

## Injertos óseos - Nueva alternativa. Fase I. Extracción de proteínas morfogenéticas parcialmente purificadas de hueso bovino.

Jairo A Rivera<sup>1</sup>, MVZ, PhD; Carlos H Riaño<sup>1</sup>, MVZ, Esp; Paula A Monsalve<sup>2</sup>, MV; Adriana Osorio<sup>2</sup>, MV.

<sup>1</sup>Consultorio Veterinario, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo Biomateriales, Universidad de Antioquia

<sup>2</sup>Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, A.A. 1226.

Medellín, Colombia.

jairoriveraposada@yahoo.com\*

(Recibido: 19 de septiembre, 2002; aceptado: 1 abril, 2003)

### *Resumen*

*El propósito de esta investigación fue extraer a partir de hueso bovino y mediante procedimientos químicos, Proteínas Morfogenéticas Óseas (PMO), parcialmente purificadas que posean características osteoinductivas, de alta calidad, baja antigenicidad y alta biodisponibilidad, para ser utilizadas como material de injerto óseo. El procedimiento se llevó a cabo mediante cinco etapas básicas así: Molienda del material; extracción de lípidos; desmineralización; extracción del colágeno; obtención de la fracción proteica. Para verificar la efectividad de la desmineralización y demás procesos, se procedió como sigue: Método de Soxhlet; espectrometría de Absorción Atómica de Calcio; tinción de picrofucsina de Van Gieson; electroforesis en Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato Sódico. Se obtuvo un material con proteínas de peso molecular aparente en el rango de 18 a 120 KDa, principalmente en las bandas correspondientes a 18, 24, 34, 68, 72, 90, 120 KDa, mediante electroforesis en Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE) el cual fue liofilizado y almacenado en ampollas de vidrio selladas al vacío para su conservación y uso posterior.*

**Palabras clave:** biomateriales, factores de crecimiento, osteoregeneración.

### **Introducción**

Los injertos biológicos son materiales colocados en el organismo para colaborar o asumir temporal o permanentemente la función de una parte del cuerpo. La respuesta del organismo a los injertos, así como la remodelación de los materiales de injerto, está influenciada por muchos factores, tales como el material del injerto (con sus características de porosidad, rigidez, forma y tipo) y su microentorno (calidad del sitio en el huésped y ambiente mecánico local) (3, 9,21).

El hueso tiene potencial regenerativo, sin embargo, en cirugía ortopédica se requiere algunas veces de injertos o sustitutos del hueso que ayuden en la consolidación,

reparación de deformidades óseas, congénitas, postraumáticas, excisión quirúrgica o después de la eliminación de procesos tumorales (1, 5,6).

El hueso autólogo es el material de elección para los injertos, sin embargo, su uso es problemático debido a la morbilidad del sitio donador, cantidades insuficientes de material y resorción incontrolada. Se han buscado alternativas a este tipo de materiales, que incluyen agentes sintéticos como el fosfato de calcio o la Hidroxiapatita (HA), y naturales como el hueso desmineralizado, el colágeno y la HA derivada de corales marinos. Estos materiales son osteoconductivos, es decir, actúan como un esqueleto estructural que dirige los capilares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras del huésped desde el hueso circundante y tejido blando hacia el interior del injerto (9, 14,16).

---

\*Dirección para solicitar el documento

Los materiales naturales pueden ser injertos de hueso y sus derivados. Los derivados de hueso incluyen colágeno, componentes no colágenos y los componentes inorgánicos del hueso.

Los componentes no colágenos del hueso poseen la clave para la regeneración ósea, son osteoinductivos, contribuyen a la remodelación del hueso por promoción de la producción ósea desde células en el sitio del defecto. Este es un proceso en el cual las células mesenquimales indiferenciadas se agrupan y se diferencian posteriormente en cartílago o en células formadoras de hueso (osteoblastos). Esta diferenciación es inducida y modulada por un complejo de factores proteicos asociados con el hueso del huésped y la matriz ósea trasplantada. Algunas de estas proteínas han sido identificadas y son conocidas como Proteínas Morfogenéticas Óseas (PMO), osteogenina y otros factores de crecimiento (6, 7,21). (véase Figura 1).

El primer reporte de osteoinducción usando hueso desmineralizado, se ha atribuido a Senn (4, 5,27) quien en 1889 intentó reparar defectos óseos en pacientes con osteomielitis crónica, usando implantes de hueso tratados con ácido clorhídrico con el fin de promover la antisepsia. Notó rápida sustitución del tejido desmineralizado y osificación de las áreas defectuosas. La inducción de hueso fue mostrada claramente en 1965 por Urist (15, 18,21) quien observó que después del tratamiento del hueso con ácido clorhídrico 0.6 N y la implantación subcutánea o intramuscular de este producto desmineralizado, las células mesenquimales perivasculares eran inducidas constantemente a diferenciarse en condroblastos y finalmente en hueso. Estudios posteriores de purificación de estas proteínas inductoras, derivadas de hueso bovino resultaron en la identificación de muchos miembros de las PMO (al menos unas 15 moléculas). Los miembros de la familia PMO juegan un papel crítico en la regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis de varios tipos celulares, incluyendo osteoblastos, condroblastos, células neuronales y epiteliales. Inducen la formación de hueso, cartílago y tejidos conectivos asociados con el esqueleto (5, 21,23).

Las PMO son el mayor componente activo en el hueso desmineralizado. Son péptidos producidos localmente por los osteoblastos, regulados por mecanismos endocrinos. Se encuentran distribuidas a lo largo de las fibras colágenas del hueso normal, en células periosteales y mesenquimales de la médula ósea, mediando los eventos celulares, pegándose a

los receptores superficiales de las células blancas. Esta interacción dispara una serie de eventos celulares que pueden influenciar los diferentes procesos de proliferación y diferenciación celular, síntesis de proteínas y producción de matriz extracelular (22, 23,33) (véase Figura 2).

Las PMO son reguladores pleiotrópicos que actúan en toda la cascada de eventos que forman el nuevo hueso: quimiotaxis de células progenitoras, mitosis y diferenciación de condrocitos y osteoblastos. También estimulan la matriz extracelular uniéndose a sus componentes con remodelación y resorción ósea. Inician su actividad en los estadios tempranos de cascada. Los condroblastos y osteoblastos pueden ser formados ya sea de células determinadas, las cuales no necesitan una señal para comenzar a formar el hueso y las no determinadas que son células inducibles (19, 22,25).

Las PMO estimulan la actividad y formación de hueso en sitios ectópicos u ortópticos, teniendo actividad condrogénica u osteogénica; la actividad de inducción de hueso no es dependiente de especies, obteniendo un proceso de formación ósea (inducción de osificación endocondral o intramembranosa) indistinguible entre PMO recombinantes y aquel logrado por extractos derivados de hueso (2,12,15).

La ausencia de propiedades osteoinductivas y osteoconductoras en los sustitutos actuales de injertos óseos ha promovido la investigación para desarrollar nuevos productos, que puedan superar los sustitutos óseos en la actualidad.

La utilización de Factores de Crecimiento, entre ellos de PMO obtenidas a partir de hueso bovino, en combinación con un cargador osteoconductor (HA de porosidad inducida) es uno de tales productos; ya que estos materiales complementarían sus características actuando sinérgicamente, reduciendo el tiempo de consolidación y reconstrucción de defectos óseos.

El concepto de reemplazo óseo utilizando osteoinducción es atractivo ya que el hueso inducido resultante es enteramente autólogo y por lo tanto no habría morbilidad del sitio donador ni limitaciones por disponibilidad, o cantidad del material de injerto utilizado (8).

La finalidad de este estudio es extraer proteínas morfogenéticas parcialmente purificadas de hueso

bovino, que posteriormente puedan ser utilizadas como material osteoinductor en injertos óseos en combinación con otros biomateriales (fase II, fase III).

### **Materiales y métodos**

#### *Preparación del hueso*

Se utilizaron 3 kg de hueso fresco de bovino (hueso cortical), obtenido de un matadero, refrigerado en hielo seco (-40°C). Se eliminó el tejido blando y médula ósea, se lavó 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.

Los huesos se trituraron hasta obtener partículas de aproximadamente 1mm (Molino de cuchillas Thomas-Willey módulo 4, Philadelphia, Pennsylvania), 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.

#### *Extracción de lípidos*

Se tomaron 1678 g 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 y verificar que no hubiera grasa residual.

El Cloroformo y el Metanol son solventes orgánicos que disuelven los lípidos separando las moléculas y ocupando los espacios sobrantes. El Metanol convierte las grasas naturales presentes en ésteres y glicerol, siendo estos solubles en agua y el Cloroformo desalcoholiza la suspensión. Con este procedimiento se controla la alineación de las moléculas en las membranas celulares, conservando así las características de la molécula sin cambios estructurales a nivel celular.

#### *Descalcificación*

Se utilizó 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 prueba de Absorción Atómica (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 mas adecuada para este procedimiento la de 0.5 M.

#### *Solubilización del colágeno*

A la muestra se le adicionó una solución de Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>) 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 5 g para la prueba de Van Gieson.

El (CaCl<sub>2</sub>) es una sal que convierte el colágeno óseo en gelatina permitiendo una rápida separación y solubilización de las PMO, 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 mas purificado, disminuyéndose la posibilidad de reacciones adversas al momento de la implantación.

#### *Extracción de PMO*

De la gelatina de matriz ósea insoluble se tomaron 504 g para extraer las PMO solubles del colágeno. Se utilizaron 4 litros de una solución de urea 6M / CaCl<sub>2</sub> 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) contra 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 (11, 28, 29).

La solución de urea 6 M/CaCl<sub>2</sub> 0.5 M extrae las PMO solubles del colágeno, lo que también se logra por medio de la utilización de Guanidina-HCl. En estas soluciones se han utilizado diferentes inhibidores de proteasas como son N-etilmaleimida (NEM), ácido

iodoacetico (IAA), fenil-metil-sulfonil-fluoride (PMSF) en diferentes concentraciones según el procedimiento a seguir (10,13, 24).

Las proteínas no colágenas son extraídas del hueso desmineralizado bajo condiciones disociativas, poniendo en contacto el hueso con un líquido acuoso de extracción que separa las uniones iónicas y solubiliza las proteínas no colágenas. Esta extracción se realiza bajo condiciones que inhiben la digestión o desnaturalización de las proteínas a extraer.

Hay que destacar la importancia de los diferentes lavados con agua deionizada a 4°C, ya que así se disminuye la posibilidad de la desnaturalización de las proteínas, se eliminan los residuos de los reactivos, se remueven detritos celulares y partículas sólidas, además estabiliza el pH de la solución.

El procedimiento de filtración es de vital importancia para la recuperación de las proteínas ya que por su bajo peso molecular pueden perderse fácilmente.

Para la obtención de un producto de buena calidad bacteriológica fue necesario trabajar con estrictas condiciones de esterilidad (cámara de bioseguridad), después de la desmineralización con el ácido, ya que con este procedimiento se elimina contaminación bacteriológica y viral y se obtiene un producto prácticamente estéril.

#### BCA (Acido Bicinconínico)

La prueba BCA de PIERCE<sup>®</sup> es una formulación detergente compatible, basada en el ácido bicinconínico (BCA) para la detección colorimétrica y cuantificación total de proteínas.

#### Electroforésis en gel de poliacrilamida- dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Se utilizaron 30 ug/mL de proteína que fue aplicada a un gel de 12.6% con un 3% de Stacking gel a 25 mA. Los geles fueron teñidos con 0.25% de Azul brillante de Coomassie y Plata. Para la determinación de los pesos moleculares aparentes se utilizaron los siguientes estándares: miosina, 217.000; B-galactosidasa, 126.000; albúmina sérica bovina, 73.000; anhidrasa carbónica, 43.500; inhibidor de tripsina de soya, 31.600; lisozima, 18.000; aprotinina, 7.500.

#### Liofilización

Es la desecación efectuada a baja temperatura y con vacío, de un producto previamente congelado, logrando la sublimación del hielo bajo vacío.

*Pruebas de verificación del procedimiento químico llevado a cabo para la extracción de PMO de hueso bovino*

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. Electroforésis en gel de poliacrilamida- dodecil sulfato sódico. (véase Figura 3).

### Resultados

De las muestras de hueso analizados se obtuvieron los siguientes resultados:

Contenido de grasas 0.556%, contenido de calcio 12.69%. A la tinción se observó material eosinófilo (sin confirmar la presencia de fibras colágenas). Prueba BCA (Cantidad de proteínas presentes en la muestra): 1867ug/mL. La determinación de los pesos moleculares se hizo por electroforesis en gel de Poliacrilamida-dodecil sulfato sódico. Se observaron proteínas con rangos de peso molecular entre 18 y 120 KDa, (véase Figura 4).

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con los hallazgos encontrados en otras investigaciones (2, 17 ,26), indicando que el material obtenido contiene proteínas con pesos moleculares aparentes entre 18 a 120 KDa. (véase Tabla 1).

**Tabla 1.** Pesos moleculares encontrados en otras investigaciones

| Autores                            | Año  | Especie | Peso Molecular       |
|------------------------------------|------|---------|----------------------|
| Ashby Eric, <i>et al</i> (2)       | 1996 | Bovino  | 20-40 KDa            |
| Elizabeth Wang, <i>et al</i> (32)  | 1988 | Bovino  | 16,18,30 KDa         |
| Hideki Mizutani, <i>et al</i> (17) | 1982 | Bovino  | 12,15,17,34 y 65 KDa |
| Marshall Urist, <i>et al</i> (26)  | 1982 | Bovino  | 12-68 KDa            |
| Viljanen, <i>et al</i> (31)        | 1996 | Rata    | 15-55 Kda            |
| Oksanen, <i>et al</i> (17)         | 1998 | Canino  | 4-120 KDa            |

*Procesamiento del material.* Luego de la molienda se adicionó una solución de Azida de Sodio NaN<sub>3</sub> (5mmoles/L) al agua deionizada y destilada para facilitar la limpieza de sangre de los canales vasculares.

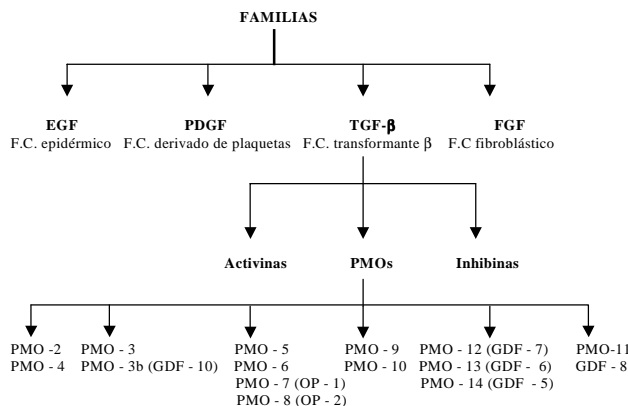
*Extracción de lípidos (determinación de grasas) mediante el método de Soxhlet:* Se obtuvo un porcentaje de grasas del 0.556 (5mg/100g) La cantidad de lípidos presentes en la muestra es muy baja, por lo tanto, no se afectó el procedimiento químico de obtención de PMO.

Los lípidos interfieren en la estimación precisa de la concentración de proteínas en la prueba de BCA. Por lo tanto, aunque la cantidad de lípidos presentes es baja, pudo haber interferido en la cantidad de proteína encontrada. Se obtuvieron 1867ug/mL de proteínas lo que podría indicar que la cantidad de proteínas por mL puede ser aún mayor.

Para llevar a cabo una extracción de lípidos completa se sugiere realizar al menos un cambio de la solución cloroformo-metanol.

*Determinación de Calcio (Absorción Atómica del Calcio)*

Se determinó que la muestra enviada tenía un 12% de calcio (12g/100g). La descalcificación al no ser completa, afecta la cantidad de proteína extraída en el procedimiento químico, impidiendo su liberación.



**Figura 1.** Diagrama de las Proteínas Morfogenéticas Óseas identificadas. Cada familia consiste de múltiples factores de crecimiento relacionados genéticamente, que son producidos por diferentes tipos celulares. Las PMO han sido agrupadas según la homología de su secuencia de aminoácidos.

*Solubilización del Colágeno*

La presencia de cantidades mínimas de material eosinófilo, muy fragmentado, sin estructura a la tinción de Van Gieson no produce reacciones adversas al ser implantado, debido a que la actividad biológica de una proteína depende de su secuencia específica de aminoácidos y de su forma molecular, cualquier cambio

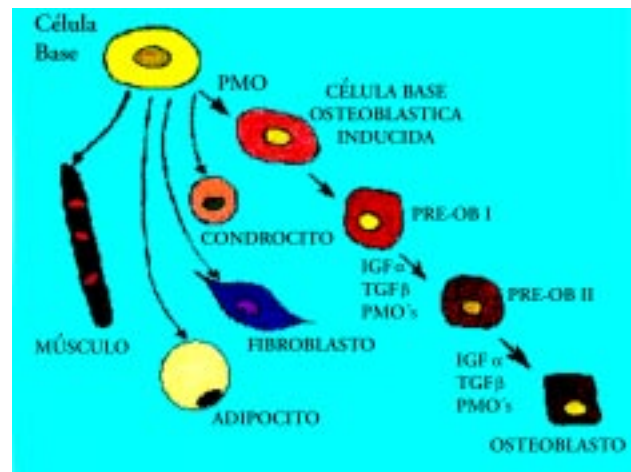
fundamental en la estructura secundaria de la proteína como desenrollamiento, pérdida de puentes de hidrógeno, pérdida de secuencia específica de aminoácidos y pérdida de forma molecular destruye la forma característica y con ello la actividad biológica específica.

*Electroforésis*

Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con los hallazgos encontrados en otras investigaciones, indicando que el material obtenido contiene proteínas con pesos moleculares aparentes entre 18 a 120 KDa. (véase Tabla 1).

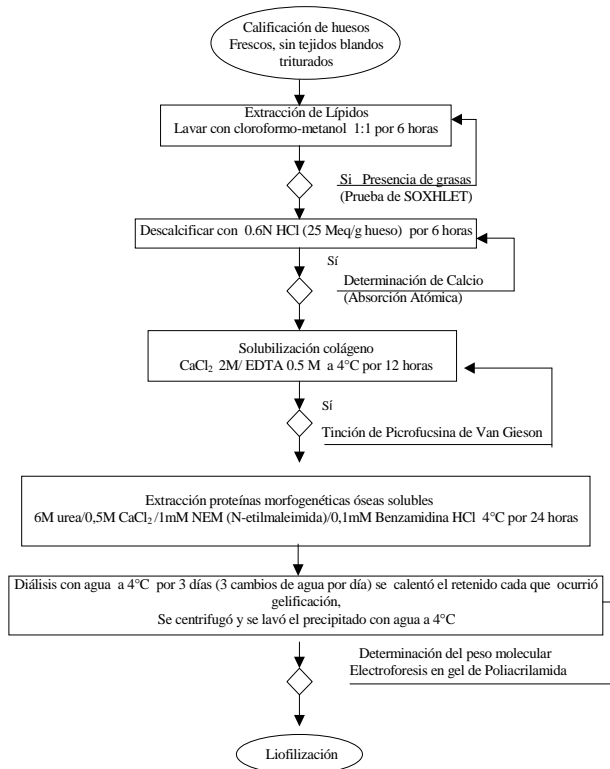
**Discusión**

Hay que tener en cuenta que en la extracción de proteínas morfogenéticas parcialmente purificadas de hueso bovino fase I, no se identificaron las proteínas como tal; solo se obtuvo una estimación de sus pesos moleculares, ya que los equipos y materiales para lograr una completa identificación de las PMO son de costos muy elevados y de difícil consecución (obtención de anticuerpos específicos que reaccionen ante las proteínas obtenidas y equipo específico para su purificación y caracterización total).



**Figura 2.** Diferenciación celular mediada por PMOs. Las PMOs actúan en las células base indiferenciadas, así como en estados posteriores en la diferenciación de osteoblastos.

Se sugiere para optimizar el procedimiento químico de desmineralización del hueso, realizar por lo menos un cambio de la solución HCL 0.6N y así evitar que el reactivo se sature y disminuya la velocidad y el grado de reacción.



**Figura 3.** Diagrama de flujo del procedimiento de obtención de PMOs

Se pierde un importante porcentaje del peso inicial del hueso (relación 60:1), pasando de 3 kg a 50 g al momento de la liofilización, pero con 2 mg es suficiente para inducir la formación de hueso lamelar en un periodo de 8 semanas.

La bibliografía no indica rendimientos obtenidos en cada uno de los pasos, solo cita la cantidad de hueso utilizado en la molienda y en algunos casos la fracción final de PMO obtenida.

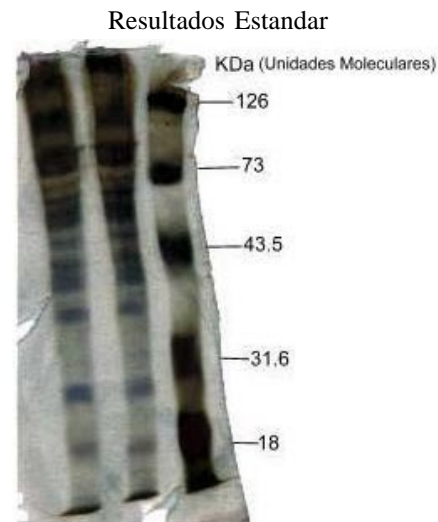
Las PMO se pueden obtener tanto por métodos enzimáticos como no enzimáticos y por medio de técnicas recombinantes; a pesar de los avances en las técnicas recombinantes para la producción de PMO, los mejores resultados clínicos, de hecho, se han obtenido con PMO de procedencia humana o animal, además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

Se han reportado diferentes métodos de obtención de PMO parcialmente purificadas, en los cuales se utilizan diferentes reactivos para la extracción de las proteínas, se cambia el orden de algunos de los pasos

y se aumenta o se disminuye el número de estos según el grado de purificación que se requiera (11, 26,30).

Los resultados sugieren que la actividad osteoinductiva está asociada con las proteínas de pesos moleculares aproximados entre 12 KDa y 50 KDa.

Los injertos que contienen PMO pueden reemplazar en un futuro cercano a los autoinjertos empleados convencionalmente en la reparación de grandes defectos óseos, lesiones osteocondrales, no- unión de fracturas y fusiones espinales, por aceleración del proceso de formación de nuevo hueso. Las implicaciones de estas investigaciones son inmensas, ya que el cirujano puede usar un implante de tipo estructural (andamio) como la HA y con la ayuda de las PMO promover el crecimiento de nuevo hueso en un tiempo considerablemente reducido (1). La HA está proporcionando sus propiedades osteoconductoras, mientras que las PMO están proporcionando las propiedades osteoinductivas. El éxito de su aplicación dependerá de la producción de suficientes cantidades de PMO y el desarrollo de un sistema de liberación conveniente para este factor osteoinductivo.



**Figura 4 .** Patrones obtenidos en la electroforesis en Gel de Poliacrilamida PAGE - SDS

Se deben realizar otros procedimientos químicos para la extracción de PMO parcialmente purificadas, así como de otras especies animales, con el fin de optimizar el procedimiento para la utilización de estas en el campo de la Medicina Veterinaria y Humana.

La comprobación de las características osteoinductivas de las PMO, así como su grado de pureza y rendimiento, solo es posible al momento del

análisis histológico posterior a su implantación en un modelo experimental lapino, ya que según estudios previos 1 mg de proteína parcialmente purificada cuando es implantada en un defecto óseo, causa la producción de aproximadamente 1 g de hueso (17,27,31).

Se esperan los resultados del ensayo *in vivo*, el que se realizará implantando subcutáneamente las

proteínas en un modelo experimental lapino (fase II), verificando sus posibles características osteoinductivas, las que favorecen tanto el tiempo de formación ósea como la calidad y cantidad de hueso neoformado y posteriormente puedan ser mezcladas con HA porosa para comprobar su acción sinérgica en la consolidación y reconstrucción de defectos óseos (fase III).

### Agradecimientos.

Doctor Luis Javier Arroyave, Decano de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad de Antioquia. Dr. Silvio Ayala Laboratorio de Bromatología, Universidad de Antioquia. Laboratorio Clínico Colombiano (LABCO) Dr. José Fernando Vásquez, Dr. Luis Rúa, Medellín, Colombia. CIB Dra. Angela Restrepo, Dra Mirtha Arango Laboratorio de Inmunología Dr. Juan Alvaro López LEA Dra. Diana Betancur GIEM Dr. Carlos López y Dr. Didier Ruiz.

### Summary

#### *Osseous graft - New alternative. Phase I.*

#### *Extraction of partially purified bone morphogenetic proteins from bovine bone.*

*The purpose of this research was to extract from bovine bone and through physical and chemical procedures, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) partially purified, with high-quality osteoinduction characteristics, low antigenicity and high bioavailability. These proteins will be utilized as bone graft material. The procedure was performed through five basic steps: Milling the bovine bone, lipid extraction, demineralization, collagen extraction, obtention of the protein fraction. These steps were verified respectively through the following analysis: The Soxhlet method, Atomic Absorption for Calcium determination, Van Gieson Picrofucsin Stain., Polyacrilamide Gel-Electrophoresis-Sodium-Duodecyl-Sulphate (PAGE-SDS). BMPs partially purified were obtained through Polyacrilamide Gel-Electrophoresis-Sodium-Duodecyl-Sulphate (PAGE-SDS., with molecular weights between 18 - 120 Kda, mainly bands at 18, 24, 34, 68, 72, 90 and 120 KDa, This material was lyophilized, packed and stored in a vacuum sealed narrow-neck bottle for posterior use.*

*Key words: Biomaterials, Growth Factors, Osteoregeneration.*

### Referencias

1. Aaboe M, Pinholt E.M, Hjorting-Hansen E. Healing of experimentally created defects, a review. Br J Oral Maxillofacial Surg, 1995; 33 : 312-318.
2. Ashby E, Rudkin G, Ishida K, Millert T. Evaluation of a novel osteogenic factor, bone cell stimulating substance, in a rabbit cranial defect model. Plastic and Reconstructive Surg. 1996; 98, 3: 420- 26.
3. Breitbart, A S, Staffenberg D, Thorne C, Glat P, Cunningham N, *et al.* Tricalcium phosphate and osteogenin: A bioactive onlay bone graft substitute. Plastic and Reconstructive Surg. 1995;96, 3: 699 - 707.
4. Concannon, M, Boschert M, Fitzpatrick L, Croll G, Puckett C. The use of demineralized bone powder in an onlay graft model. Plastic and Reconstructive Surg. 1995; 95, 6: 1085 – 91.
5. Concannon, M, Boschert M, Puckett C . Bone induction using demineralized bone in the rabbit femur: a long term study. Plastic and Reconstructive Surg. 1997; 99, 7: 1983 - 88.
6. Cornell, C, and Lane J, Newest factors in fracture healing. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1992; 277: 297 – 311.
7. Demers, C and Hamdy R. Bone morphogenetic proteins. Science & Medicine. 1999; 6, 6: 8 - 17.

8. Fitch, R. Bone Autografts and allografts in dogs. Compendium on Continuing Education. 1997, 19, 5: 558-73.
9. Gougalofft, R, Bone Grafting, 1998; [http://www.oral-implant.com/bone\\_grafting.htm](http://www.oral-implant.com/bone_grafting.htm)
10. Jeffers; Steven R. Bone graft material for osseous defects and method of making same. United States Patent, N° 4394370, July 9, 1983.
11. Kawai T, Maedo H, Nagao T, Jinde T, Koie M, *et al.* New bone formation by BMP-ceramics composites. Department of Dental Material Science, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University Japan. Poster DW 0423. 1995.
12. Khouri R, Brown D, Koudsi B, Deune G, Gilula L, *et al.* Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. Plastic and Reconstructive Surg. 1996; 98, 1: 103 - 9.
13. Largade P. Isolated osteogenic factor, United States Patent N° 5169837, December 8, 1992.
14. Lemhman Daniel, y Rougraff Bruce, Recent advances in bone grafting, <http://www.medlib.iupui.edu/brc/recadv.htm>
15. Linkhart T. Growth factors for bone growth and repairs: IGF, TGF- $\beta$  and BMP. Bone. 1998 ; 19, 6: 591 – 603.
16. Mizutani H, and Marshall U, The nature of bone morphogenetic protein (BMP) fractions derived from bovine bone matrix gelatin. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1982; 171: 213 – 23.
17. Oksanen J, Marttinen A, Paatsama S, Lindholm T. Extraction and characterization of native canine bone morphogenetic protein (cBMP) qualified with osteoinductivity. Acta Vet. Scand 1998; 39 (2): 165-71.
18. Ono I, Gunji H, Suda K, Kaneko F, Murata M, *et al.* Bone induction of hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein and covered with periosteum. Plastic and Reconstructive Surg. 1995; 95, 7: 1265 – 71.
19. Position Paper: The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. Journal of Periodontology. 1996; 67, 5: 545 – 50.
20. Rabie A B M., Lie KenJie RkP., Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bone matrix. Int. J. Oral Maxillofacial Surg, 1996; 25: 311-18.
21. Ripamonti U, and Duncas N, Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. Plastic and Reconstructive Surg, 1998; 101, 1: 227-35.
22. Rudkin G and Miller T, Growth factors in surgery, special topic. Plastic and Reconstructive Surg. 1996, 97, 2: 469 – 73.
23. Sakou T, Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. Bone. 1998; 22, 6: 591 – 603.
24. Seyedin Saeid. Partially purified osteogenic factor and process for preparing same from demineralized bone. United States Patent, N° 4434094, February 28, 1984.
25. Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T. Ectopic bone induction in porous hydroxyapatite combined with collagen and Bone Morphogenetic Protein. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1988, 234: 51 – 53.
26. Urist M, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. Proc Natl Acad USA. 1979; 76, 4: 1828 – 32.
27. Urist, M, Lietze A, Nizutani H, Takagi K, Triffitt J, *et al.* A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1982; 162: 219 – 32.
28. Urist Marshall, Bone morphogenetic agents. United States Patent N° 4795804, January 3, 1989.
29. Urist Marshall, Bone morphogenetic protein composition. United States Patent, N° 4619989, October 28, 1986.
30. Urist Marshall, Bone Morphogenetic protein process. United States Patent, N° 4294753, October 13, 1981.
31. Viljanen V V, Lindholm TS, Lindholm TC. Comparison of native xenogenic and allogenic bone morphogenetic proteins in the sheep skull defect assay Model. Ann Chir Gynaecol. 1997; 86 (3): 255-9.
32. Wang A E, Rosen V, Cordes P, Hewick M, Kriz M, *et al.* Purification and characterization of other distinct bone- inducing factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; Vol 85: 9484- 88.
33. Wozney J, The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in The Embryo and Adult. Eur. J. Oral Sci. 1998 ; 106 (suppl1): 160 – 66.