de la investigación con diferentes extractos de proteínas purificadas.²

Durante la fase inicial del proceso de reparación del hueso, las BMP se difunden a partir de la matriz ósea, que en una fase posterior son sintetizadas por las células osteogénicas que han sido reclutadas por las propias BMP y que son sometidas a un proceso de diferenciación osteoblástica, con ellas se consigue el mantenimiento de la acción reparadora sobre el tejido dañado con tiempo necesario para su reparación. Diversos análisis histoquímicos localizaron las BMP a lo largo de las fibras de colágeno de la matriz ósea, en mayor cantidad en el hueso cortical que en el hueso esponjoso.³⁰



Las BMPs se obtienen por procesos de:

- 1) Desmineralización de la matriz ósea con HCl, hidróclorido de guanidina, cloruro de calcio y urea
- 2) Purificación de cultivos de osteosarcomas
- 3) Por combinación genética (rhBMP)

Las proteínas recombinantes rhBMP-2, rhBMP4 y rhBMP7 inician la formación de hueso *in-vivo* incluso con equipotencia quimiotáctica entre ellas.³¹

Entre las distintas especies de las que fueron purificadas la BMP fueron las de hombre (hBMP), distintos primates, rata, cerdo, bovino (bBMP), ovinos y caninos (cBMP). Sólo dos aminoácidos hicieron la diferencia entre hBMP y cBMP, sin embargo, las capacidades inductivas de las BMPs de distintos orígenes muestran grandes variaciones.³¹

Diversos análisis histoquímicos localizaron las BMP a lo largo de las fibras de colágeno de la matriz ósea, en mayor cantidad en el hueso cortical que en el hueso esponjoso. El hecho de que la matriz ósea desmineralizada permita una mayor exposición de las BMP al hallarse libre del recubrimiento mineral ha favorecido que la mayoría de los estudios de osteoinducción se lleven a cabo a partir de este tipo de material.³⁰

La cBMP parcialmente purificada fue probada biológicamente en ratas e indujo formación ósea ectópica al cabo de tres semanas a dosis de 6.0 a 10.0 mg con signos de respuesta inmunitaria determinada por la infiltración linfocitaria rodeando al hueso, cromatográficamente la BMP fue caracterizada como una mezcla ácida de proteínas que contiene 3 fracciones con peso molecular variable 4-7-5; 7,6-12 y 70 a 120 Kda. Respectivamente, es la fracción dominante, la comprendida entre 4-12 Kda. La capacidad osteoinductiva de la cBMP fue semejante a la bovina y ovina superior a la porcina introducida en una cápsula de gelatina e implantada intramuscularmente en ratas.³¹



Las células del osteosarcoma de Dunn con trazas fenotípicas de osteoblastos producen factores similares a la BMPs con capacidad osteoinductiva. Takaoka y colaboradores purificaron por primera vez la BMP-4 partiendo de células de osteosarcoma de Dunn, examinando su sustancia polipeptídica y alguna de sus características bioquímicas.⁶

4.1 Descripción de una técnica sencilla de obtención de proteína a partir de hueso fresco congelado

En este estudio la técnica de la extracción que se describe tiene como objetivo la obtención de una solución de proteína ósea donde se halla contenida la BMP2.³⁰

Fue realizado a partir de huesos donantes vivos de cabeza de fémur, los huesos son congelados a -80°C sin manipulación previa y fragmentados con un fragmentador de hueso tipo GB 40 (AESCULAP, Tuttlingen, Alemania).³⁰

Se realizan una serie de lavados con la finalidad de eliminar los residuos de sangre y materia grasa. Posteriormente se lava con agua destilada a 4°C y por último se lava con éter. El hueso se deja secar toda la noche a temperatura ambiente con lo que se logra secar la muestra y eliminar los residuos del lavado. Se elimina la capa mineral (hidroxiapatita) que recubre la matriz ósea. Este proceso de desmineralización se consigue mediante la acción del HCl 0,5 N en forma de tres lavados a 4°C de una hora de duración cada uno. Siguiendo la técnica de Zhang y colaboradores, el contenido de calcio de cada una de las soluciones de lavado es analizado con un kit de Calcium Arsenazo III (Sigma, St Louis, Mo, USA) Para ello, se incuban $10\ \mu\text{l}$ de cada muestra con 1 ml de reactivo de arsenazo y se realiza una posterior lectura de la absorbancia a 450 nm. Mediante el ICP-espectrómetro de emisión atómica Perkin Elmer 2000 (PE, Foster City, CA) se determinó el calcio residual presente en la matriz ósea en las etapas de desmineralización. Los restos de ácido que quedan después de completar la



desmineralización son eliminados del material óseo mediante una serie de lavados con agua destilada a 4°C suplementada con inhibidores de las proteasas: ácido 6-aminohexanoico 0,1 M, Benzamide HCl 5 mM, PSMF 0,5 mM (Sigma, St Louis, Mo, USA) (1 0,2 1,29). Los lavados se realizan hasta obtener un pH aproximado de 5 que es adecuado para el mantenimiento de la BMP2. La extracción del material proteico ligado a la matriz ósea desmineralizada se logra mediante la acción de soluciones específicas que consiguen su solubilización. Con este fin, la matriz ósea desmineralizada es incubada en una solución de guanidina 4 M/HCl, EDTA 10 mM durante 48 horas a 4°C en agitación. Esta solución es suplementada con los inhibidores de proteasas pertinentes. Finalmente, los extractos proteicos obtenidos son dializados contra una solución de PBS suplementada con los mismos inhibidores de proteasas. La diálisis se prolonga durante 48-72 horas a 4°C con el fin de eliminar los restos de guanidina, ya que es causa de interferencia en los ensayos posteriores de cuantificación de proteína total y de BMP2.³⁰

4.2 Descripción de la obtención de las proteínas morfogenéticas óseas, parcialmente purificadas de hueso bovino

En este estudio se extraen proteínas morfogenética parcialmente purificadas de hueso bovino, que posteriormente pueden ser utilizadas como material osteoinducto en injertos óseos en combinación con otros biomateriales.²

Se utilizaron 3kg de hueso fresco de bovino (hueso cortical) obtenido de un matadero, refrigerado en hielo seco (-40°C). se elimina el tejido blando y la médula ósea, se lava con abundante agua destilada a 4°C para remover la mayor cantidad de residuos. El hueso se congeló luego de la limpieza, para evitar la desnaturalización de las proteínas y facilitar el proceso de molienda.



Se utilizó un Molino de cuchillas Thomas- Willey módulo 4, Philadelphia Pennsylvania para triturar los huesos hasta obtener partículas de 1mm ya que, a menor tamaño de partícula, mayor área de superficie de contacto con los reactivos, acortando el tiempo de exposición a la reacción ácida durante el proceso de desmineralización, disminuyendo así, la posibilidad de destruir los péptidos bioactivos responsables de la inducción de hueso. Para la extracción de lípidos Se tomaron 1678g de hueso molido, que fueron lavados con una mezcla de cloroformo - metanol (1:1) durante 6 horas, con agitación permanente, para facilitar la separación de lípidos. Posteriormente se filtró y se dejó secar a temperatura ambiente. Se tomaron 50 g del material resultante para realizar la prueba de Soxhlet utilizada para la extracción de componentes generalmente lípidos y de esta manera verificar que no tenga grasa residual. El cloroformo y el metanol son solventes orgánicos que disuelven los lípidos, separan las moléculas y ocupan los espacios sobrantes. El metanol convierte las grasas naturales presentes en ésteres y glicerol, las cuales son solubles en agua y el cloroformo desalcoholiza la suspensión. Con este procedimiento se controla la alineación de las moléculas en las membranas celulares, así conservan las características de la molécula sin cambios estructurales a nivel celular. Para la descalcificación se utiliza una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.6N durante 6 horas (25 meq HCl por gramo de hueso), con agitación permanente. Se filtró el material con papel Warthman N° 1, se lavó con agua destilada a 4°C para eliminar el exceso de ácido y estabilizar el pH de la solución. Se tomaron 50 g del material para la determinación de Calcio. El ácido clorhídrico extrae los fosfatos de calcio solubles en el ácido, aminoácidos, péptidos y otras sustancias de bajo peso molecular. Los minerales del hueso son solubles en ácidos orgánicos (HCl), sin digestión de los componentes proteicos no colágenos. La concentración de ácido usada para la desmineralización se encuentra entre 0.1 y 1.0 M siendo la concentración más adecuada para este procedimiento la de 0.5 M. Solubilización del colágeno, se adiciona a la



muestra una solución de Cloruro de Calcio (CaCl_2) 2M y ácido Etilendiaminotetracético (EDTA) 0.5 M por 12 horas a 4°C , con agitación permanente, filtrando luego con papel Warthman N° 1 y se tomaron 5g para la prueba de Van Gieson. El (CaCl_2) es una sal que convierte el colágeno óseo en gelatina permitiendo una rápida separación y solubilización de las BMP, facilitando su extracción. Las proteínas no colágenas solubles en agua, sialoproteínas, proteínas plasmáticas y fosfoproteínas fueron extraídas por conversión simultánea de la mayor parte del colágeno a una gelatina de matriz ósea insoluble. Obteniéndose así un material más purificado, disminuyéndose la posibilidad de reacciones adversas al momento de la implantación. Para la extracción de las BMP de la gelatina de matriz ósea insoluble, se tomaron 504 g para extraer las BMP solubles del colágeno.²

Se utilizaron 4 litros de una solución de urea 6M / CaCl_2 0.5 M/NEM (N – etilmaleimida) 1 mM / Benzamidina HCl 0.1 mM. a temperatura ambiente por 24 horas (1 Litro de cada uno). Se filtró la solución con papel Warthman N° 1. Se dializó (membranas de diálisis) con agua destilada por 3 días a 4°C (2 cambios de agua por día). Cuando el material de las bolsas se gelificaba se calentaba entre 30 y 35°C . El material que quedaba en las bolsas de diálisis se centrifugó a 10.000 r.p.m. para obtener un precipitado, el cual se lavó con agua fría a 4°C y se liofilizó. La solución de urea 6 M/ CaCl_2 0.5 M extrae las BMP solubles del colágeno, lo que también se logra por medio de la utilización de Guanidina-HCl.²

Para las pruebas de verificación del procedimiento químico llevado a cabo para la extracción de BMP de hueso bovino se realiza:

1. Prueba de verificación de grasa (prueba de Soxhlet). Metodología utilizada: Extracción con éter de petróleo, mediante calentamiento moderado.
2. Determinación de calcio. Metodología utilizada: Cuantificación por absorción atómica
3. Prueba tinción de Van Gieson.
4. Electroforesis en gel de poliacrilamida- dodecil sulfato sódico, figura 12.²

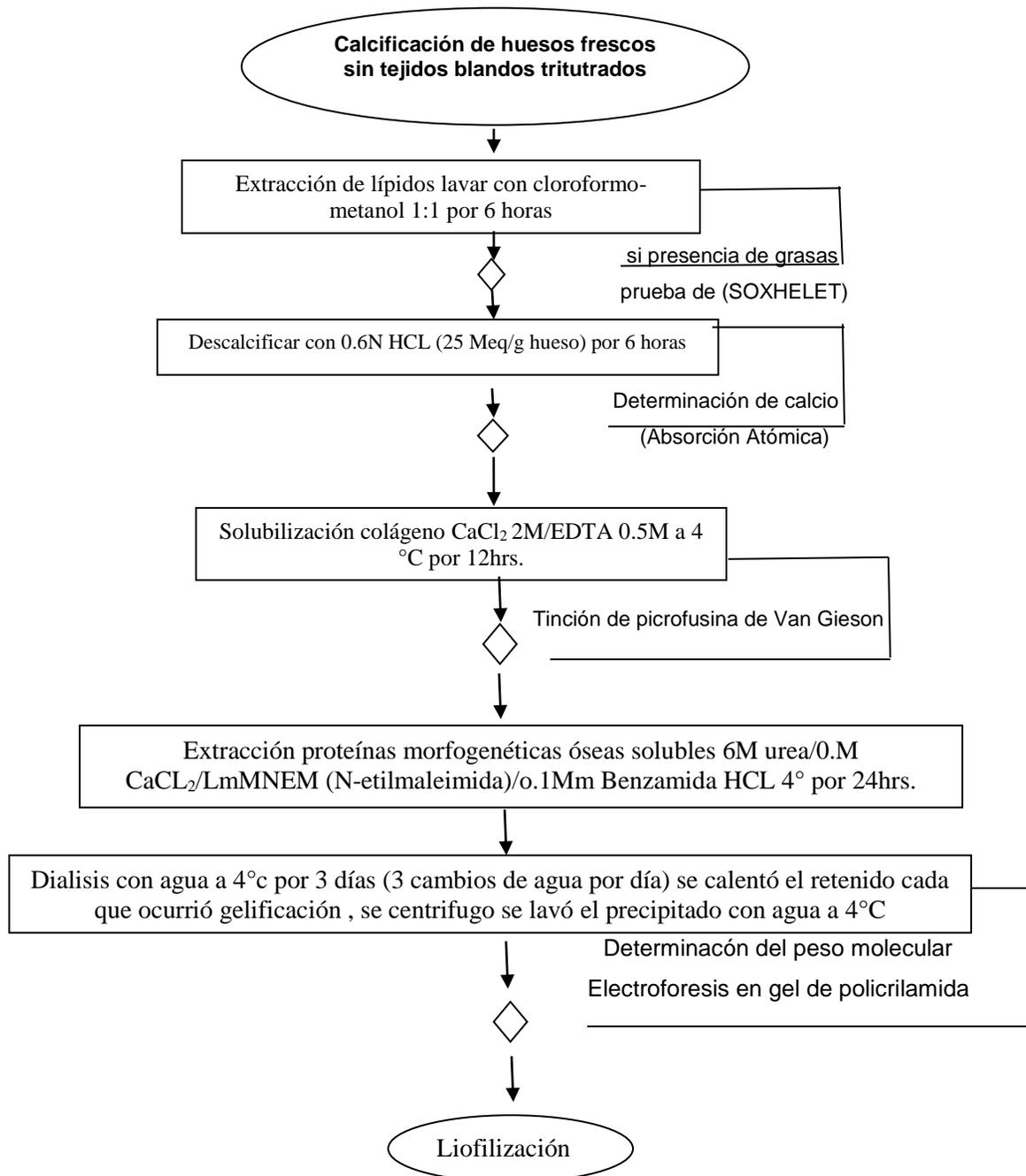


Figura 12 Procedimiento de obtención de BMPs.



4.3 Descripción de la obtención de rhBMP-2

Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, tecnología de ADN recombinante y genética para investigación, se logró obtener la primera rhBMP por Wozney en 1988.³

La producción de rhBMP-2 comienza con enzimas de fragmentos restringidos, que degradan el gen de BMP-2 a partir del cromosoma 20 en el genoma humano. Este gen humano viable se transfiere a un plásmido bacteriano, que es una porción circular de ADN bacteriano fuera de su núcleo normal. Este plásmido bacteriano se transfiere luego a un cromosoma en el ovario de un hámster chino (CHO), y las células se cultivan para aumentar su número. Como las células CHO producen una variedad de proteínas de hámster, también producen una proteína humana única (BMP-2), ésta se separa y se purifica por electroforesis y nanofiltración para producir una proteína puramente humana libre de proteínas bacterianas o animales y en concentraciones suficientemente altas para regenerar el hueso en seres humanos (rhBMP).²⁶

4.3.1 Contraindicaciones

- Hipersensibilidad conocida colágeno tipo I bovino o a rhBMP.
- Malignidad activa, incluso en el tratamiento.
- Embarazo.
- Infección activa en el sitio receptor.²⁶

4.3.2 Precauciones

- En niños menores de 18 años debido a la escasez de datos en pacientes con esqueleto inmaduro.
- En mujeres en etapa de lactancia.
- Las mujeres en edad fértil sin pruebas de embarazo.²⁶



CAPÍTULO 5. APLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS EN ODONTOLOGÍA

Las BMPs han sido ampliamente estudiadas y reconocidas como factores clave en una variedad de condrogénesis y osteogénesis, funciones durante el desarrollo embrionario normal.¹³

El retraso o la unión de las fracturas representan un obstáculo en el tratamiento de defectos óseos, lo que provoca dolor y una posible diferencia en la longitud de extremidad, además de potencial de necrosis y pérdida de función.⁸

Hoy se sabe que estas proteínas están involucradas en la regulación de las funciones de las células cancerígenas, que van desde el crecimiento, muerte, migración, invasión y transición epitelimesénquima. La proteína morfogenética ósea (BMP) es una proteína endógena que ha mostrado efectos significativos en la promoción de la formación ósea. El uso de la BMP ha sido descrita en la reconstrucción de defectos óseos de origen traumático y patológico, incluyendo la fisura alveolar, el aumento de reborde alveolar, la elevación de seno maxilar, regeneración periodontal, trauma maxilofacial y la fijación de implantes entre otros.^{4,25}

5.1 Reconstrucción de fisuras alveolares

En relación a la fisura alveolar, se han hecho estudios en animales (monos, perros, conejos o ratas) donde realizan una fisura alveolar quirúrgica es decir un defecto óseo de los injertos de la fisura alveolar en humanos. Se han comparado rhBMP-2 con distintos tipos de injertos o también se han estudiado distintas matrices para llevar la rhBMP-2 al defecto óseo.⁴

El procedimiento estándar para el tratamiento de fisuras alveolares, ha sido reportado por Boyne y Sands en 1998, quienes utilizan partículas autógenas de cresta iliaca. Actualmente, muchos pacientes se benefician del uso de



BMP-2 para inducir formación ósea en fisuras palatinas y eliminan la necesidad de intervenir un área donante.³²

5.2 Regeneración periodontal

En el campo de la regeneración periodontal, gran parte del interés de la investigación se ha centrado en la BMP-2 (OP-2), BMP-3 (osteogenina) y BMP-7 (OP-1). Las preparaciones brutas de BMP-2 y BMP-3 aplicadas en defectos de furca inducidos quirúrgicamente parecen estimular la regeneración periodontal.²⁵

La aplicación de BMP-2 humana recombinante, junto con el sistema portador produjo una regeneración sustancial de hueso y la regeneración periodontal siempre que se mantenga un espacio adecuado.²³

Estudios en perros Beagle que fueron implantados con rhBMP-2/ACS en diferentes concentraciones, demostraron extensa regeneración cementosa. Sin embargo, se observó anquilosis en todos los dientes que recibieron rhBMP-2/ACS sin correlación aparente con la concentración o dosis de rhBMP-2. Contrariamente a estos hallazgos, BMP-7 resultó en un aumento significativo en la regeneración sin anquilosis. Dada la acción única de BMPs en la formación de tejido mineralizado, la obliteración del espacio del ligamento periodontal y la anquilosis son una complicación potencial para el uso de BMPs en el periodonto^{1, 11}

5.3 Fijación del implante con BMP

En la fijación del implante, las BMP muestran gran expectativa, promesa en la promoción de la curación de heridas de implantes dentales. Un estudio piloto en primates no humanos probó la única aplicación de BMP-2(OP-1) alrededor de los implantes de sonda de extracción inmediata y se encontró un aumento del crecimiento óseo medido histológicamente a las tres semanas. La RhOP-1 acelera la cicatrización de los defectos de extracción



dental frescos y estimula la osteointegración de los implantes dentales con un buen ajuste inicial del implante. La aplicación de rhOP-1 produce la mejor calidad, densidad y grado de remodelación del hueso en comparación con los sitios de defectos no tratados.²³

5.4 Aumento del seno maxilar

La mucosa sinusal contiene células protegidas mesenquimales y células comprometidas con el linaje osteogénico que pueden responder a BMP-6 y BMP-7 por un aumento de su diferenciación osteogénica, en los humanos la aplicación de proteínas morfogenéticas óseas promueven el aumento de seno e indican que rhOP-1 y la matriz ósea desmineralizada tiene el potencial de inducir la formación de hueso después del aumento de senos. Colectivamente, éstos informes sugieren que la BMP-2 humana recombinante parece ser una alternativa segura y eficaz para los injertos óseos en pacientes que requieren procedimientos de aumento del piso del seno maxilar. Boyne y cols. implantaron láminas de colágeno empapadas en solución rhBMP-2 en los senos maxilares de doce pacientes edéntulos o parcialmente edéntulos con atrofia severa del maxilar. El aumento posterior de la altura maxilar tratado varió entre 2,3 y 15.7mm, aumento significativamente.²³

5.5 Aumento de reborde alveolar

Jovanovic y colaboradores, realizaron un estudio histológico en un modelo animal en el que se llevó a cabo un aumento de reborde alveolar. No se encontraron diferencias significativas entre los injertos con BMP-2 osteoinducidos, comparados con el hueso residente, estableciendo que la BMP-2 permite la instalación, oseointegración y carga funcional a largo plazo en implantes colocados en perro.³²



5.6 Trauma maxilofacial

Algunos estudios han sido realizados con el fin de evaluar la BMP-2 en el caso de trauma, demostrando su efectividad en el tratamiento de defectos segmentales completos o parciales de huesos largos. En daños severos en los que se presenta pérdida de tejidos blandos y duros, los tratamientos se enfrentan a desafíos que incluyen la obtención del cierre de los tejidos blandos y la prevención de la contaminación y pérdida de la BMP-2, como en el caso de heridas de bala, en donde puede llegar a existir una zona importante de daño necrótico, que puede requerir posterior debridamiento y reconstrucción.³²

5.7 Endodoncia

Otra posibilidad terapéutica se encuentra en el campo de endodoncia. Six y cols, examinaron la BMP-7 por su eficacia en la inducción de dentinogénesis reparativa en la pulpa expuesta de molares de ratas sobre las que se aplicaron bolitas de colágeno con BMP-7 como alternativa a tratamientos endodónticos convencionales.³³



CAPITULO 6. Efectos adversos de las proteínas morfogenéticas óseas

Entre los inconvenientes que presentan las BMP están la forma de manejo y la dispersión tras su aplicación clínica. Aunque fuera posible el aislar dicha proteína en grandes cantidades y de un modo sencillo, sería totalmente difícil rellenar un defecto óseo con dicha proteína, ya que, debido a su solubilidad, se dispersa inmediatamente, y como resultado obtendremos una escasa inducción ósea por lo cual se necesitará un andamio que contenga BMP.⁵

La función osteoinductiva de la BMP depende directamente de la dosis utilizada. Es por eso que se considera una desventaja importante los altos costos reportados, en el año 2014 en un estudio retrospectivo se logró hacer un aproximado de los costos y estos van de \$ 11,110 dólares para un procedimiento de autoinjerto y \$21,800 dólares para un procedimiento de rhBMP-2 dependiendo el tiempo de hospitalización y tipo de procedimiento quirúrgico.⁴ La cantidad a considerar cuando es para cartílago y cuando es para hueso.

Las BMP son capaces de regular el crecimiento de células cancerígenas de mama. Sin embargo, mientras que algunos tipos de BMP tienen efecto inhibitorio en la proliferación de células cancerígenas, otros presentan efecto adverso. Por ejemplo, BMP-2 y BMP-6 inhiben la proliferación de células cancerígenas en cáncer de mama, mientras que BMP-4 promueve de manera indirecta la proliferación de células cancerígenas al inducir la liberación de otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos FGF, el factor de crecimiento epidermoide EGF y el factor de crecimiento de hepatocitos HGF.⁸



Uno de los problemas que presenta la utilización experimental y clínica de las BMP's es la necesidad de disponer de un transportador adecuado para las proteínas. Urist asoció a las BMP's en proteínas no colágenas; Takoaka empleó como transportador el colágeno puro que presentó una clara ventaja frente a otros transportadores de la matriz ósea descalcificada; Miyamoto utilizó ácido poliláctico-prolietilén glicol (PLA) como transportador de las BMP's obtenidas a partir de osteosarcomas en ratas, pero Miyamoto llegó a la conclusión de que el PLA no era un adecuado transportador porque producía reacciones a cuerpo extraño como inflamación crónica y la absorción y sustitución por hueso nuevo era demasiado lenta. Por otro lado Katoh utilizó como transportador el hueso sintetizado cerámica ósea y por último García de Lucas pone de manifiesto que las BMP's combinadas con hidroxiapatita en ratas presentan una respuesta osteoinductiva en el tratamiento de defectos en la diáfisis de los huesos largos.⁶

Una de las desventajas que más preocupan es qué, con el uso de las BMP's además de regenerar hueso, cemento y ligamento periodontal, se produce anquilosis.¹ Subramaniam destaca la anquilosis y la obliteración del espacio del ligamento periodontal, como complicaciones y desventajas en el uso de las BMP's. Los efectos de la anquilosis, pueden ser explicados porque también las BMP's producen una resorción leve de la raíz dental. La anquilosis parece estar asociada con la formación de hueso nuevo de manera rápida.^{1,11}

Otro problema que se ha observado para la aplicación en seres humanos es que la mayoría de las investigaciones se han realizado en modelos animales de mamíferos pequeños; el comportamiento es diferente en mamíferos mayores y no se puede calcular la dosis proporcionalmente, porque las proteínas morfogenéticas no funcionan así.³



CONCLUSIÓN

Las aplicaciones clínicas de las BMPs recombinantes cada vez son más claras en los procesos de regeneración ósea básicamente en la rehabilitación de zonas desdentadas, fisuras alveolares, problemas maxilofaciales entre otras.

Este producto ha sido aprobado por la FDA mediante varios estudios; sin embargo, los retos no son precisamente, en la parte científica, si no en la aplicación de tecnología, tomando en cuenta ¿cómo podría la industria producir estas BMPs en una forma que los costos no sean tan altos y que este tipo de tratamientos puedan ser accesibles para pacientes con escasos recursos?, es necesaria más investigación para estimar de manera mas confiable y práctica la obtención de este producto así como el desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas que son aprobadas para la liberación controlada de BMP-2 y BMP-7.

Con esta investigación se puede concluir que las proteínas morfogenéticas óseas hoy en día son un estándar de oro para la reconstrucción oral y maxilofacial. En un futuro si se reducen los costos éste ya no será un problema para considerarlo como una alternativa confiable para el paciente cuando requiera regeneración ósea.

La proteína morfogenética representa una alternativa real en la aceleración de la formación ósea casi de la mitad del tiempo sobre todo la BMP-2 y la BMP-7 pero todavía se necesitan mayor cantidad de estudios clínicos para enfrentar los tiempos, rendimiento de la proteína y su funcionalidad.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Subramaniam M Rao, Grauri M Ugalde, y Shivaraj B Warad. Proteínas Morfogenéticas Óseas: Regeneración Periodontal. N Am J Med Sci. 2013 Mar; 5 (3): 161 – 168 (Jornal of Medical Sciences)
2. Jairo A Rivera, MVZ, PhD; Carlos H Riaño, MVZ, Esp; Paula A Monsalve, MV; Adriana Osorio, MV. Injertos óseos – Nueva alternativa. Fase I. Extracción de proteínas morfogenéticas parcialmente purificadas de hueso bovino. Rev Col Cienc Pec. Vol 16: 2, 2003.
3. Patricia Lorz Ulloa. Proteínas Morfogenéticas de hueso en oseointegracion: Revisión Sistemática de Literatura. Publicación Científica Facultad de Odontología. UCR. N7, 2005
4. Francisca Uribe, Mario Cantín; Juan Pablo Alister; Cristián Vilos; Rodrigo Fariña y Sergio Olate. Proteína Morfogenética Ósea y su Opción como Tratamiento de la Fisura Alveolar. Int. J. Morphol. Vol. 35 no. 1 Temuco mar. 2017.
5. M. Peñarrocha Diago, J.M. Sanchis Bielsa, J.M. Martínez González. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: aplicaciones en implantología oral. Periodoncia. 2001 Julio-Septiembre. Volumen 11. numero 3. Fasc. 5:205-2016
6. J. L. Peris, J. Prat, R. Dejoz, M. Comin, C. Atienza, J. S. Barreda, I. Roger, C. Reig y P. Vera. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs): Efecto de la proteína osteogénica – 1 (OP-1/BMP-7) en la condrogénesis y osteogenesis. Instituto de Biomédica de Valencia (IBV). Valencia Parque Tecnológico. Paterna (Valencia). Volumen 31; N.º 181 Enero-Febrero, 1996
7. Navarro Vila Carlos, Marin Garcia Fernando, Caicoya Ochandiano Santiago, Cirugia Oral. 1ª.ed. Madrid: ARÁN, 2008. Pp. 202-204
8. Gerardo Daniel Sierra-Garcia, Roció Castro-Ríos, Azucena González-Horta, Jorge Lara-Arias y Abelardo Chávez-Montes. Proteínas morfogenéticas óseas (BMP): aplicación clínica para la reconstrucción de defectos en hueso. San Nicolás de Los Garza, Monterrey, N.L., México, 2016; 152:381-5
9. Ponce Bravo. Histologia Basica Fundamentos de biología celular y del desarrollo humano. Editorial Medica Panamericana. Mexico 2016
10. Isabel Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil, Miguel Angel Alobera Gracia, Mariano del Canto Pingarron, Luis Blanco Jerez. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido ose. 2006; 11: E47-51
11. Inas El Bialy, Win Jiskoot, y M. Reza Nejadnik. Formulación, Entrega y Estabilidad de las Proteínas Morfogenéticas Oseas para la Regeneración Ósea Efectiva. Pharm Res. 2017; 34 (6): 1152-1170



12. Leslie P. Gartner, James L. Hiatt. Texto Atlas de Histología. 3ª.ed. Editorial Mc Graw Hill. 2007.Pp. 131-153
13. <https://blogunidad1.wordpress.com/acerca-de/> (citado en el año 2017)
14. <https://www.pinterest.es/pin/802414858578365445/> (citado en el año 2017)
15. Finn Geneser. Histología. Editorial Media Panamericana. 1993 enero, 2ª edición
16. <http://www.conganat.org/iicongreso/conf/018/osteobl.htm> (citado en el año 2017)
17. Gutierrez Gomez Jaime. El proceso de remodelación ósea. Medigraphic. 2008; (4) 170-176.
18. <https://www.pinterest.es/pin/641974121852495561/>
19. Luiz C. Junqueira, Jose Carneiro. Histologia Basica. 6ª.ed. Editorial medica panamerica. 2005. Pp.137-147
20. Antolín Bowen Antonio, Rodriguez Carmona Joaquín, Bacha Dorgan Carlos Juan, Gómez Pascua Teresa Maria, Nasimi Abdul, Pomar y Vega de González Alfonso. Atlas Práctico de Implantología Oral. Gaceta dental. 2006; 168: 201-211
21. <http://www.sabelotodo.org/fisiologia/fracturas.html> (citado en el año 2017)
22. Bueno Rossy LA. Factores de señalización, pilarea fundamentales en regeneración ósea. Revista de Fundación Juan José Carraro 2002; 7 (16): 33-40.
23. Supreet Kaur, Vishakha Grover, Harkiran Kaur y Ranjan Malhotra. Evaluación de Proteínas morfogenéticas óseas en la práctica periodontal. 2016 Jan – Mar; 7(1): 28-37
24. Zeeshan Sheikh, Mohammad Ahmad Javaid, Nader Hamdan, y Raheel Hashmi. Regeneración ósea mediante proteínas morfogenéticas oseas y diversos portadores de biomateriales. Abril 2015
25. Karuppanan P. Sasikumar, Sugumari Elavarasu, y Jayaprakash S. Gadai. La aplicación de proteínas morfogenéticas óseas a la regeneración periodontal y peri-implante de tejido: Una revisión de la literatura. 2012 Ago; 4 (Supl.2):5427-5430



26. Marx RE, Stevens MR. Atlas of oral and extraoral bone harvesting. Illinois, EUA: editorial Quintessence books; 2010.
27. Ana Claudia Oliveira Carreira, Willian Fernando Zambuzzi, Mariana Correa Rossi, Renato Astorino Filho, Mari Cleide Sogayar, José Mauro Granjeiro. Chapter Ten - Bone Morphogenetic Proteins: Promising Molecules for Bone Healing, Bioengineering, and Regenerative Medicine. Rev. Med. 2015; 99: 293- 322
28. <http://langergiedion.blogspot.mx/p/que-es-el-sindrome-de-langer-giedion-el.html> (citado en el año 2017)
29. Dres. Ariel Sferco, Celeste Naser, Hugo Robledo, Fili Teresita, Tramaut Bibiana. Fibrodisplasia osificante progresiva: pautas para su reconocimiento. Arch.Argent.Pedlair, 2001; 99(3)249
30. Sáez-Torres C, Calvo Benito J, Martínez Serra J, Gayà Puig A. Extracción de proteína ligada a la matriz ósea: descripción de una técnica sencilla de extracción BMP2 a partir de hueso de banco congelado. Patología del Aparato Locomotor, 2004; 2 (3): 167-175
31. <https://www.yumpu.com/es/document/view/2513072/revision-de-las-proteinas-morfogeneticas-del-hueso-pmh>
32. C.M. Ardila Medina. Bases teóricas y aplicación clínica de las proteínas morfogenéticas óseas en cirugía maxilofacial. Rev Esp Cir Oral Maxilofac 2009; 31 ,3 (mayo-junio): 151-156
33. Gonzalez Tena de Gloria. El gran potencial osteoinductor y osteorregenerador da la BMP-7. Revista dental, 2009 hallado en: <https://www.gacetadental.com/2009/03/protena-morfogenetica-sea-7-31658/> (citado en el año 2017)

GLOSARIO DE TÉRMINOS

GF: Factor de crecimiento

Rh: Recombinante humana

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

TGF- β : El factor de crecimiento transformante beta abreviatura de transforming growth factor beta)

BMP: Proteínas morfogénicas óseas

IGF: Factor análogo a la insulina

N-Terminal: Extremo de una proteína o polipéptido que finaliza con un aminoácido que posee un grupo amino libre.

Quimiotaxis: fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos uni o pluricelulares dirigen sus movimientos de acuerdo con la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

Soxhel: Extracción con el éter de petróleo, mediante calentamiento moderado.