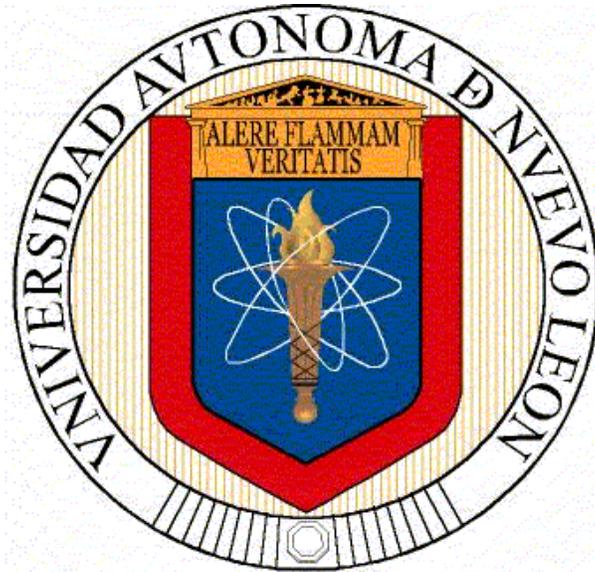


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL POTENCIAL DE
OSTEOINDUCCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE rhPDGF-BB Y rhBMP-2
EN REGENERACIÓN ÓSEA

POR

ELENA DERVILIA BALCÁZAR ARÉVALO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN
PERIODONCIA E IMPLANTOLOGÍA

NOVIEMBRE 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
POSGRADO DE PERIODONCIA E IMPLANTOLOGÍA



EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL POTENCIAL DE
OSTEOINDUCCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE rhPDGF-BB Y rhBMP-2
EN REGENERACIÓN ÓSEA

Por
Elena Dervilia Balcázar Arévalo

Como requisito para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias Odontológicas con Orientación en Periodoncia e
Implantología

Monterrey, N.L.

Noviembre 2013

EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL POTENCIAL DE
OSTEOINDUCCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE rhPDGF-BB Y rhBMP-2
EN REGENERACIÓN ÓSEA

Comité de tesis

Director de tesis

Secretario

Vocal

EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL POTENCIAL DE
OSTEOINDUCCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE rhPDGF-BB Y rhBMP-2
EN REGENERACIÓN ÓSEA

Director de tesis:
Dr. en C. Juan Manuel Solís Soto

Co-Director de tesis:
MCO Gloria Martínez Sandoval

Asesor estadístico:
Lic. Gustavo Israel Martínez Martínez

Dando siempre gracias por todo al Dios y Padre, en el nombre de nuestro Señor Jesucristo.

Efesios 5:20

AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro Señor, por iluminarme y guiarme en esta etapa de mi desarrollo profesional.

Al Dr. Juan Manuel Solis Soto, por su confianza, apoyo y orientación en la realización de este proyecto.

A la Dra. Gabriela Chapa Arizpe, por tener fe en mí, por sus consejos y ayuda durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Gloria Martínez Sandoval por su apoyo y ayuda desde el inicio hasta el final de este proyecto.

Al Dr. Daniel Garzón y el MVZ José Herrera por su ayuda y colaboración en una de las partes mas importantes del proyecto.

Al Dr. Carlos Reyes Escalera por su gran ayuda y consejos y a la Dra. María de la Luz Garza de la Garza por el apoyo brindado.

Al Lic. Gustavo Martínez por su acertada asesoría y trabajo estadístico.

A la Q.C. Irma Soni Loza, por su ayuda y consejos en la primera parte de esta investigación y a la QBP Karla Jiménez por su tiempo compartido y colaboración para la culminación de este proyecto.

Y en general a todos los que de una u otra forma tomaron parte en la formación de mi maestría.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios Padre, ya que sin su guía nada de esto hubiera sido posible. Gracias por iluminarme y permitirme culminar esta parte de mis estudios profesionales.

A mis amados padres Miguel Angel y Dervilia, por ser el pilar fundamental de mi vida, por todo su amor, comprensión, apoyo, sacrificio y por ser mi ejemplo a seguir. Para ellos todo mi amor, obediencia y respeto.

A Said, por su amor, comprensión y apoyo a lo largo de todo este proyecto.

A la Dra. Gaby, Dra. Brenda y Dr. Rubén por sus palabras de aliento y sobre todo por su amistad. Gracias por ayudarme a lograr el presente éxito profesional y por formar parte de mi vida.

A la Dra. Gloria Martínez por su apoyo y dedicación.

A mis hermanos mayores, Jesús, Katia Lety, Saraya, que de una u otra forma participaron y contribuyeron para que esta meta fuera alcanzada, gracias por estar siempre a mi lado.

A mis hermanas menores Dania, Isabella, Delia, por su comprensión y brindarme apoyo moral y sobre todo por su amistad incondicional.

A Myrna, por su amistad y apoyo a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A mis hermanos menores Isis, Andrés, Lucy, Rogelio, Ricardo, César, Andrea y Luis, por alentarme a seguir adelante siempre.

A todas las personas que de alguna u otra manera formaron parte de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VI
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo General	4
3.2 Objetivos Específicos	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1 Tejido óseo	6
4.1.1 Células óseas	6
4.1.1.1 Osteoblastos	6
4.1.1.2 Osteocitos	7
4.1.1.2 Osteoclastos	7
4.2 Formación de tejido óseo	8
4.3 Factores de mineralización	9
4.3.1 Osteopontina (OPN)	9
4.3.2 Osteopontegerina (OPG)	9
4.4 Modelado y remodelado óseo	10
4.5 Reparación de fracturas	11
4.6 Regeneración ósea	14
4.6.1 Propiedades de los injertos óseos	14
4.6.2 Tipos de injertos óseos	15
4.7 Factores de crecimiento	16
4.7.1 Proteínas morfogenéticas óseas (BMP)	16
4.7.2 Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Diseño del Estudio	22
5.2 Población del Estudio	22
5.2.1 Universo del Estudio	22
5.2.2 Tamaño de la Muestra	22
5.2.3 Criterios de Inclusión	23
5.2.4 Criterios de Exclusión	23
5.2.5 Criterios de Eliminación	23
5.3 Descripción del Procedimiento	24
5.3.1 Técnica Histológica de Parafina	25
5.3.2 Técnica de Inmunohistoquímica	27
5.3.3 Técnica de Hematoxilina de Harris	29
5.3.4 Técnica de Tricrómico de Masson	30

5.4 Variables	32
5.4.1 Dependientes	32
5.4.2 Independientes	32
5.5 Consideraciones Éticas	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Estadística Descriptiva	42
6.2 Estadística Inferencial	45
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	50
9. BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DEL POTENCIAL DE OSTEOINDUCCIÓN DE LA COMBINACIÓN DE rhPDGF-BB Y rhBMP-2 EN REGENERACIÓN ÓSEA

Introducción. Los factores de crecimiento polipéptidos son una clase de mediadores biológicos naturales que regulan los eventos celulares clave en la reparación tisular, incluyendo la proliferación celular, quimiotaxis, diferenciación y síntesis de la matriz mediante la unión a receptores de superficie específicos. El hueso es una fuente rica en factores de crecimiento con acciones importantes en la regulación de la formación y reabsorción ósea, entre los que se encuentran, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), entre otros.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de regeneración ósea (osteóide) y osteoinducción (factores de mineralización) del rhPDGF-BB y rhBMP-2 en defectos de tamaño crítico en el cráneo de ratas Sprague-Dawley a las 4 semanas de cicatrización

Materiales y Métodos. El diseño de esta investigación fue comparativo, abierto, experimental y longitudinal. La muestra consistió en 16 ratas Sprague-Dawley, las cuales se dividieron en grupos de 4, conformando así un grupo Control, un grupo Experimental 1 al cual se le colocó esponja de colágeno + 30µl a una concentración de 100 µg/ml de rhPDGF-BB; un grupo Experimental 2 al que se le colocó esponja de colágeno + 30µl a una concentración de 100 µg/ml de rhBMP-2; y un grupo Experimental 3, el cual consistió en la colocación de esponja de colágeno + 30µl a una concentración de 100 µg/ml de rhPDGF-BB + 30µl a una concentración de 100 µg/ml de rhBMP-2. Se dejó un período de cicatrización de 4 semanas y posteriormente se sacrificaron los especímenes.

Resultados Resultados. Tanto rhPDGF-BB como rhBMP-2 incrementaron la producción de osteoprotegerina y de osteopontina ($p < 0.05$). La combinación de ambos factores de crecimiento también incrementó la producción de ambos factores de mineralización ($p < 0.01$). Resultados semejantes fueron encontrados en la producción de osteóide por ambos factores.

Conclusión. La combinación de ambos factores de crecimiento aumenta la regeneración ósea demostrado por el incremento en la producción de osteóide y de los factores de mineralización osteopontina y osteoprotegerina.

ABSTRACT

EVALUATION AND COMPARISON OF THE OSTEOINDUCTIVE POTENTIAL BY COMBINATION OF rhPDGF-BB AND rhBMP-2 IN BONE REGENERATION

Introduction. Polypeptide growth factors are biological mediators that regulated key cellular events in the tissue reparation by binding to receptors. Bone is a source of growth factors with important actions in the regulation of bone formation and resorption., among those, we can find bone morphogenetic proteins (BMPs) and platelet derived growth factor (PDGF) and others.

The aim of the present study was to evaluate bone regeneration postential (osteoid) and osteoinduction (mineralization) of rhPDGF-BB and rhBMP-2 in surgically created critical size defects in rat calvaria at 4 weeks healing.

Material and methods. A critical size defect was made in each calvarium in 16 rats. They were divided into 4 groups: Control group (without growth factors); Experimental group 1, adding sponge collagen + 30 μ l rhPDGF-BB; Experimental group 2, adding sponge collagen + 30 μ l rhBMP-2 and Experimental group 3 defect filled with sponge collagen + 30 μ l rhPDGF-BB and 30 μ l rhBMP-2. Animals were sacrificed at 4 weeks; healing and formation of new bone was evaluated by immunohistochemistry.

Results. rhPDGF-BB and rhBMP-2 enhances the production of osteoprotegerin and osteopontin ($p < 0.05$). The combination of both growth factors increases the production of both mineralized factors ($p < 0.01$). Similar results were found in the osteoid production by both factors.

Conclusion. The combination of both growth factors enhances bone regeneration by increasing osteoid production and expressing positive cells to osteopontin and osteoprotegerin.

1. INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento polipéptidos son una clase de mediadores biológicos naturales que regulan los eventos celulares clave en la reparación tisular, incluyendo la proliferación celular, quimiotaxis, diferenciación y síntesis de la matriz mediante la unión a receptores de superficie específicos (Giannobile, 1996). El hueso es una fuente rica en factores de crecimiento con acciones importantes en la regulación de la formación y reabsorción ósea, tales como Factor de crecimiento derivado de insulina (I y II), la superfamilia del Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), donde se incluyen las Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Hill, 1998).

Las proteínas morfogenéticas óseas son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (Chen y cols., 2004). Las BMP se derivan del hueso que inducen la formación de cartílago y hueso *in vivo*. Esta actividad conduce a una serie de desarrollo de procesos donde se incluyen la quimiotaxis, proliferación y diferenciación (Wozney, 1989).

Se han identificado más de 40 miembros relacionados con esta familia, incluyendo BMPs, factores de crecimiento y de diferenciación (GDFs), TGF- β y sustancia inhibidora de Müllerian (Wozney, 1989). Las BMP-2, -4, -7 y -12 han sido evaluadas para regeneración periodontal y de peri-implantes (Terranova y cols., 1987). De este grupo de proteínas, las BMP-2 han sido las más estudiadas para el tratamiento de regeneración ósea y periodontal (Sigurdsson y cols., 1995).

Existen varios estudios que han demostrado el papel crítico de la matriz extracelular en la inducción ósea por BMP's, en particular en la morfogénesis y regeneración craneofacial

(Reddi y cols., 2000). Lee et al. demostró que barreras cerámicas impregnadas con BMP-2 mejora la regeneración cráneo facial *in vivo* (Lee y cols., 2003).

La formación ósea requiere de 3 componentes: una señal osteoinductiva, un sustrato adecuado en el que se entregue esta señal y uno que actúe como un andamio para la nueva formación de tejido óseo y responda a las células huésped capaces de diferenciarse dentro de las células óseas. Las señales responsables para la inducción de formación ósea son las proteínas morfogenéticas óseas (Reddi, 1992). La osteoinducción es el proceso por medio de cual las células madre mesenquimatosas en o alrededor del sitio hospedero son reclutadas como células osteoprogenitoras para diferenciarse dentro de osteoblastos maduros (Jeong y cols., 2005).

El PDGF es un polipéptido compuesto por dos cadenas y puede existir en 3 diferentes isoformas de dos productos de genes: AA, BB y AB. Sin embargo se han descubierto otras dos isoformas: la C y D, las cuales se expresan en el epitelio pigmentario de la retina (RPE) en el adulto (Hughes y cols., 1991).

Las actividades mitogénicas del PDGF y su liberación por plaquetas sugiere un papel en la cicatrización de heridas y reparación de fracturas. Es posible que el PDGF también juegue un papel en la reparación ósea después de la inflamación, sobre todo porque las acciones mitogénicas del PDGF se incrementan en presencia de las citocinas liberadas durante este proceso. (Marx y cols., 1998).

2. HIPÓTESIS

Debido a que los factores de crecimiento rhBMP-2 y rhPDGF-BB son osteoinductivos, la combinación de ambos factores de crecimiento acelerará el proceso de regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en ratas Sprague-Dawley.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el potencial de regeneración ósea (osteoides) y osteoinducción (factores de mineralización) del rhPDGF-BB y rhBMP-2 en defectos de tamaño crítico en el cráneo de ratas Sprague-Dawley a las 4 semanas de cicatrización.

3. OBJETIVOS

3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el potencial de osteoinducción del rhPDGF-BB, rhBMP-2, y la combinación de ambos factores de crecimiento a las 4 semanas de cicatrización analizando el crecimiento del osteoide y la cantidad de células productoras de osteopontina y osteoprotegerina
- Realizar un análisis morfométrico para la determinación de formación de tejido osteoide

4. ANTECEDENTES

4.1 Tejido Óseo

El hueso es un tejido vivo que tiene dos funciones primarias: soporte estructura y metabolismo de calcio (Roberts y cols., 1987). Posee una matriz de proteínas colágenas que esta impregnada con sales minerales, incluyendo fosfato de calcio (85%), carbonato de calcio (10%) y una pequeña cantidad de fluoruro de calcio y fluoruro de magnesio (Dolin y cols., 1974).

El tejido óseo consiste principalmente en cristales de hidroxiapatita y varios tipos de proteínas de la matriz extracelular incluyendo colágeno tipo I, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea y proteoglicanos (Young y cols., 1992; Robey y cols., 1993; Mundlos y cols., 1997). La sialoproteína ósea y la osteopontina contienen el péptido de secuencia de adhesión de células Arg-Gly-Asp y pueden mediar la adhesión de osteoblastos y osteoclastos a la matriz ósea (Francis y cols., 2006).

4.1.1 Células Óseas

El tejido óseo esta compuesto por varios tipos de células mesenquimatosas tales como osteoblastos, condrocitos, mioblastos y células de la médula ósea incluyendo adipositos. Estos linajes de células se originan del común progenitor mesenquimatoso llamado célula madre mesenquimatoso pluripotencial (Pittenger y cols., 1999).

4.1.1.1 Osteoblastos

Derivan de células pluripotenciales de origen mesenquimatoso (Yamaguchi y cols., 2000), son las células secretoras más activas en el hueso y son por lo general cuboidales o ligeramente elongados y revisten un gran porcentaje (dependiendo de la edad y sitio anatómico) de las superficies óseas y son los principales responsables de la producción de

matriz orgánica del hueso (Holtrop y cols., 1990). Cuando están diferenciados por completo y secretan proteínas de la matriz son considerados las células post-mitóticas que contienen un citoplasma rico en organelos sintéticos y secretores tales como el retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, gránulos secretores y microtúbulos. (McKee y cols., 1993; Scherft y cols., 1990). Expresan proteínas como la osteocalcina, osteopontina, osteonectina y otros proteoglicanos y factores señalizadores solubles (BMPs, TGF- β , IGF I y II, IL-1 y PDGF) (Grzesik y cols., 1994).

4.1.1.2 Osteocitos

Después de su maduración, los osteoblastos pueden someterse a apoptosis, se encierran en una matriz como osteocitos o permanecen en la superficie ósea como células de revestimiento óseo. Los osteoblastos que se convierten en osteocitos ocupan espacios (lagunas) en el hueso y se definen como células de revestimiento alrededor de la matriz ósea (Bonucci, 1990; Marotti y cols., 1990). La transformación de osteoblastos a células de revestimiento puede representar el fenotipo final del linaje de osteoblastos antes de que la activación de la secuencia de remodelado sea ocupada por esas células en esos sitios (Parfitt, 1990). El destino final de las células de revestimiento es su muerte por apoptosis (Jilka y cols., 1998).

4.1.1.2 Osteoclastos

Son células mieloides diferenciadas que se adaptan únicamente a remover la matriz de hueso mineralizado (Raggatt y cols, 2010). Se derivan de las CFU-GM (Unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos), las células precursoras de monocitos y granulocitos. Estas células se diferencian en precursoras de osteoclastos (Roodman, 1996). La importancia en la habilidad del hueso de responder a los factores biológicos y fuerzas funcionales es la

capacidad de los osteoclastos de reabsorber hueso. Además el acoplamiento de la reabsorción ósea con la formación ósea constituye uno de los principios fundamentales por las que se necesita el remodelado de por vida (Hayden y cols., 1995; Puzas y cols., 1992; Turner y cols., 1998)

4.2 Formación de Tejido Óseo

Durante la embriogénesis, el tejido óseo se forma a través de dos vías independientes: osificación intramembranosa y osificación endocondral (Karsenty, 1999; Yamaguchi y cols., 2000). En ambas vías los osteoblastos juegan papeles únicos en la formación ósea. En el caso de la osificación intramembranosa, los osteoblastos son diferenciados directamente a partir de células mesenquimales en la condensación mesenquimal. Por otra parte, en la osificación endocondral, las células mesenquimales se diferencian primero en condrocitos y forman una plantilla cartilaginosa. Entonces los osteoblastos son diferenciados a partir de las células mesenquimatodas circundantes inmediatamente después de la maduración de los condrocitos hipertróficos en la plantilla (Chung y cols., 1998). Este proceso de desarrollo del hueso y cartílago sugiere que los osteoblastos y condrocitos se derivan de la misma célula progenitora (Katagiri y cols., 2002). El RunX2 es un factor de transcripción óseo-específico que pertenece a la familia de Runx y juega un papel crítico en la formación ósea y maduración de los condrocitos *in vivo* (Qing y cols., 2007).

La formación del hueso, la cual parece estar relacionada con la reabsorción ósea para mantener la masa ósea, involucra la proliferación y diferenciación de las células madre del estroma a lo largo de una vía osteogénica que conduce a la formación de osteoblastos. El proceso donde el hueso es reabsorbido constantemente por osteoclastos y reemplazado por hueso nuevo por osteoblastos se llama remodelado (Ducy y cols., 2000). Por una parte, los osteoblastos tienen además de su papel como células formadoras de hueso, la habilidad de

regular la reabsorción ósea a través de la expresión del ligando del receptor activador (RANKL), el cual se une a su receptor RANK en la superficie de las células pre-osteoclasticas, induciendo su diferenciación y causando la reabsorción ósea. Por el contrario la osteoprotegerina (OPG) también es producida por osteoblastos y es capaz de bloquear la interacción RANK/RANKL uniéndose al RANK y así, previniendo la diferenciación y activación de osteoclastos y reduciendo la reabsorción ósea (Gori y cols., 2000).

4.3 Factores de Mineralización

4.3.1 Osteopontina (OPN)

También se le conoce como citocina Eta-1 y consiste en 314 aminoácidos (Mahipal y cols., 2010). Es secretada por glicofosfoproteínas adhesivas expresadas por muchos tipos de células. Normalmente se produce en hueso, dientes, riñón y células epiteliales de revestimiento y se encuentra en el plasma (Standal y cols., 2004). La OPN es una proteína multifuncional y juega un papel importante en una variedad de procesos biológicos, incluyendo la reabsorción ósea, activación de células inmunes, inhibición de la calcificación vascular y remodelado de la matriz extracelular (Scatena y cols., 2007). Influye en la homeostasis ósea por la inhibición de la deposición mineral por la promoción de la diferenciación de osteoblastos y mejorando la actividad de estos (Standal y cols., 2004). La función de la OPN en osteoclastos puede ser la promoción de adhesión de células y quimiotaxis durante la reabsorción ósea (Chellaniah y cols., 2003).

4.3.2 Osteoprotegerina (OPG)

La Osteoprotegerina es un miembro de la superfamilia de receptores TNF, la cual consiste en proteínas transmembranas que evocan la transducción de señales, mediante varias respuestas biológicas, como citotoxicidad, apoptosis y células de supervivencia, proliferación

y diferenciación (Simonet y cols., 1997). Es una glicoproteína soluble secretada por varias células mesenquimatosas como los osteoblastos y células de la médula ósea (Kondo y cols., 2004). La OPG se ha encontrado expresada en varios tejidos incluyendo pulmones, corazón, riñón, estómago, hígado, intestino, cerebro, glándula tiroides y hueso. La mayor acción biológica de la OPG es la inhibición de la diferenciación y actividad de los osteoclastos (Simonet y cols., 1997).

En un experimento realizado en el cráneo de un ratón se encontró que la OPG inhibe la liberación de osteoclastos del periostio y la adherencia de osteoclastos a la superficie ósea, inhibiendo la reabsorción ósea.(O'Brien y cols., 2001). El factor de crecimiento transformante (TGF- β 1) (Murakami y cols., 1998), y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP-2) (Hofbauer y cols., 1998) aumenta los niveles de OPG mRNA en las células osteoblasticas. En otro experimento se demostró que el TGF- β 1 regula de manera negativa la osteoclastogénesis a través de la inducción de OPG por las células del estroma y el balance entre OPG y TRANCE/RANK en el ambiente local puede ser un determinante importante de la reabsorción ósea osteoclástica (Takai y cols., 1998).

4.4 Modelado y Remodelado óseo

El hueso es un tejido metabólicamente activo capaz de adaptar su estructura a los estímulos mecánicos y reparar el daño estructural a través del proceso de remodelado (Robling y cols., 2006). El modelado y remodelado trabajan juntos en el crecimiento óseo para definir la forma apropiada esquelética, mantener los niveles séricos de iones y reparar regiones de hueso comprometidas estructuralmente (Frost, 1986).

Los osteoclastos y osteoblastos colaboran en el proceso de remodelado en lo que se llama "Unidad Básica Multicelular" o BMU. Esto indica que debe existir un mecanismo de acoplamiento entre la formación y reabsorción (Frost, 1964).

El modelado involucra sitios individuales de formación o reabsorción que cambian la forma del hueso. El remodelado involucra secuencias de activación celular (A), reabsorción ósea (R) y formación ósea (F). La duración del ciclo de remodelado ARF (σ) en el hombre es de 4 meses (Frost, 1986). El hueso trabecular se remodela a una tasa de 20-30% por año (Midgett y cols., 1981), el hueso cortical se remodela cerca de 2-10% por año. Ya que solo una porción de la corteza esta en la fracción metabólica, la tasa de remodelado para el hueso cortical es 3-10 veces menos que la del hueso trabecular adyacente (Parfitt, 1983).

4.5 Reparación de Fracturas

La cicatrización de fracturas óseas es un proceso que, a diferencia de la cicatrización de tejido blando, conduce a la formación de cicatriz y el resultado final de una cicatrización normal es la regeneración de la anatomía del hueso y devolverle la función. Por lo general, la cicatrización de fracturas se completa de 6-8 semanas después de la lesión inicial.

La reparación de fracturas puede dividirse en 3 fases:

1) Fase inflamatoria

Inmediatamente después de la lesión se lleva a cabo la respuesta inflamatoria, que alcanza su máximo en 48 horas y desaparece casi por completo en la 1ra. semana post fractura. En el sitio de la lesión, el daño vascular-endotelial resulta en la activación de la cascada del complemento, agregación plaquetaria y liberación de sus contenidos α -granulares. Los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), linfocitos, monocitos y macrófagos son atraídos al sitio de la herida y se activan para liberar citocinas que pueden estimular la angiogénesis. La sangre extravasada se coagulará. El hematoma se acumula dentro de los canales medulares entre la fractura y por debajo del periostio elevado y el músculo. Esta formación sirve como

una conexión hemostática para limitar la hemorragia además de convertirse en una red de fibrina que proporciona las vías para la migración celular.

2) Fase de reparación

Esta fase ocurre dentro de los primeros días, antes de que la fase inflamatoria termine y dura por varias semanas. El resultado de esta fase será el desarrollo de un tejido calloso reparativo en y alrededor del sitio de fractura, el cual será reemplazado por hueso. El papel del callo es aumentar la estabilidad mecánica del sitio. Los osteocitos localizados al final de la fractura se vuelven deficientes en nutrientes y mueren. Durante esta fase, el callo puede estar compuesto por tejido conectivo fibroso, vasos sanguíneos, cartílago, hueso entretejido y osteoide.

La osificación intramembranosa comienza dentro de los primeros días de fractura pero la actividad proliferativa parece cesar antes de las 2 semanas después de la fractura. A mediados de la segunda semana, hay abundante cartílago suprayacente en el sitio de fractura y comienza la calcificación por el proceso de osificación endocondral. Los condrocitos hipertróficos secretan primero proteoglicanasas neutrales que degradan los glucosaminoglicanos, ya que los niveles elevados de estos inhiben la mineralización. Conforme procede el proceso de mineralización, la calcificación del callo se vuelve más rígida y el sitio de fractura se considera inmovilizado internamente. Los capilares del hueso adyacente invaden el cartílago calcificado y aumentan la tensión de oxígeno. Esto es seguido por invasión de osteoblastos, los cuales forman cartílago y hueso entretejido.

3) Fase de remodelado

Esta es la fase final y comienza con el reemplazo del hueso entretejido por hueso laminar y la reabsorción de los excesos del callo. El remodelado de la reparación de la fractura después del reemplazo del hueso entretejido consiste en la reabsorción osteoclástica de las trabéculas y la formación de nuevo hueso a lo largo de las líneas de tensión. El

resultado de esta fase es una modificación gradual de la región de fractura bajo la influencia de las cargas mecánicas hasta que se alcance la estabilidad óptima. (Lieberman y cols., 2005).

Durante las etapas mencionadas anteriormente, se lleva a cabo la interacción de diferentes células vía varios factores de crecimiento, citocinas, receptores y moléculas de señalización intermedias:

- 1) Los macrófagos son unos de los principales tipos celulares presentes durante la primera etapa de reparación de heridas. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PGGF) es producido por macrófagos y es un potente estimulador de división ósea en células de origen mesodérmico como condrocitos y fibroblastos.
- 2) La segunda etapa involucra la replicación de fibroblastos y células condroprogenitoras en la capa del periostio.
- 3) La tercera etapa involucra la condrogénesis y proliferación de condrocitos así como producción de matriz de cartílago. En esa etapa se sugiere que participa el Factor de crecimiento derivado de insulina tipo I (IGF-I)
- 4) La última etapa involucra la producción de hueso a través de osificación endocondral. El factor de crecimiento transformante beta (TGF-b) es un estimulador potente de la división celular y de producción de matriz en células de origen condrogénico y osteogénico.

Tabla I.- LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN VARIOS TIPOS CELULARES EN LAS 4 ETAPAS DE REPARACIÓN DE FRACTURAS

Factor de crecimiento	Macrófagos	Capa cambiante	Fibroblasto mesenquimal	Condroblasto	Osteoblasto
PGDF	+	Etapa 1 -	-	No presente	No presente
FGF	-	Etapa 2 +	-	-	No presente
IGF-I	No presente	Etapa 3 -	-	+	-
TGF-b	No presente	Etapa 4 -	-	-	+

(Bourque y cols., 1993).

4.6 Regeneración Ósea

Los defectos óseos causados por traumatismo, resección ósea debida a cirugía ablativa o corrección de deformidades congénitas, son un problema común en la práctica clínica. En la mayoría de los casos, la capacidad de cicatrización del cuerpo es idónea para reparar el defecto, sin embargo existen casos donde el defecto es demasiado grande o las condiciones no son las óptimas para permitir la cicatrización. En estos casos es donde se requiere la ayuda de procedimientos de injertos óseos (Chatterjea y cols., 2010).

La regeneración es la renovación natural de una estructura producida por el crecimiento o diferenciación de nuevas células y sustancias intercelulares para formar nuevos tejidos o partes. La regeneración del hueso requiere: señales osteoinductivas y un sustrato adecuado en el cual la señal osteoinductiva va a ser cumplida. Se obtiene regeneración cuando se combinan estos elementos en un medio adecuado y a su vez, están influenciados por un entorno mecánico y vascular (Bernard 1991).

4.6.1 Injertos Óseos

Ellengaard et al. (Ellengaard y cols., 1973; Ellegaard y cols, 1974) y Nielsel et al. (Nielsen y cols., 1980) reportaron que los materiales para injertos en defectos óseos periodontales deben ser:

- a) Osteoproliferativos (Osteogénicos), lo que ocurre cuando los osteoblastos forman parte del injerto óseo, como es el caso del trasplante óseo autógeno, lo cual significa que el nuevo hueso se forma por las células formadoras de hueso que se encuentran en el material injertado.

- b) Osteoconductor, el material injertado no contribuye a la formación de nuevo hueso per se sino que sirve como un andamio para la formación ósea. Estos materiales facilitan la formación ósea ya que sirven como un puente entre el espacio del hueso ya existente y un lugar distante que no podría ocuparse con hueso.
- c) Osteoinductor, la formación ósea se induce en el tejido blando circundante que se encuentra adyacente al material injertado. Esta inducción se da a través de mediadores celulares que activan a las células formadoras de hueso, entre los mediadores que más se han estudiados encontramos a las proteínas óseas morfogénicas (BMPs).

4.6.2 Tipos de Injertos Óseos

Se han realizado muchas investigaciones clínicas y experimentos en animales en cuanto a la colocación de injertos óseos, estos materiales injertados pueden clasificarse en 4 categorías:

- Injerto Autógeno, el injerto se transfiere del mismo sujeto. Dentro de los sitios donadores tenemos: 1) hueso cortical o 2) hueso cancelar y médula, además de otros sitios como la cresta iliaca.
- Injerto Alógeno, el injerto es de otro individuo de la misma especie. Entre estos tenemos el 1) hueso esponjoso y de médula congelado y el 2) hueso liofilizado.
- Injerto Xenogénico, el injerto es tomado de un donador de otra especie diferente.
- Materiales Aloplásticos, los cuales son materiales sintéticos o inorgánicos que se utilizan como sustitutos de injertos óseos (Newman y cols., 2010). Entre los diferentes materiales disponibles, el hueso autógeno permanece como el estándar dorado para la regeneración ósea (Dragoo y cols., 1973; Froum y cols., 1983). Es un material orgánico que forma hueso mediante osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción (Misch y cols., 1993).

4.7 Factores de Crecimiento

Los factores de crecimiento polipéptidos son una clase de mediadores biológicos naturales que regulan los eventos celulares clave en la reparación tisular, incluyendo la proliferación celular, quimiotaxis, diferenciación y síntesis de la matriz mediante la unión a receptores de superficie específicos (Giannobile, 1996). Muchos factores de crecimiento se encuentran concentrados en la matriz orgánica de hueso y se liberan durante la reabsorción ósea (Cheifetz y cols., 1996) y se ha sugerido que juegan un papel en la remodelación ósea a través de un proceso de reabsorción y formación (Bonewald y cols., 1990; Erlebacher y cols., 1998; Mohan y cols., 1984).

El hueso es una fuente rica en factores de crecimiento con acciones importantes en la regulación de la formación y reabsorción ósea, tales como Factor de crecimiento derivado de insulina (I y II), la superfamilia del Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), donde se incluyen las Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Hill, 1998).

La matriz extracelular del hueso es conocida por ser un reservorio de factores de crecimiento (Hauschka y cols., 1986; Frolik y cols., 1988; Taipele y cols., 1997). La liberación de estas proteínas como las proteínas morfogenéticas óseas, proteínas derivadas de plaquetas, factores de crecimiento derivados de la insulina y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), después de una lesión o trauma, permiten la presentación de estos factores a las células diana, iniciando un proceso óseo reparativo en estos sitios (Schönherr y cols., 2000; Ramirez y cols., 2003)

4.7.1 Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP)

Las proteínas morfogenéticas óseas son factores de crecimiento multifuncionales que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (Chen y cols.,

2004). Las BMP se derivan del hueso que inducen la formación de cartílago y hueso *in vivo*. Esta actividad conduce a una serie de desarrollo de procesos donde se incluyen la quimiotaxis, proliferación y diferenciación (Wozney, 1989).

Se han identificado más de 40 miembros relacionados con esta familia, incluyendo BMPs, factores de crecimiento y de diferenciación (GDFs), TGF-beta y sustancia inhibidora de Müllerian (Wozney, 1989). Las BMP-2, -4, -7 y -12 han sido evaluadas para regeneración periodontal y de peri-implantes (Terranova y cols., 1987). De este grupo de proteínas, las BMP-2 han sido las más estudiadas para el tratamiento de regeneración ósea y periodontal (Sigurdsson y cols., 1995).

La BMP-1 es una proteasa no relacionada con otras BMPs (Daluisi y cols., 2001) y no regula el crecimiento y diferenciación de las células óseas; es una proteasa que rompe las fibras del procolágeno, el cual es un péptido que se une y antagoniza las acciones de las BMP-2 y -4 (Uzel y cols., 2001). Las BMP-2, -4 y -6 son las que se detectan más fácilmente en osteoblastos, donde juegan un papel autocrino en la diferenciación y función de células osteoblásticas (Canalis y cols., 2003).

Una función fundamental de las BMPs es inducir la diferenciación de las células mesenquimales hacia células del linaje osteoblastico para promover la maduración y función osteoblástica (Gitelman y cols., 1995).

Existen varios estudios que han demostrado el papel crítico de la matriz extracelular en la inducción ósea por BMP's, en particular en la morfogénesis y regeneración craneofacial (Reddi y cols., 2000). Lee et al. demostró que barreras cerámicas impregnadas con BMP-2 mejora la regeneración cráneo facial *in vivo* (Lee y cols., 2003).

La formación ósea requiere de 3 componentes: una señal osteoinductiva, un sustrato adecuado en el que se entregue esta señal y uno que actúe como un andamio para la nueva formación de tejido óseo y responda a las células huésped capaces de diferenciarse dentro de

las células óseas. Las señales responsables para la inducción de formación ósea son las proteínas morfogenéticas óseas (Reddi, 1992). El potencial osteoinductivo de las BMPs, en especial BMP-2, BMP-4 y BMP-7 las hace clínicamente valiosas como alternativas para injertos óseos (Gerhart y cols, 1993).

La osteoinducción es el proceso por medio de cual las células madre mesenquimatosas en o alrededor del sitio hospedero son reclutadas como células osteoprogenitoras para diferenciarse dentro de osteoblastos maduros. El reclutamiento y diferenciación son dos procesos característicos de la osteoinducción y se modulan por varios factores de crecimiento derivados de la matriz del injerto y de citocinas (Jeong y cols., 2005).

La secuencia de los eventos de inducción ósea iniciados por BMP-2 se parece mucho a la formación de hueso endocondral durante la embriogénesis, lo cual sugiere que las BMP-2 son un factor morfogenético que controla la osteogénesis (Rosen y cols., 1992). Aunque las BMPs pueden inducir tanto la osificación intramembranosa y endocondral, la evidencia sugiere que las BMP-2 estimulan solo la osificación intramembranosa normal dentro de defectos periodontales creados quirúrgicamente en animales sin tener en cuenta la dosis (King y cols., 1997).

Para mejorar la tasa de nueva formación ósea sin el uso de injerto óseo autógeno en procedimientos de injertos de seno maxilar, muchos autores han estudiado la viabilidad de los factores de crecimiento y citocinas para el aumento de seno maxilar, tales como BMP-2 y BMP-7, con resultados positivos (Groenveld y cols., 1999; Boyne y cols., 1997).

En un estudio se demostró que las BMP-2 inducen a la regeneración ósea in vivo en defectos en los cráneos de las ratas (Shin y cols., 2010), así como también posee propiedades osteoinductivas y estimula la proliferación de células periósticas (Inoda y cols., 2004). Los efectos de las BMP-2 en mandíbulas y cráneo también han mostrado cicatrización después del

patron de desarrollo de formación ósea con el proceso normal de remodelación (Toriumi y cols., 1991).

La esponja de colágeno absorbible fue el primer vehículo para las proteínas morfogenéticas óseas aprobado por la United States Food and Drug Administration. La esponja de colágeno absorbible es una matriz de colágeno bovino tipo I que es empapada con una proteína morfogenética ósea antes de su implantación quirúrgica. Muchos estudios han evaluado varias tecnologías de BMPs, incluyendo rhBMP-2 con esponja de colágeno absorbible para aumento de proceso alveolar y oseointegración de implantes endoseos (Huang y cols., 2008).

4.7.2 Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

Estudios in vitro han demostrado que el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el cual es secretado por plaquetas durante las etapas tempranas de cicatrización de fracturas, es mitogenico para osteoblastos y se localiza en los sitios de fractura tanto de humanos y ratones (Canalis y cols., 1989).

El PDGF es un polipéptido compuesto por dos cadenas y puede existir en 3 diferentes isoformas de dos productos de genes: AA, BB y AB. Sin embargo se han descubierto otras dos isoformas: la C y D, las cuales e expresan en el epitelio pigmentario de la retina (RPE) en el adulto (Hughes y cols., 1991).

El PDGF AA, BB y AB tienen acciones biológicas similares para las células del linaje osteoblástico. El PDGF BB es más potente que las isoformas AA y el PDGF AB tienen actividad intermedia (Centrella y cols., 1991). El PDGF tiene un papel importante tanto en la quimiotaxis y proliferación tanto de osteoblastos como de fibroblastos (Andrae y cols., 2008). Además el efecto angiogénico del PDGF, el cual es similar al efecto del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es favorable para la cicatrización de heridas óseas, ya que la

angiogenesis es un evento importante en la regeneración de nuevo tejido (Becerik y cols., 2009).

Tanto la isoforma AB y BB han demostrado ser estimuladores potentes de la migración y síntesis de DNA en el cráneo de las ratas así como en cultivos de células humanas (Centrella y cols., 1991).

Las actividades mitogénicas del PDGF y su liberación por plaquetas sugiere un papel en la cicatrización de heridas y reparación de fracturas. Es posible que el PDGF también juegue un papel en la reparación ósea después de la inflamación, sobre todo porque las acciones mitogénicas del PDGF se incrementan en presencia de las citocinas liberadas durante este proceso.

Por otra parte, un estudio demostró que la administración sistémica de PDGF en ratas deficientes de estrógeno previene la pérdida de la columna vertebral (Mitlak et al., 1996). El análisis histomorfométrico de estos animales reveló que el PDGF aumenta el número de osteoblastos, y, como consecuencia, la formación ósea. Estos resultados son consecuentes con los efectos mitogénicos del PDGF in vitro, el cual incrementa la replicación de preosteoblastos, resultando en un número aumentado de células osteoblásticas capaces de formar hueso.

Los papeles fundamentales del PDGF en el modelado y remodelado óseo son:

1. Aumentar el número de células necesarias para la formación de hueso (incluyendo los osteoblastos) en la zona de reparación.
2. Desencadenar la formación de capilares mediante su potente actividad mitogénica
3. Estimular el desbridamiento de la zona
4. Proporcionar una fuente continua de factores de crecimiento para las reparaciones óseas (Marx y cols., 1998).

El PDGF también ha demostrado potencializar la regeneración del periodonto en perros con periodontitis (Lynch et al., 1991), así como en monos con periodontitis experimental (Rutherford et al., 1992).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño del Estudio

- Número de muestras a estudiar: Comparativo
- Conocimiento que tienen los investigadores de los factores del estudio: Abierto
- Participación del investigador: Experimental
- Tiempo en que suceden los eventos: Prospectivo
- Relación que guardan entre si los datos: Longitudinal

5.2 Población del Estudio

5.2.1 Universo del Estudio

Se recopilarán las muestras de una población perteneciente a ratas macho Sprague-Dawley, de 450 gr. de peso, las cuales se mantendrán bajo las determinaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 en cuanto a especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5.2.2 Tamaño de la Muestra

$$n = \frac{z^2 pq}{e^2} = \frac{(1.96)^2 (0.60)(0.40)}{(0.5)^2} = 3.69 = 4$$

PCP	Proporción de Casos Positivos
PCN	Proporción de Casos Negativos
ES	Error Estándar
Z Est	Estadístico Z

Con la fórmula anterior y redondeando el resultado se obtuvo un número representativo de 4 ratas por grupo de estudio, dando un total de 16 ratas, 3 laminillas por cada espécimen, dando un resultado de 12 laminillas por grupo, se estudiarán 10 campos por cada laminilla, por lo que serán 120 campos visualizados por grupo y en total se observarán 480 campos.

5.2.3 Criterios de Inclusión

- Ratas macho de la cepa Sprague-Dawley.
- Ratas que hayan sido criadas en la unidad Experimental del Animal Facility del Centro de Investigación y Desarrollo de Ciencias de la Salud.
- Ratas de 12 semanas de edad.
- Ratas que tengan peso de 450 g.

5.2.4 Criterios de Exclusión

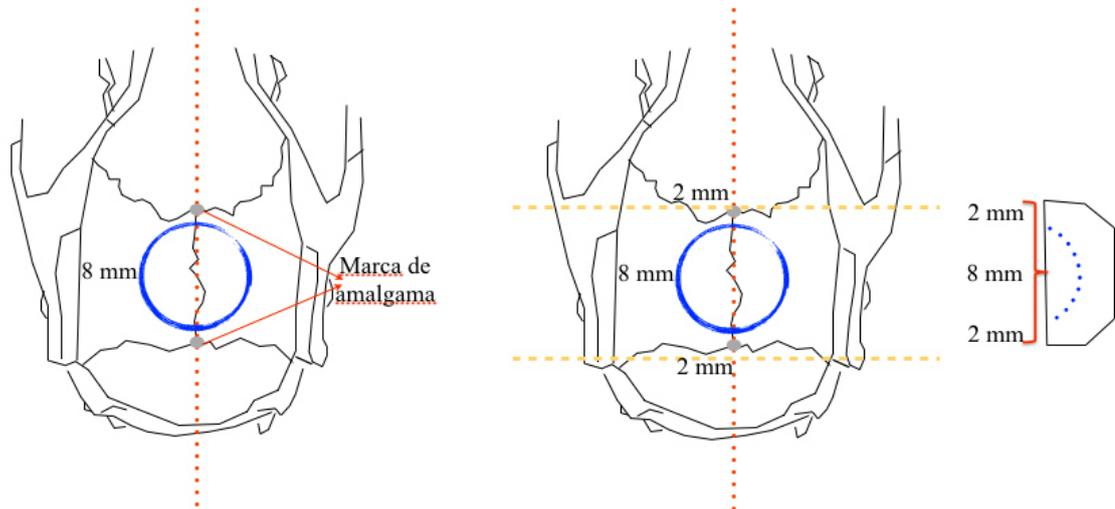
- Ratas que presenten cualquier tipo de alteración al inicio o durante el tratamiento experimental.
- Infección de la zona experimental.

5.2.5 Criterios de Eliminación

- Ratas que fallezcan durante el curso de la investigación.

5.3 Descripción del Procedimiento

1. Se crearán defectos bicorticales de 8 mm de diámetro en el lado derecho del hueso parietal con un micromotor y una trefina de 8 mm



2. Se colocará:
 - Grupo Control.- No se le colocará ningún tipo de tratamiento.
 - Grupo Experimental 1.- Esponja de colágeno + 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhPDGF-BB.
 - Grupo Experimental 2.- Esponja de colágeno + 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhBMP-2.
 - Grupo Experimental 3.- Esponja de colágeno + 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhPDGF-BB y Esponja de colágeno + 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhBMP-2.
3. Después de 4 semanas de cicatrización, se obtendrá de cada rata una muestra de tejido tratado con las proteínas antes mencionadas.
4. Posteriormente se proseguirá a procesar la biopsia por medio de la técnica histológica de parafina (Serán fijadas en formalina, descalcificadas utilizando la solución de Morse, por último se colocarán en parafina).
5. Se proseguirá a descalcificar la muestra con ácido fórmico.

6. Se realizarán cortes histológicos de 4 micras con un micrótomo.
7. Se realizarán tinciones con Hematoxilina y eosina y con Tricrómico de Masson para determinar el crecimiento del osteoide mediante un análisis morfométrico.
8. Se realizará la técnica de inmunohistoquímica para analizar la presencia de osteoprotegerina (OPG) y osteopontina (OP).
9. Analizar morfométricamente la presencia de células inmunoreactivas a los factores de mineralización.

Además, de cada corte histológico se realizara un análisis morfométrico de la biopsia obtenida. De cada zona se harán a su vez 10 conteos sistemáticos y ordenados con el microscopio de campo claro a un aumento de 40X.

5.3.1 Técnica Histológica de Parafina

Posterior a que las muestras se fijaron con formalina al 3.7% y se desmineralizaron, se prosiguió a iniciar el proceso de inclusión con parafina. Posteriormente se llevo a cabo el proceso de deshidratación, en el cual se emplearon alcoholes de menor a mayor concentración (del 50% hasta alcohol absoluto al 100%).

Se continuó con el proceso de aclaración, en el cual las muestras se colocaron en alcohol + xilol durante una hora y posteriormente en xilol tres veces. Una vez aclaradas las muestras se llevó a cabo la infiltración del medio de inclusión y se prosiguió a calentar la parafina en el horno a 60°C. Posterior a esto las biopsias fueron sumergidas en la parafina líquida y orientadas y se dejaron durante una hora. Una vez solidificados los bloques se desprendieron del vaso de plástico y se dejaron secar al aire.

Por último se llevaron a cabo los cortes en micrótomo con un grosor de 4µm para su posterior observación bajo el microscopio electrónico.

Procedimientos adicionales para realizar la técnica de parafina

- Albúmina de Meyer.

Procedimiento para preparar 5 tubos de 2ml: En una probeta de 10 ml poner una solución de cloruro sódico al 0,5 %, añadir 0,5 gramos de Albúmina de huevo, con ayuda de una varilla de vidrio limpia mezclar la solución con la albúmina (sin agitar realizando movimientos circulares con la varilla, si se agita se formará espuma que no es deseable). Con ayuda de papel de filtro y un embudo filtrar la solución. Mezclar a partes iguales la solución anterior con glicerol y volver a mezclar sin hacer espuma. Separa la solución en tubos de 2 ml y almacenar a 4° C. La solución debe extenderse sobre los portaobjetos a temperatura ambiente.

- Formaldehído.

En una probeta de 100 ml poner 10 ml de Formaldehído al 37% y llenar a 100 con agua destilada. La concentración final de formaldehído es 3.7 %. A ésta solución se la denomina formalina.

- Preparación de Alcoholes a diferentes concentraciones.

En una probeta de 100 ml se depositan X ml de alcohol etílico absoluto y se completa con agua destilada hasta llenar los 100 ml. El resultado es una solución de X %.

- Preparación de Alcohol-Xilol.

En una probeta de 1000 ml se colocan 250 ml de alcohol etílico absoluto + 250 ml de xilol, para después llevarlos a un recipiente de vidrio. El resultado es una solución de 50% alcohol – 50% xilol.

- Buffer PBS.

Solución Buffer PBS (Phosphate Buffered Saline) sin tritón pH 7.2 – 7.4:

1. Para 2 lt de H₂O₂ :
 - a. Fosfato de Sodio Dibásico (Na₂HPO₄): 43.6 gr.
 - b. Fosfato de Sodio Monobásico Monohidratado (NaH₂PO₄H₂O): 12.8 gr.
2. Revisar el pH de la solución con el aparato pH-metro.

Solución Buffer PBS (Phosphate Buffered Saline) con tritón pH 7.2 – 7.4:

1. Para 2 lt de H₂O₂:
 - a. Fosfato de Sodio Dibásico (Na₂HPO₄): 43.6 gr.
 - b. Fosfato de Sodio Monobásico Monohidratado (NaH₂PO₄H₂O): 12.8 gr.
 - c. Tritón X-100: 2 ml.
2. Revisar el pH de la solución con el aparato pH-metro.

5.3.2 Técnica Inmunohistoquímica.

1. Colocar en estufa a 70 °C durante aproximadamente 5 minutos, hasta que se disuelva la parafina.
2. Desparafinar con xilol durante 15 minutos 2 veces.
3. Se coloca en alcohol + xilol (250 ml de alcohol + 250 ml de xilol) durante 5 minutos.
4. Hidratar con alcoholes en grado decreciente:
 - a. OH 100% durante 5 minutos.
 - b. OH 90% durante 5 minutos.
 - c. OH 70% durante 5 minutos.
 - d. OH 60% durante 5 minutos.
 - e. OH 50% durante 5 minutos.
5. Para eliminar la peroxidasa endógena, se colocan en una solución de 500 ml de Metanol + 4.95 ml de Peróxido de Hidrógeno al 30% (H₂O₂ al 0.03%) durante 20 minutos.
6. Colocar en OH 50% durante 5 minutos.

7. Lavar con solución Buffer PBS sin tritón pH 7.2 - 7.4 durante 5 minutos.
8. Lavar con solución Buffer PBS con tritón pH 7.2 - 7.4 durante 10 minutos.
9. Lavar con solución Buffer PBS sin tritón pH 7.2 - 7.4 durante 5 minutos.
10. Colocar pap-pen sobre la laminilla alrededor del corte histológico.
11. Incubación del 1° anticuerpo:
 - a. Dilución 1:500, 1µl de Ac: 500 µl Buffer con tritón, 166 µl por cada laminilla.
 - ✓ Osteoprotegerina Goat Polyclonal IgG 200 µg/ml. Osteopontina Goat Polyclonal IgG 200 µg/ml
 - b. Durante 12 horas a temperatura ambiente.
12. Lavar por separado las laminillas de cada anticuerpo en solución Buffer PBS con tritón pH 7.2 -7.4 durante 15 minutos.
13. Incubación del 2° anticuerpo:
 - Dilución 1:500, 1µl de Ac: 500 µl Buffer PBS con tritón pH 7.2 – 7.4, 166 µl por cada laminilla.
 - a) Donkey Anti-Goat IgG 200 µg/0.5 ml
 - Durante 2 horas a temperatura ambiente.
14. Lavar por separado las laminillas de cada anticuerpo en solución Buffer PBS sin tritón pH 7.2 – 7.4 durante 15 minutos.
15. Aplicación de DAB al 0.05% + H₂O₂ al 0.04%:
 - a. 2 ml de Buffer PBS sin tritón pH 7.2 – 7.4 + 0.001 gr de DAB + 2.7 µl de H₂O₂.
 - b. 166 µl por laminilla.
 - c. Durante 40 a 50 segundos.
16. Lavar con Buffer PBS sin tritón pH 7.2 - 7.4 durante 5 minutos.
17. Deshidratar con alcoholes de menor a mayor concentración:

- OH 50% durante 5 minutos.
 - OH 60% durante 5 minutos.
 - OH 70% durante 5 minutos.
 - OH 100% durante 10 minutos.
18. Se coloca en alcohol + xilol (250 ml de alcohol + 250 ml de xilol) durante 5 minutos.
19. Aclarar con xilol durante 15 minutos 2 veces.
20. Montaje con entellan y cubreobjetos.

5.3.3 Tinción con Hematoxilina de Harris.

1. Colocar las laminillas durante 30 minutos en xilol para eliminar los cubreobjetos.
2. Cambiar a xilol nuevo durante 5 minutos 2 veces.
3. Colocar en alcohol + xilol (250 ml de alcohol al 100% + 250 ml de xilol) durante 5 minutos.
4. Hidratar con alcoholes en grado decreciente:
 - OH 100% durante 5 minutos.
 - OH 70% durante 5 minutos.
 - OH 50% durante 5 minutos.
5. Lavar con Buffer PBS sin tritón pH 7.2 – 7.4 durante 5 minutos 2 veces.
6. Colocar en Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
7. Enjuagar con agua destilada 5 minutos 2 veces.
8. Deshidratar con alcoholes en grado creciente:
 - OH 50% durante 5 minutos.
 - OH 70% durante 5 minutos.
 - OH 90% durante 5 minutos.
 - OH 100% durante 5 minutos.

- OH 100% durante 5 minutos.
9. Colocar en alcohol + xilol (250 ml de alcohol al 100% + 250 ml de xilol) durante 5 minutos.
 10. Aclarar con:
 - a. Xilol durante 5 minutos 2 veces.
 11. Montar con entellan y un cubreobjeto

5.3.4 Tinción de Masson

1. Desparafinar los portaobjetos
 - Estufa durante 30 minutos a 60°
 - Sumergir en xilol durante 10 a 15 min
2. Hidratación
 - Alcohol absoluto 5 minutos.
 - Alcohol 95° durante 5 minutos
 - Alcohol 70° durante 5 minutos
3. Lavar en agua destilada
4. Sumergir en líquido Bouin durante 1 hr
5. Lavar con agua destilada hasta que desaparezca el color amarillo
6. Hematoxilina de Weigert durante 10 minutos
7. Lavar con abundante agua corriente
8. Teñir en solución Biedrich Scarlett-fucsina ácida durante 2 minutos
9. Lavar con agua destilada
10. Colocar en solución ácido Fosfomolibdico-fosfotúngstico
11. Lavar con agua destilada
12. Teñir en azul de anilina durante 5 minutos

13. Lavar con agua destilada

14. Deshidratar

- Alcohol 95 por 2 minutos
- Alcohol 100 por 5 minutos

15. Aclaramiento (Xilor por 5 minutos)

16. Montaje

5.4 Variables

5.4.1 Dependientes

- Osteoinducción: El tejido óseo expresa factores de mineralización mediante la aplicación de rhPDGF-BB o rhBMP-2

5.4.2 Independientes

- 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhPDGF-BB/ACS
- 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhBMP-2/ACS
- 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhBMP-2/ACS + 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhPDGF-BB/ACS.

5.5 Consideraciones Éticas

Se recopilarán las muestras de una población perteneciente a ratas macho Sprague-Dawley, de 450 gr. de peso, las cuales se mantendrán bajo las determinaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 donde se citan las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5. RESULTADOS

En las fotomicrografías se observó la expresión de células positivas tanto a Osteopontina como Osteoprotegerina. En los grupos control sin embargo no se observaron células positivas (Fig 1) a comparación de los grupos experimentales (Fig 2). Sin embargo los grupos experimentales 3, los cuales consistieron en la combinación de rhPDGF-BB y rhBMP-2 tuvieron una mayor expresión de células positivas a ambos factores de mineralización a diferencia de los grupos control y experimental 1 y 2 (Figura 3 y 4).

Fig. 1 Grupo Control anti-Osteoprotegerina, intervalo 4 semanas de cicatrización 40X. Técnica Inmunohistoquímica

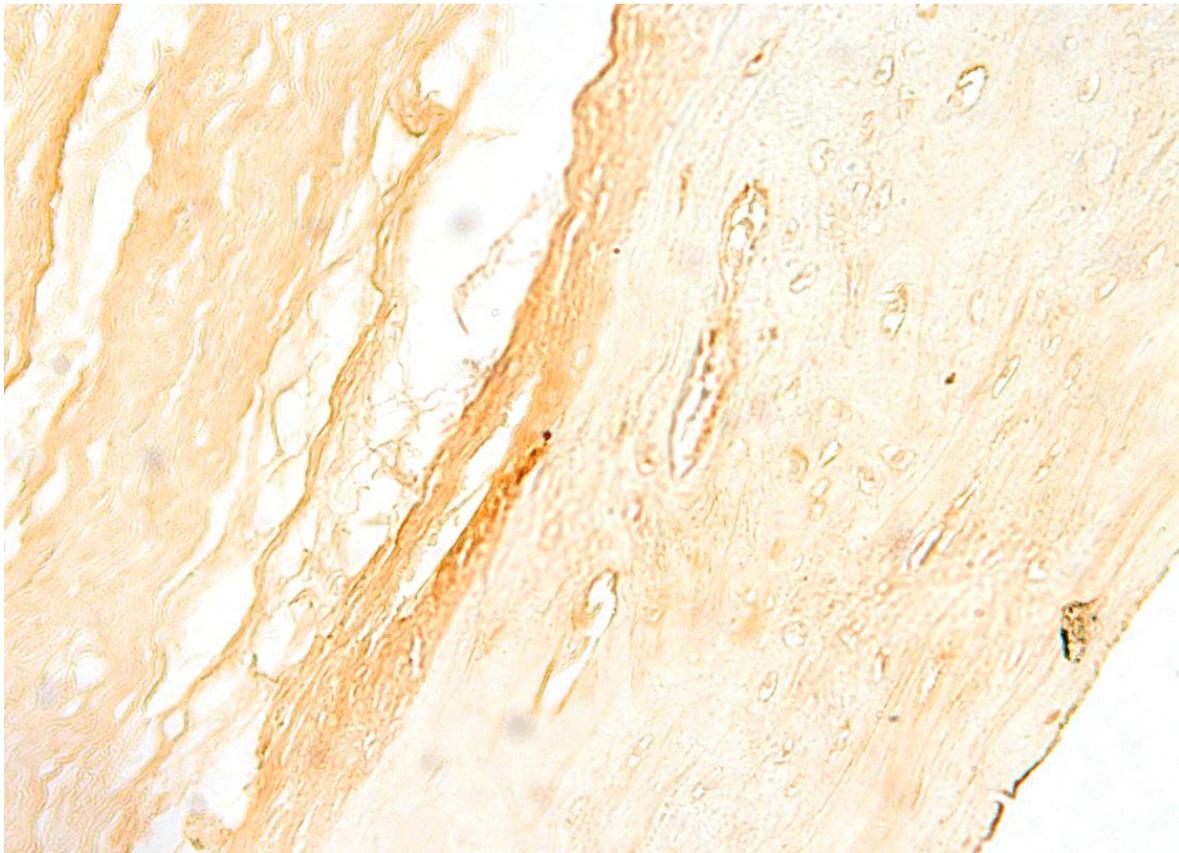


Fig 2. rhBMP-2/ACS anti-Osteoprotegerina, intervalo 4 semanas de cicatrización 40X. Técnica Inmunohistoquímica

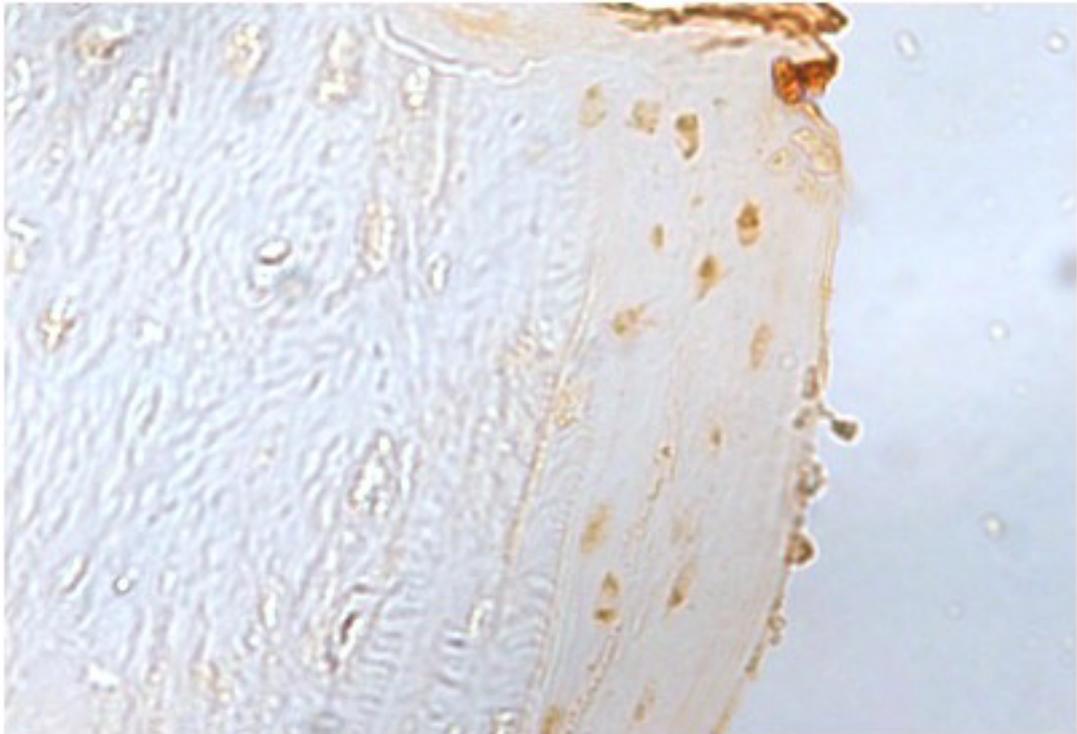


Fig 3. rhPDGF-BB+rhBMP-2/ACS anti-Osteoprotegerina, intervalo 4 semanas de cicatrización. Técnica Inmunohistoquímica

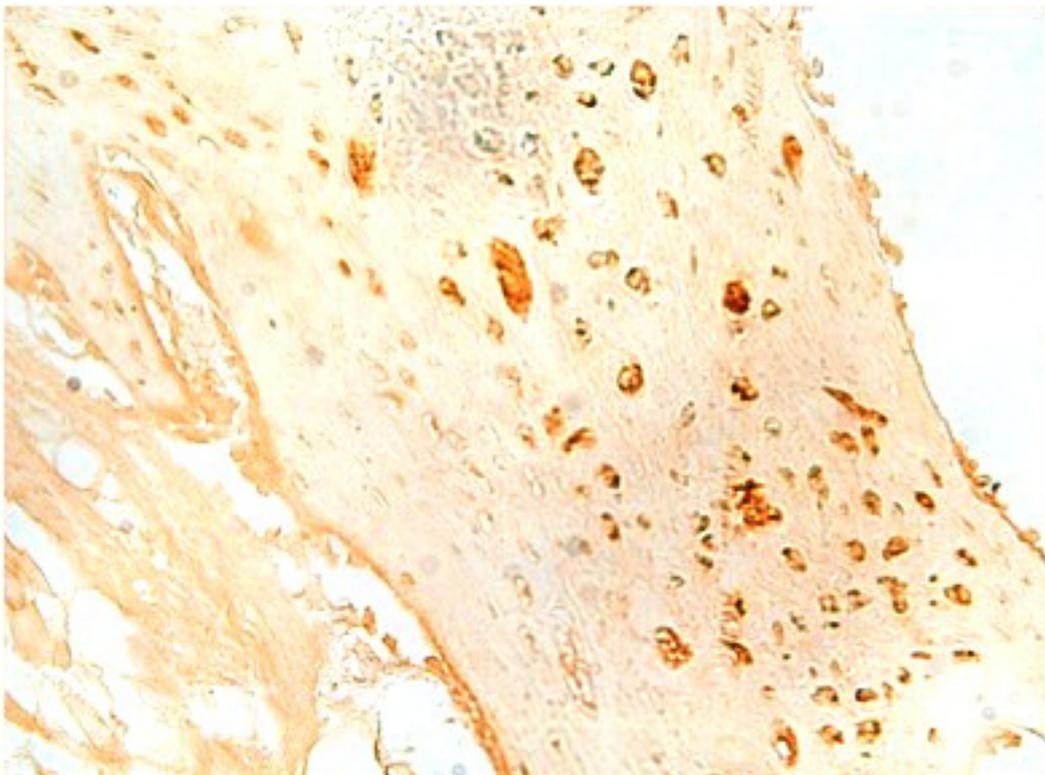
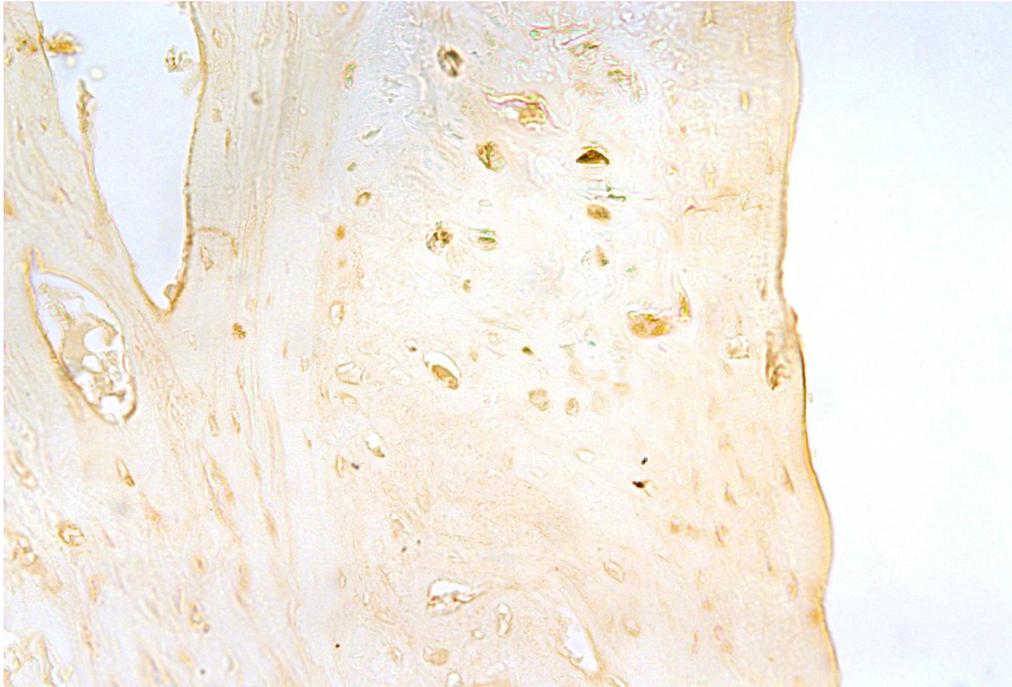


Fig 4. rhBMP-2/ACS anti-Osteopontina, intervalo 4 semanas de cicatrización. Técnica Inmunohistoquímica



En las fotomicrografías de la tinción de Hematoxilina y Eosina en ninguno de los grupos se observó un cierre completo del defecto, sin embargo hubieron diferencias en cuanto al remodelado óseo entre el grupo control y los diferentes tratamientos aplicados. (Fig 5, 6, 7 y 8)

Fig 5 Grupo Control anti-Osteoprotegerina, intervalo 4 semanas de cicatrización 10X. Tinción Hematoxilina de Harris

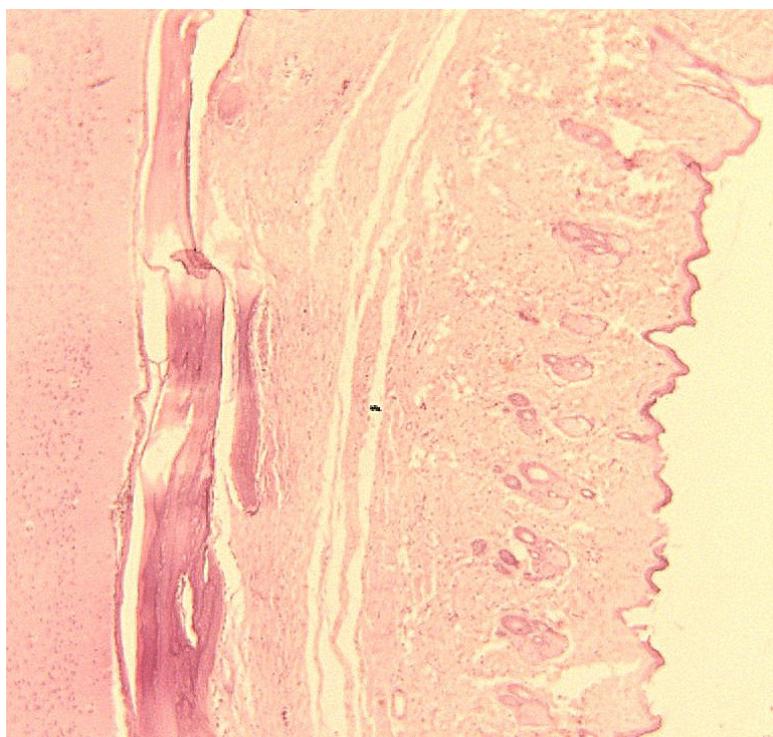


Fig 6 rhPDGF-BB/ACS anti-Osteoprotegerina, intervalo 4 semanas de cicatrización 10X.
Tinción Hematoxilina de Harris

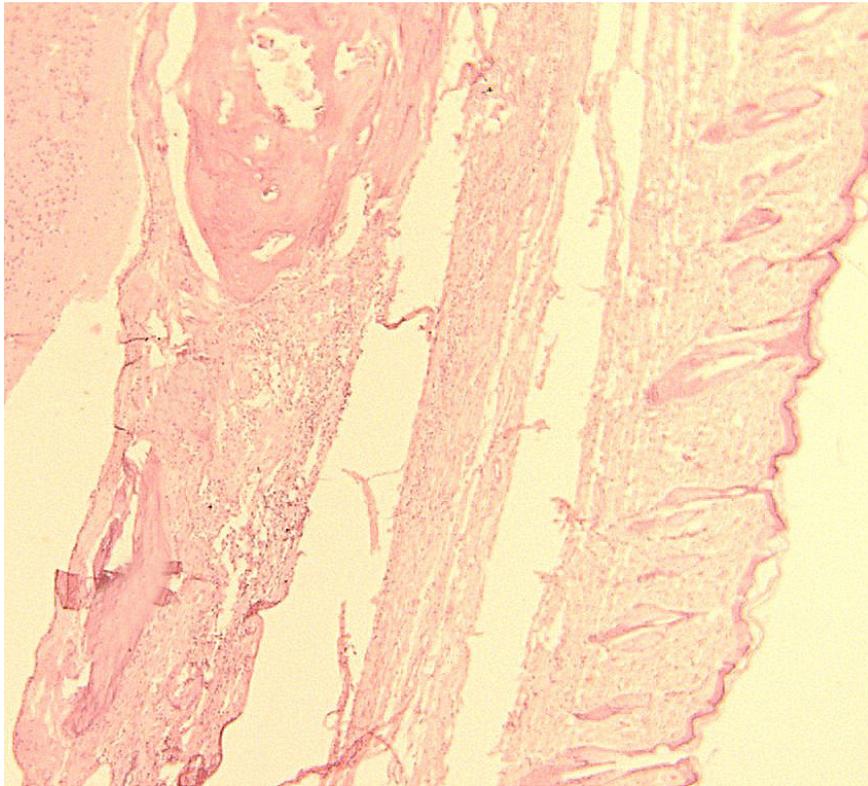


Fig 7. rhBMP-2/ACS anti-Osteoprotegerina, intervalo 4 semanas de cicatrización 10X.
Tinción Hematoxilina de Harris

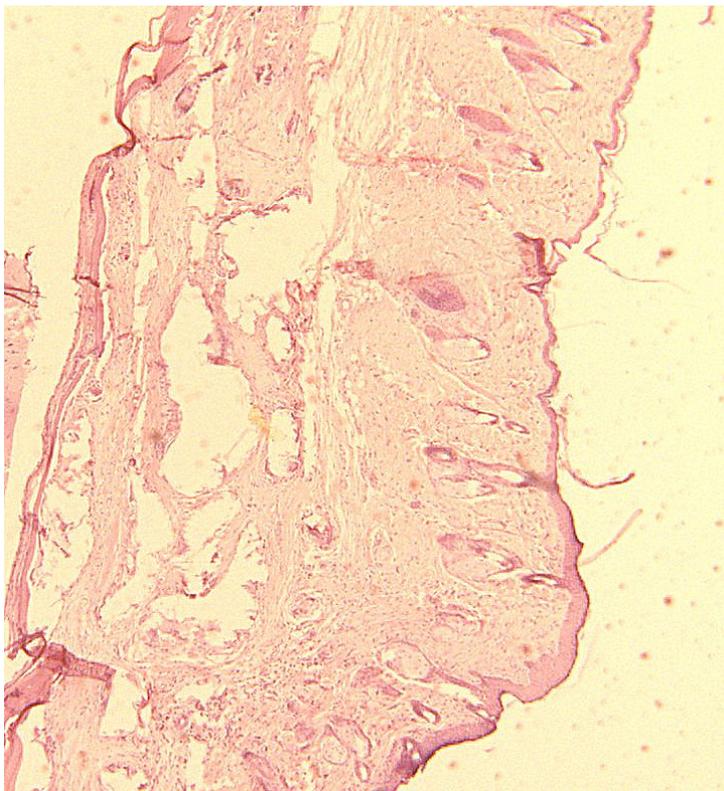


Fig 8. rhPDGF-BB/ACS, intervalo 4 semanas de cicatrización 40X. Flecha señala el límite del tejido óseo sano



En el grupo experimental 3, donde se aplicó la combinación de ambos factores de crecimiento, pudo observarse una mayor actividad celular, así como también la presencia de células osteoclasticas, indicando así un remodelado óseo aumentado en comparación con los otros grupos experimentales (Fig 9, 10, 11, 12 y 14).

Fig 9. rhPDGF-BB+rhBMP-2/ACS anti-Osteopontina, intervalo 4 semanas de cicatrización 10X. Tinción Hematoxilina de Harris

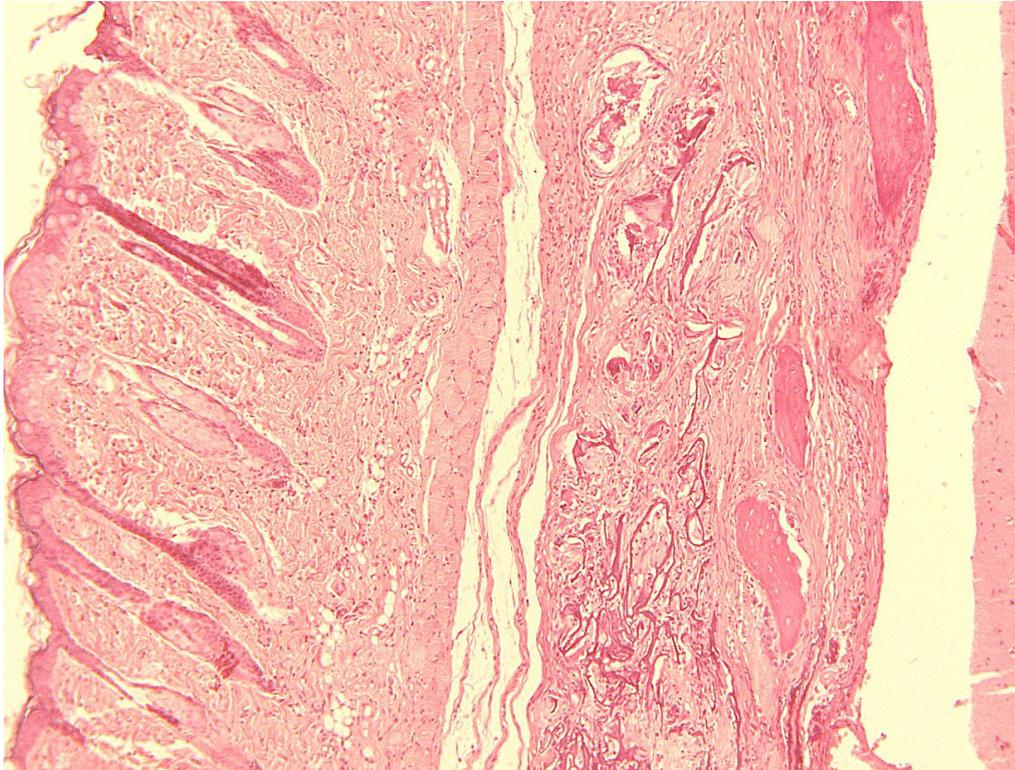


Fig 9 rhPDGF-BB+rhBMP-2/ACS anti-Osteoprotegerina, intervalo 4 semanas de cicatrización 10X. Tinción Hematoxilina de Harris

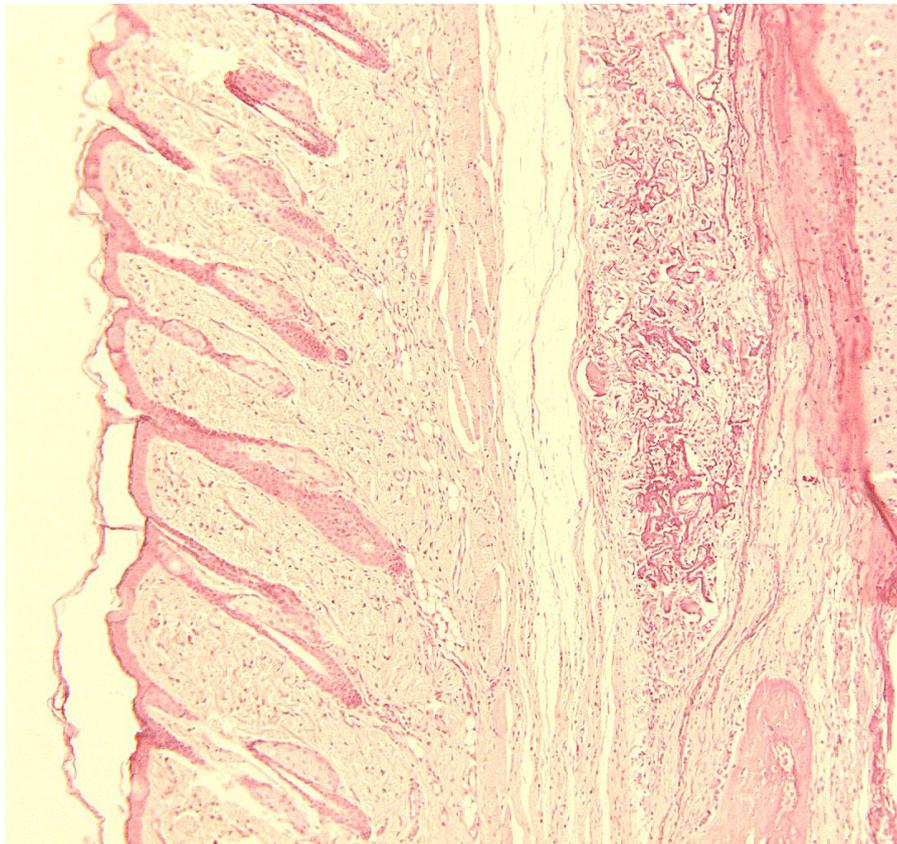


Fig 10. rhPDGF-BB+rhBMP-2/ACS anti-Osteoprotegerina, intervalo 4 semanas de cicatrización 40X. Flecha señala la presencia de osteoclasto activado. Tinción Hematoxilina de Harris.

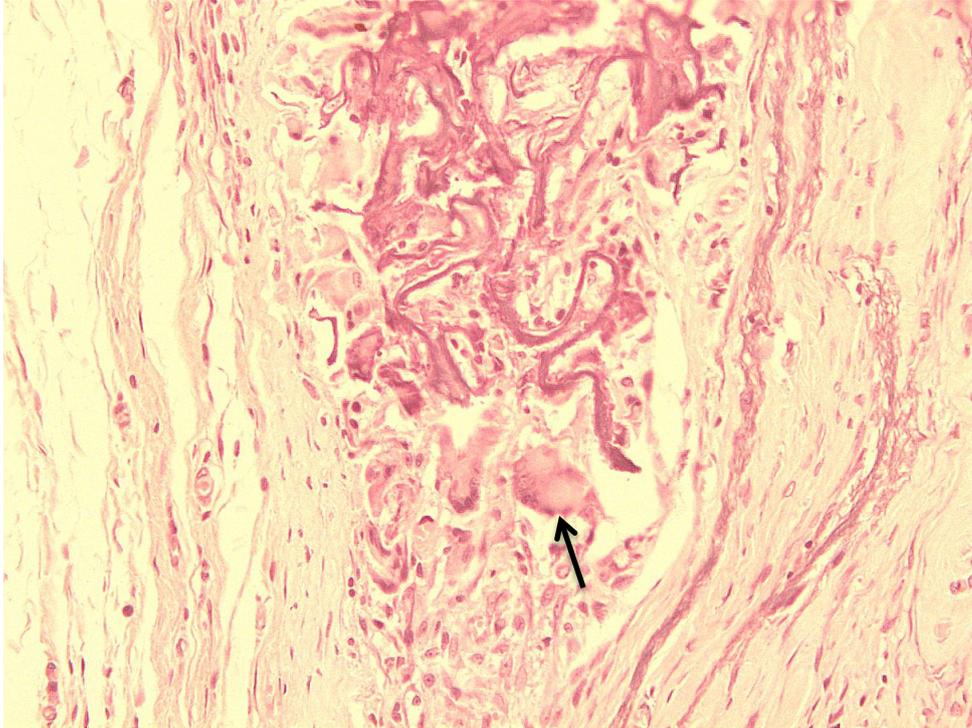


Fig 11. rhPDGF-BB+rhBMP-2/ACS, intervalo 4 semanas de cicatrización 10X. Tricrómico de Masson

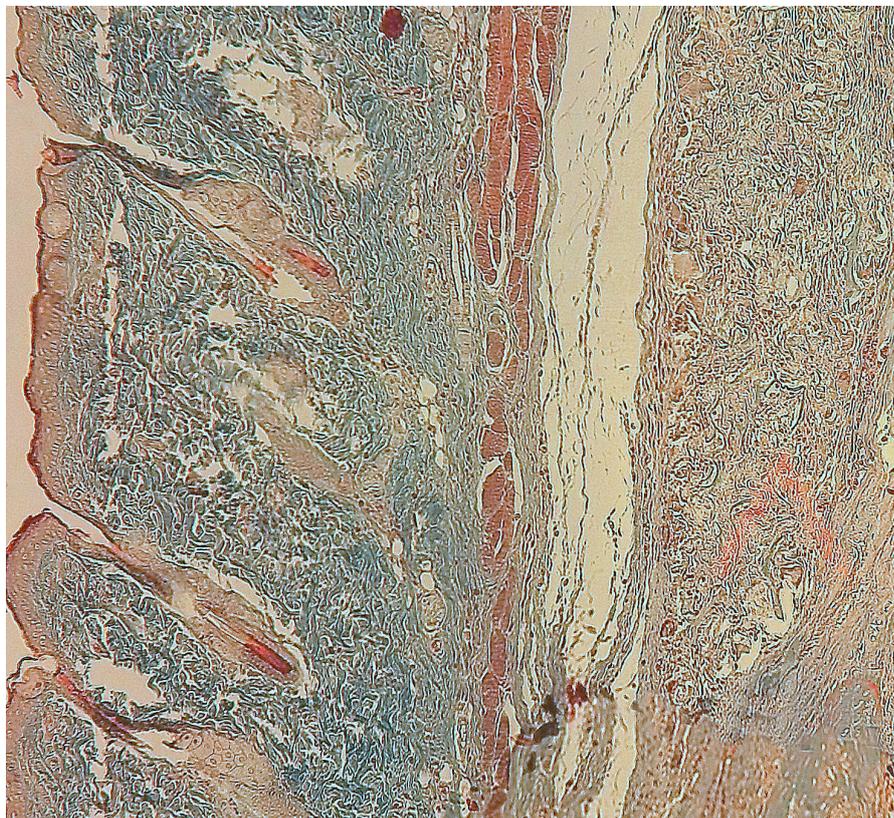


Fig 12. rhPDGF-BB+rhBMP-2/ACS, intervalo 4 semanas de cicatrización 40X. Tricrómico de Masson. Flecha señala la presencia de células activadas (osteoclastos)



6.1 Estadística Descriptiva

En el grupo Control, al cual no se le colocó ningún tratamiento, se obtuvo un promedio de 2.46 células positivas a Osteoprotegerina, con una desviación estándar de 1.40. El valor mínimo fue de 0 y el máximo de 7 célula positiva a Osteopontina. En el grupo Experimental 1 el cual consistió en la aplicación de de 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml rhPDGFBB/ACS y se obtuvo una media de 6.0 células positivas con una desviación estándar de 2.09. Experimental 2, al cual se le aplicó o 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhBMP-2/ACS, se obtuvo un promedio de 7.29 células positivas con una desviación estándar de 2.18. El valor mínimo fue de 1 y el máximo de 13 células positivas a Osteopontina. Por ultimo, el grupo Experimental 3, el cual consistió en la aplicación de 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhPDGF-BB/ACS + 30 μ l a una concentración de 100 μ g/ml de rhBMP-2/ACS obtuvo un promedio de 17.46 células que inmunoreactivas a Osteopontina con una desviación estándar de 4.88. El valor mínimo fue de 8 y el máximo de 33.(Ver Tabla 1 y Gráfico 1)

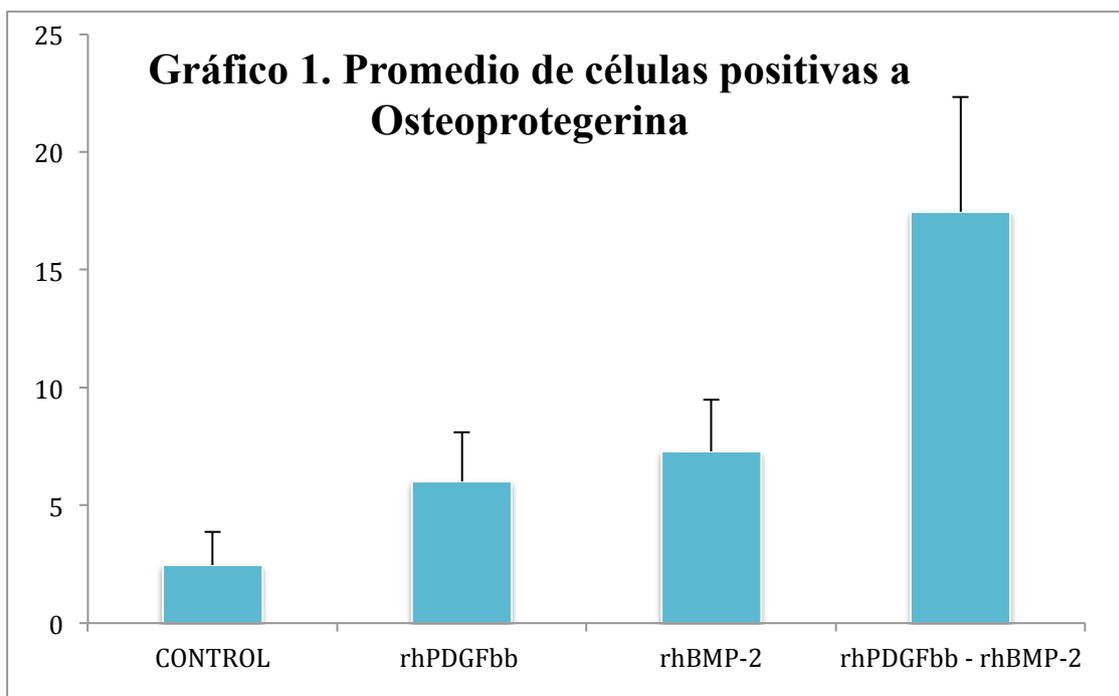


Tabla I Estadística descriptiva de la Osteoprotegerina según el grupo de estudio				
	CONTROL	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3
Media	2.466666667	6.008333333	7.291666667	17.46666667
Error típico	0.128519546	0.191374153	0.199577928	0.445634495
Mediana	3	6	8	18
Moda	3	7	8	21
Desviación estándar	1.407861083	2.096398806	2.186266659	4.881681301
Varianza de la muestra	1.982072829	4.394887955	4.779761905	23.83081232
Curtosis	-0.178843218	-0.787748922	1.164673078	0.186762943
Coficiente de asimetría	-0.013502122	-0.128069343	-0.586904931	0.330387781
Rango	7	10	12	25
Mínimo	0	1	1	8
Máximo	7	11	13	33
Suma	296	721	875	2096
Cuenta	120	120	120	120
Nivel de confianza(95.0%)	0.254481536	0.378939936	0.39518423	0.882400808

En cuanto a la estadística descriptiva de la Osteopontina, en el grupo Control, se obtuvo una media de 0 células inmunoreactivas a este factor de mineralización. En cuanto al grupo Experimental 1, el promedio de células positivas fue de 4.19, con una desviación estándar de 1.44, un valor mínimo de 0 y un valor máximo de 10. El grupo Experimental 2 obtuvo una media de 4.12 células inmunoreactivas con una desviación estándar de 1.69 y un valor mínimo de 0 y un valor máximo de 11. Por último, los valores obtenidos en el grupo Experimental 3, fue un promedio de 10.06 células positivas a Osteoprotegerina, la desviación estándar fue de 4.43, el valor mínimo fue de 1 y el máximo de 24. (Ver Tabla 2 y Gráfico 2).

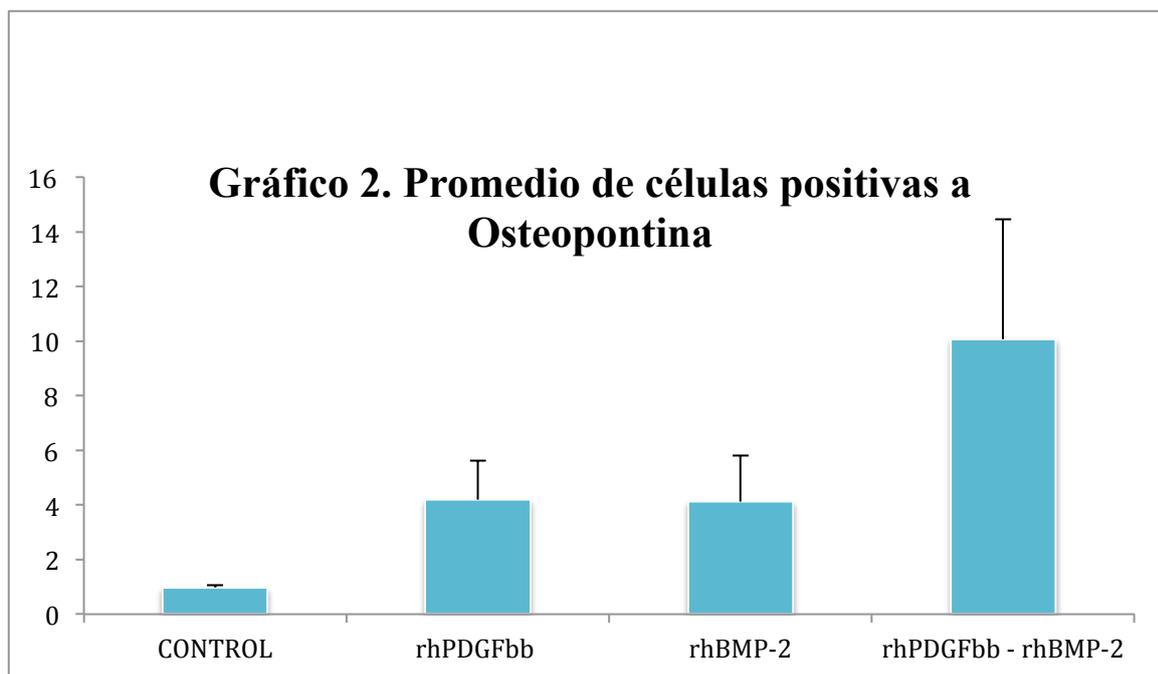


Tabla I Estadística descriptiva de la Osteopontina según el grupo de estudio

	CONTROL	TRAT 1	TRAT 2	TRAT 3
Media	0.9875	4.19375	4.125	10.06875
Error típico	0.076266817	0.193140398	0.212751885	0.429468909
Mediana	1	4	4	8
Moda	0	5	4	6
Desviación estándar	0.096470741	1.443054267	1.691122139	4.432399744
Varianza de la muestra	0.093066038	3.968514151	5.242138365	21.51096698
Curtosis	-0.739907851	-0.655001103	-0.761310986	-0.788072394
Coefficiente de asimetría	0.493369351	0.133757878	0.247664138	0.547172932
Rango	4	10	11	23
Mínimo	0	0	0	1
Máximo	4	10	11	24
Suma	158	671	660	1611
Cuenta	160	160	160	160
Nivel de confianza(95.0%)	0.150626675	0.381451555	0.420184168	0.848199468

6.1 Estadística Inferencial

En cuanto al análisis de varianza de la muestra tanto de Osteoprotegerina como de Osteopontina, si existió diferencia significativa entre grupos, dando como resultado que tanto el grupo experimental 1 y 2 fueron superiores al grupo control, sin embargo entre ambos tratamientos no existió diferencia significativa. No obstante el grupo experimental 3 mostró mayor diferencia en comparación con los demás grupos. El valor de P fue de <0.05 .

7. DISCUSIÓN

La presente investigación tenía por objetivo la evaluación del potencial de regeneración ósea, por medio del crecimiento del osteoide y de osteoinducción ósea mediante la expresión de factores de mineralización del rhBMP-2 y rhPDGF-BB en defectos de tamaño crítico en el cráneo de ratas Sprague- Dawley a las 4 semanas de cicatrización.

Un defecto de tamaño crítico se define como una herida intraósea, la cual no cicatrizará de manera espontánea durante el período de vida de un animal. En las ratas los defectos de tamaño crítico en el cráneo deben ser de 8 mm de diámetro. La válvula craneal puede definirse como la porción del esqueleto que se extiende desde el reborde supraorbital posteriormente hasta la protuberancia occipital externa. Una de las razones por las que se realiza en el cráneo este tipo de defectos, es debido a que el cráneo tiene muchas similitudes con la región maxilofacial. Anatómicamente, el cráneo consiste en dos corticales con regiones de hueso esponjoso similares a la mandíbula. Este modelo animal ha sido ampliamente utilizado en diversas investigaciones (Schmitz y col., 1986, Takagi y col., 1982., Marden y col., 1994, Ahn y col., 2003). Dentro de las ventajas que podemos encontrar al utilizar este modelo animal están:

1. Son animales económicos y por tanto pueden adquirirse varios.
2. Los procedimientos quirúrgicos en el hueso craneal son relativamente fáciles de realizar
3. Se requieren pequeñas cantidades del agente experimental
4. Los agentes particulados o gelatinosos son adecuados para la implantación en este tipo de defectos.
5. Las semejanzas del cráneo con la región maxilofacial
6. La preparación de los tejidos del espécimen es fácil de realizar

Esta investigación consistió en un grupo control y tres grupos experimentales. A los animales del grupo control, únicamente se le realizó el defecto de tamaño crítico con una trefina de 8 mm y no se le colocó ningún agente osteoinductor, que promoviera la regeneración ósea del defecto en cuestión. A las 4 semanas de cicatrización no se observó la presencia de células positivas a ninguno de los factores de mineralización previamente colocados (Osteopontina y Osteoprotegerina), por lo que tampoco hubo regeneración del defecto, esto concuerda con los resultados obtenidos en investigaciones previas (Schmitz y col., 1986), donde se acepta que los defectos de tamaño crítico no cicatrizan por sí solos, a menos que se les coloque algún agente osteoinductor.

En 1982 Urist fue de los primeros en realizar un estudio realizado en el cráneo de ratas, en el cual se corroboró que el cráneo adulto es una fuente limitada de osteoblastos y de nuevo hueso, por lo que los precursores de osteoblastos deben ser reclutados desde el tejido conectivo perivascular para que se complete la regeneración ósea craneal. Consecuentemente, solo puede considerarse el cráneo adulto como prueba válida para cualquier sustituto de injerto óseo, incluyendo las BMP (Takagi y col., 1982).

Los resultados obtenidos en uno de los grupos experimentales en esta investigación, al que se le colocó 30µg de rhBMP-2/ACS concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores. En 1994, Marden y col. demostraron por primera vez que la rhBMP-2 podía restaurar los defectos óseos de tamaño crítico en ratas, además que la osteoregeneración se aceleró al colocar una mayor dosis de rhBMP-2 (Marden y cols., 1994). Así mismo, en 2003 se aceptó que la esponja de colágeno (ACS) podía actuar como un vehículo ideal para promover la osteogénesis y sin la presencia de efectos secundarios y/o complicaciones (Ahn y cols., 2003).

Estudios previos han reportado que la aplicación de PDGF aumenta el volumen de tejido óseo *in vivo*. En la cicatrización de fracturas, el PDGF-BB se observa fuertemente

expresado en los osteoblastos y en los precursores de condrocitos, sugiriendo así, los efectos estimulatorios de este factor de crecimiento en la formación de hueso (Rasulaba y col., 2003). El PDGF es un potente estimulador de división celular en células de origen mesenquimatoso (Bowen-Pope y col., 1985). A diferencia del grupo experimental donde se aplicó rhBMP-2/ACS, el grupo donde se aplicó rhPDGF-BB/ACS obtuvo menos células inmunoreactivas a los factores de mineralización.

Tanto el rhBMP-2 como el rhPDGF-BB tienen diferentes funciones biológicas en la cicatrización de fracturas. En un estudio realizado en mandíbulas de ratas donde combinaron ambos factores de crecimiento, concluyeron que los dos tienen un papel fundamental durante la proliferación y diferenciación de osteoblastos y condrocitos durante la cicatrización de fracturas mandibulares, por ello también son importantes en la estimulación de quimiotaxis celular, en particular el BMP-2 participa en todas las etapas de reparación de fracturas y es importante en la formación de la osificación intramembranosa (Rasubala y col., 2003).

Al analizar el crecimiento del osteoide entre los grupos, también hubieron diferencias entre grupos. En el grupo control no se observaron indicios de regeneración ósea. Entre los tratamientos 1 y 2 los resultados fueron muy similares, aunque no hubo un cierre completo del defecto. En el tratamiento 3, el cual consistió en la combinación de ambos factores de crecimiento, la zona del defecto se identificó una mayor actividad celular, en la cual, los patrones de osificación ósea se observaron más irregulares y de aspecto basófilo intenso, además de la presencia de células osteoblásticas y osteoclasticas, las cuales son parte importante en el proceso de remodelado óseo (Raggatt LJ, 2010).

Al comparar los 3 grupos experimentales, se observaron diferencias significativas entre estos, en cuanto al conteo morfométrico de células inmunoreactivas a los factores de mineralización estudiados en esta investigación, dando como resultado, que la combinación

de ambos factores produjo un mayor número de células inmunoreactivas a comparación de los resultados obtenidos individualmente. En lo referente a los resultados entre ambos factores de mineralización, también se observó cierta diferencia entre estos, hubo un mayor conteo de células inmunoreactivas a Osteoprotegerina en comparación con Osteopontina.

Por lo anterior se aceptó la hipótesis de la presente investigación, la cual fue que debido al potencial osteoinductivo de los factores de crecimiento rhPDGF-BB y BMP-2, la combinación de ambos aceleró el proceso de regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en el cráneo de ratas Sprague-Dawley

8. CONCLUSIONES

La presente investigación demostró que la combinación de rhPDGF-BB y rhBMP-2 aumentó el potencial de regeneración ósea en los defectos de tamaño crítico a 4 semanas de cicatrización

Aunque tanto la Osteopontina y la Osteoprotegerina estuvieron presentes, el que se expresó aún más fue la Osteoprotegerina, demostrando así que el grupo con mayor potencial de osteoinducción fue el de la combinación rhPDGF-BB+rhBMP-2/ACS.

Si bien no hubo un cierre completo del defecto, se pudo observar una mayor actividad celular en el tratamiento de rhPDGF-BB+rhBMP-2/ACS, con la presencia tanto de células osteoblásticas como osteoclasticas, dando como resultado la presencia de remodelado óseo en la zona del defecto.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahn SH, Kim CS, Suk HJ, Lee YJ, Choi SH, Chai JK, Kim CK, Han SB, Cho KS.; Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 with carriers in rat calvarial defects.; *J Periodontol.* 2003 Jun;74(6):787-97.
2. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C; Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine; *Genes Dev*, 2008;22:1276–1312.
3. Becerik S, Sonmez S, Sen BH, Deliloglu-Gurhan I, Evrenosoglu E.; Effect of human platelet-derived growth factor-BB on attachment of periodontal ligament cells on root surfaces; *Saudi Med J*, 2009 Jan;30(1):60-6.
4. Bernard AW.; Cicatrización y reparación de defectos óseos; *Clínicas odontológicas de Norteamérica.* 1991; 35(3): 463-470.
5. Bonewald LF, Mundy GR; Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling; *Clin Orthop*, 1990: 261–276.
6. Bonucci E; The ultrastructure of the osteocyte. In: Bonucci E, Motta PM, ed. Ultrastructure of skeletal tissues: bone and cartilage in health and disease. *Boston: Kluwer Academic Publishers*, 1990: 223–252.
7. Bourque WT, Gross M, Hall BK; Expression of four growth factors during fracture repair; *Int J Dev Biol*, 1993;37(4):573-9.
8. Bowen-Pope, D.F Seifert. R.A. And Ross, R. (1985). The platelet-derived growth factor receptor. In Control of Animal Cell Proliferation (Eds. A.L. Boynton and H.L.Leffert). Academic Press. Toronto, pp. 281-312.
9. Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, Triplett G, Lazaro E, Lilly LC, Alder M, Nummikoski P.; A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation; *Int J Periodontics Restorative Dent*, 1997; 17:11–15.
10. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E.; Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton; *Endocr Rev*, 2003;24(2):218-35.
11. Canalis. E., McCarthy, T.L. and Centrella M; Effects of platelet-derived growth on bone formation in vitro; *J. Cell. Physiol.* 1989;140 (3): 530-537.
12. Canalis. E., McCarthy, T.L. and Centrella M; Effects of platelet-derived growth on bone formation in vitro; *J. Cell. Physiol.* 1989; 140 (3): 530-537.
13. Centrella M, McCarthy TL, Kusmik WF, Canalis E; Relative binding and biochemical effects of heterodimeric and homodimeric isoforms of platelet-derived growth factor in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone; *J Cell Physiol*, 1991;147(3):420-6.

14. Chatterjea A, Meijer G, van Blitterswijk C, de Boer J.; Clinical Application of Human Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering; *Stem Cells Int*, 2010 11;2010:215625.
15. Cheifetz S, Li IW, McCulloch CA, Sampath K, Sodek J; Influence of osteogenic protein-1 (OP-1; BMP-7) and transforming growth factor-beta 1 on bone formation in vitro; *Connect Tissue Res* 1996; 35: 71–78.
16. Chellaiah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Schoenberger J, Rifas L, Rittling SR, Denhardt DT, Hruska KA; Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell*, 2003;14:173-89.
17. Chen D, Zhao M, Mundy GR; Bone morphogenetic proteins; *Growth Factors*. 2004 ;22(4):233-41).
18. Chung UI, Lanske B, Lee K, Li E, Kronenberg H; The parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95: 13030–13035.
19. Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM.; Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density.; *Nat Genet*. 2001;27(1):84-8.
20. Dolin N, Olson KE; Bone mineral content and physical activity; *Acta Ortho Scand*; 1974; 45; 170-176.
21. Dragoo, M.R. & Sullivan H.C.; A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. IL External root resorption; *J. Periodontol*. 1973; 44, 614-625.
22. Ducy P, Schinke T, Karsenty G; The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000; 289:1501-1504.
23. Ellegaard, B., Karring, T., Davies, R. & Loe, H.; New attachment after treatment of intrabony defects in monkeys. *J. Periodontol*, 1974 45, 368-377.
24. Ellegaard, B., Karring, T., Listgarten, M. & Loe, H.; New attachment after treatment of interradicular lesions. *J. Periodontol*, 1973 44, 209-217.
25. Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derynck R; Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling; *Mol Biol Cell*, 1998: 9: 1903–1918.
26. Francis J. Hughes, Wendy Turner, Georgios Belibasakis & Gianluca Martuscelli; Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation; *Periodontology* 2000, Vol. 41, 2006, 48–72)

27. Frolik CA, Ellis LF, Williams DC; Isolation and characterization of insulin-like growth factor-II from human bone; *Biochem Biophys Res Comm*, 1988; 151: 1011-1018.
28. Frost H. M.; *Intermediary Organization of the Skeleton*; vol II CRC Press, Boca Raton,FL, pp 1-331, 1986.
29. Frost H.M; *Intermediary organization of the skeleton*; Volume 1 pp. 1-365; Boca Raton; CRC Press 1986.
30. Frost, H.M; *Dynamics of bone remodelling; Bone Biodynamics*; pp. 315-333, 1964.
31. Froum, S.J., Kushnek, L., Scopp,LW.&Stahl, S.S; Healing responses of human intraosseous lesions following the use of debridement, grafting and citric acid root treatment. I. Clinical and histologic observations six months postsurgery; *J. Periodontol*, 1983; 54, 67-76.
32. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E.; Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein; *Clin Orthop*, 1993; 293: 317-326.
33. Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996; 19: 23S–37S.
34. Gitelman SE, Kirk M, Ye JQ, Filvaroff EH, Kahn AJ, Derynck R.; Vgr-1/BMP-6 induces osteoblastic differentiation of pluripotential mesenchymal cells; *Cell Growth Differ*, 1995;6(7):827-36.
35. Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S,Riggs BL; The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology*, 2000; 141: 4768-4776.
36. Groeneveld EH, van den Bergh JP, Holzmann P, ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH; Histomorphometrical analysis of bone formed in human maxillary sinus floor elevations grafted with OP-1 device, demineralized bone matrix or autogenous bone; *Clin Oral Implants Res*, 1999;10:499–509.
37. Grzesik, W. J. y Robey, P.G. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res*, 1994; 9: 487- 496.
38. Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M; Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose; *J Biol Chem*, 1986; 261: 12665-12674.

39. Hayden JM, Mohan S, Baylink DJ; The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 1995; 17: 93S–98S.
40. Hill PA; Bone remodelling; *Br J Orthod*, 1998 ;25(2):101-7.
41. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla; Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines; *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 250:776–781.
42. Holtrop ME. Light and electron microscopic structure of bone-forming cells. In: Hall BK, ed. *Bone: the osteoblast and osteocyte*. Vol. 1. Caldwell: *Telford Press*, 1990: 1–39.
43. Huang YH, Polimeni G, Qahash M, Wikesjö UM.; Bone morphogenetic proteins and osseointegration: current knowledge – future possibilities; *Periodontol* 2000, 2008;47:206-23.
44. Hughes FJ, Mc Culloch CAG; Quantification of chemotactic response of quiescent and proliferating fibroblasts in Boyden chambers by computer-assisted image analysis; *J. Histochem. Cytochem*, 1991: 39: 243–246.
45. Hyun SJ, Han DK, Choi SH, Chai JK, Cho KS, Kim CK, Kim CS.; Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects.; *J Periodontol*. 2005 Oct;76(10):1667-74.
46. Inoda H, Yamamoto G, Hattori T; Histological investigation of osteoinductive properties of rh-BMP2 in a rat calvarial bone defect model; *J Craniomaxillofac Surg*, 2004 Dec;32(6):365-9.
47. Jeong GK, Sandhu HS, Farmer J.; Bone morphogenic proteins: applications in spinal surgery; *HSS J*, 2005;1(1):110-7.
48. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*. 1998; 13: 793-802.
49. Karsenty G; The genetic transformation of bone biology. *Gene Dev*, 1999, 13: 3037–3051.
50. Katagiri T, Takahashi N.; Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation; *Oral Dis*, 2002 8, 147–159.
51. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hugues FJ; Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects; *J. Dent. Res*, 1997; 76:1460-1470.

52. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S.; alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways.; *J Bone Miner Res*, 2004;19(9):1411-9.
53. Lee YM, Nam SH, Seol YJ, Kim TI, Lee SJ, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Han SB, Choi SM; Enhanced bone augmentation by controlled release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from bioabsorbable membranes; *J. Periodontol*, 2003;74:865–72.
54. Lieberman, Jay R., Friedlaender Gary E; *Cap 2 Bone regeneration and repair: biology and clinical applications*; Ed Jay R. Lieberman, Gary E. Friedlaender; 1ra. edición Ed. Humana Press Inc; pag 21-44, 2005.
55. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC; Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs; *J Periodontol*. 1991; 62(11):710-6.
56. Mahipal Singh, Cerrone R. Foster, Suman Dalal, and Krishna Singh; Osteopontin: role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI; *J Mol Cell Cardiol*, 2010 ; 48(3): 538–543.
57. Marden LJ, Hollinger JO, Chaudhari A, Turek T, Schaub RG, Ron E; Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats; *J Biomed Mater Res*. 1994 Oct;28(10):1127-38.
58. Marotti G, Cane V, Palazzini S, Palumbo C; Structure function relationships in the osteocyte. *Ital J Miner Electrolyte Metab*, 1990; 4: 93–106.
59. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR; Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone graft; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1998;85(6):638-46.
60. McKee MD, Nanci A; Ultrastructural, cytochemical and immunocytochemical studies on bone and its interfaces. *Cells Mater*, 1993; 3: 219–243.
61. Midgett R. Shaye R. Fruge J.F; The effect of altered bone metabolism on orthodontic tooth movement; *Am J. Orthod*, 1981: 80: 256-262.
62. Misch CE, Dietsch F.; Bone-grafting materials in implant dentistry; *Implant. Dent*, 1993; 2: 158-167.
63. Mitlak BH, Finkelman RD, Hill EL, Li J, Martin B, Smith T, D'Andrea M, Antoniades HN, Lynch SE; The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton; *J Bone Miner Res*. 1996;11(2):238-47.

64. Mohan S, Linkhart T, Farley J, Baylink D; Bone-derived factors active on bone cells; *Calcif Tissue Int*, 1984; 36: S139– S145.
65. Mundlos S, Olsen BR; Heritable diseases of the skeleton. Part II: molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J* 1997, 11: 227–233.
66. Murakami T, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N., Motoyoshi K, Akatsu T; Transforming growth factor- β 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells; *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 252:747–752.
67. Newman M., Takei H, Klokkevold P; Cap. 77, Aumento óseo localizado y desarrollo del sitio del implante en Carranza Periodontología Clínica; Editores Newman, takei, Klokkevold, Carranza, 10ª Edición, Mc Graw Hill, 1135, 2010.
68. Nielsen, I.M., Ellegaard, B. & Karring, T; Kielbone" in healing interradicular lesions in monkeys. *J. Periodontal Res*, 1980, 15, 328-337.
69. O'Brien EA, Williams JH, Marshall MJ.; Osteoprotegerin is produced when prostaglandin synthesis is inhibited causing osteoclasts to detach from the surface of mouse parietal bone and attach to the endocranial membrane; *Bone*. 2001 ;28(2):208-14.
70. Parfitt A.M; *The physiological and clinical significance of bone histomorphometry: Techniques and interpretation*; pp. 143-223. Boca Raton. CRC Press: 1983.
71. Parfitt AM. Bone-forming cells in clinical conditions. In: Hall BK, ed. Bone: the osteoblast and osteocyte. Vol. 1. *Caldwell: The Telford Press*, 1990: 351–429.
72. Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ, Cho MI.; Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor; *J Periodontol*. 1995 Jun;66(6):462-77.
73. Park YJ, Lee YM, Park SN, Sheen SY, Chung CP, Lee SJ; Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration; *Biomaterials*. 2000 Jan;21(2):153-9.
74. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR; Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284:143–147.

75. Puzas JE, Ishibe M; Osteoblast/osteoclast coupling In: Rifkin BR, Gay CV, ed. Biology and physiology of the osteoclast. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992: 337–356.
76. Qing Wang, Xiao Chao Wei, Tian Hui Zhu, Ming Zhang, Rong Shen, Lianping Xing, Regis J. O’Keefe, and Di Chen; Bone Morphogenetic Protein 2 Activates Smad6 Gene Transcription through Bone-specific Transcription Factor Runx2; *J Biol Chem*, 2007 6;282(14):10742-8.
77. Raggatt LJ, Partridge NC.; Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling; *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25103-8.
78. Ramirez F, Rifkin DB; Cell signalling events: a view from the matrix *Matrix Biol*, 2003; 22:101-107.
79. Reddi AH; Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials; *Tissue Eng*, 2000;6:351–9.
80. Reddi AH; Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins; *Curr Opin Cell Biol*,1992;4(5):850-5.
81. Roberts W.E, Turley P.K, Breznick N. Fielder PJ; Implants; Bone physiology and metabolism; *J. Calif. Dent. Assoc.* 1987; 15:54-61.
82. Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, Van der Pluijm G, Mintz KP, Young MF; Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res Suppl* 1993, 2: S483–S487.
83. Robling AG, Castillo AB, Turner CH.; Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling; *Annu Rev Biomed Eng*, 2006;8:455-98.
84. Roodman GD; Advances in bone biology: the osteoclast; *Endocr Rev*, 1996 Aug;17(4):308-32.
85. Rosen, V. and Thies, R. S.; The BMP proteins in bone formation and repair; *Trends Genet*, 1992; 8, 97-102
86. Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF; Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys; *J Periodontal Res*. 1992; 27(4 Pt 1):285-90
87. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM.; Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease.; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007 ;27(11):2302-9.

88. Scherft JP, Groot CG; The electron microscopic structure of the osteoblast. In: Bonucci E, Motta PM, ed. Ultrastructure of skeletal tissues: bone and cartilage in health and disease. *Boston: Kluwer Academic Publishers*, 1990: 209–222.
89. Schönherr E, Hausser HJ; Extracellular matrix and cytokines: a functional unit; *Devel Immunol*, 2000 7: 89-101.
90. Shin JH, Kim KH, Kim SH, Koo KT, Kim TI, Seol YJ, Ku Y, Rhyu IC, Chung CP, Lee YM; x vivo bone morphogenetic protein-2 gene delivery using gingival fibroblasts promotes bone regeneration in rats; *J Clin Periodontol*; 2010 Mar;37(3):305-11.
91. Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjö UM.; Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration; *J Periodontol*. 1995;66(2):131-8.
92. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ.; Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density; *Cell* 1997; 89: 309-319.
93. Standal T, Borset M, Sundan A; Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling; *Exp Oncol.*, 2004;26(3):179-84.
94. Taipale J, Keski-Oja J; Growth factors in the extracellular matrix; *FASEB J*, 1997 11: 51-59.
95. Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y.; Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells.; *J Biol Chem*. 1998 Oct 16;273(42):27091-6.
96. Terranova VP, Wikesjö UM; Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. A review; *J Periodontol*. 1987;58:371–80.
97. Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA; Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional histologic, and biomechanical evaluation; *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1991; 117:1101-1112.

98. Turner CH, Pavalko FM; Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci* 1998; 3: 346–355.
99. Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong HH, Greenspan DS, Trackman PC.; Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures; *J Biol Chem*. 2001 22;276(25):22537-43.
100. Wozney John M.; Bone Morphogenetic Proteins; Progress in Growth Factor Research Volume 1, Issue 4, 1989, Pages 267-280.
101. Yamaguchi A, Komori T, Suda T; Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 2000, 21: 393–411.
102. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG; Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop* 1992, 281: 275–294.