

Aislamiento de un extracto de BMP y estudio anatomopatológico del fenómeno de inducción ósea tras su implante en defectos óseos

J.A. DE PEDRO¹ M.A. CUADRADO², F.G. DE LUCAS¹, JA. ASENJO³, V. FURIO³,
F. MARCO¹, R. VALOR² y L. LOPEZ-DURAN¹.

*Servicios de (1) Traumatología, (2) Análisis clínicos y (3) Anatomía Patológica.
Hospital Universitario San Carlos. Universidad Complutense. Madrid.*

Resumen.—El objetivo del presente trabajo fue determinar el potencial osteogénico de la proteína morfogenética ósea (BMP) en la reparación de grandes defectos diafisarios. Además, se investiga la acción coadyuvante de la fibronectina (FN). La BMP fue extraída a partir de hueso cortical bovino. Se utilizaron un total de 108 ratas Sprague Dawley. En cada animal, se reseco un segmento de diáfisis femoral de 1.5 cm, siendo inmovilizado el defecto óseo con una aguja en omega. Se rellenó el defecto implantando 25 mg de BMP con o sin 0.5 mg de FN en una cápsula de gelatina (36 animales en ambos grupos). Los resultados se compararon con los obtenidos en otro grupo (36 animales) en el que sólo se implantó FN que sirvió como grupo control. El proceso de reparación se evaluó mediante métodos histológicos y ultraestructurales. La aparición del fenómeno de inducción ósea con reconstrucción del defecto óseo fue mayor en el grupo con implante de BMP más FN (23 animales, 64%) que en el grupo en el que sólo se implantó BMP (20 animales, 56%). Ningún animal del grupo control manifestaba signos de inducción ósea.

Palabras clave: Osteoinducción. BMP. Fibronectina.

PURIFICATION OF BMP AND HISTOLOGICAL STUDY OF BONE INDUCTION IN BONE DEFECTS

Summary.—The aim of the present work was to evaluate the osteogenic potential of Bone Morphogenetic Protein (BMP) for reparation of large segmental bone defects. In addition, the coadjuvant effect of fibronectin (FN) was investigated. BMP was partially purified from bovine cortical bone. A total of 108 Sprague Dawley rats were used in the experiment. Diaphyseal segments of the femur (1.5 cm) were removed in each animal, maintaining the bone defect with a wire. A gelatine capsula containing 25 mg of BMP without or with 0.5 mg of FN, were implanted into the bone defect (36 animal in each group). Results were compared to those obtained in a control group (36 animals) in which FN alone was implanted. The bone repair process was assessed by histologic and ultrastructural methods. Bone induction with reconstruction of the defect was found more of ten in the group with both BMP and FN implanted (23 animals, 64%) than in the group with BMP implant alone (20 animals, 56%). Animals of the control group showed no bone induction. The results suggest that BMP augments the capacity of the host bed to successfully regenerate large segmental bone defects. FN seems to increase bone induction. This protein might stabilize BMP locally improving contact between BMP and the surrounding cells.

Key Words: Osteoinduction. BMP. Fibronectina.

INTRODUCCIÓN

El estudio del fenómeno de inducción ósea tuvo seis orígenes en 1889 cuando Senn implantó huesos de vacuno desmineralizados en pacientes afectos de osteomielitis y en perros con defectos craneales, informando de un inequívoco

Correspondencia:

Dr.D. JOSE A. DE PEDRO MORO
Servicio de Traumatología. Planta 5ª Sur.
Hospital Universitario San Carlos
Ciudad Universitaria
28040 Madrid.

aumento de la reparación ósea (1). A partir de este momento surgieron publicaciones con observaciones muy positivas como las de Deaver (2), así como publicaciones mostrando auténticos fracasos como las de Bier (3). Debido a estos últimos resultados desalentadores, se abandonó durante más de medio siglo el uso de matriz ósea desmineralizada en la reparación de defectos óseos.

La primera demostración inequívoca de formación ósea matriz-inducida fué llevada a cabo por Urist en 1965 (4), mediante el implante intramuscular de matriz ósea desmineralizada en ratas. Pero aún existía un gran interrogante ¿Qué componente de la matriz ósea desvitalizada y desmineralizada era el que producía el estímulo para que acontezca el fenómeno de inducción ósea. Urist a partir de ese momento ha dirigido todas sus investigaciones hacia la búsqueda y caracterización de dicho componente, dándole el nombre de BMP (bone morphogenetic protein o proteína morfogenética ósea) (5,6,7,8,9,10).

La BMP define un conjunto de proteínas aisladas de la matriz ósea que induce la disgregación, migración y reagregación celular así como la diferenciación de células mesenquimales en células óseas (6,11,12).

Desde el punto de vista clínico, la característica más importante de la BMP es que estimula el crecimiento y regeneración ósea (13,14). Este punto es de importancia crucial en aquellos casos en los que existen defectos óseos amplios causados bien por infección, tumores o traumatismos. Estos defectos óseos son relativamente comunes en la clínica diaria y representan un gran reto en el campo de la cirugía reconstructiva (13,15). La BMP aplicada en tales defectos podría estimular la regeneración ósea y, además, lesiones que fracasan en curar de una forma espontánea (pseudoartrosis), podrían ser capaces de regenerarse completamente gracias a la acción de esta proteína (16).

Por otra parte, la fibronectina (FN) se trata de una proteína que actúa a modo de unión de las células entre sí, pudiendo actuar de modo favorable en la migración, proliferación y diferenciación celular en el proceso de inducción ósea (17,18).

Los objetivos perseguidos al realizar este trabajo han sido:

1. Estudiar el fenómeno de inducción ósea producido exclusivamente por la acción de la BMP sobre las células mesenquimales del hueso en un modelo experimental de ratas con grandes defectos diafisarios femorales.

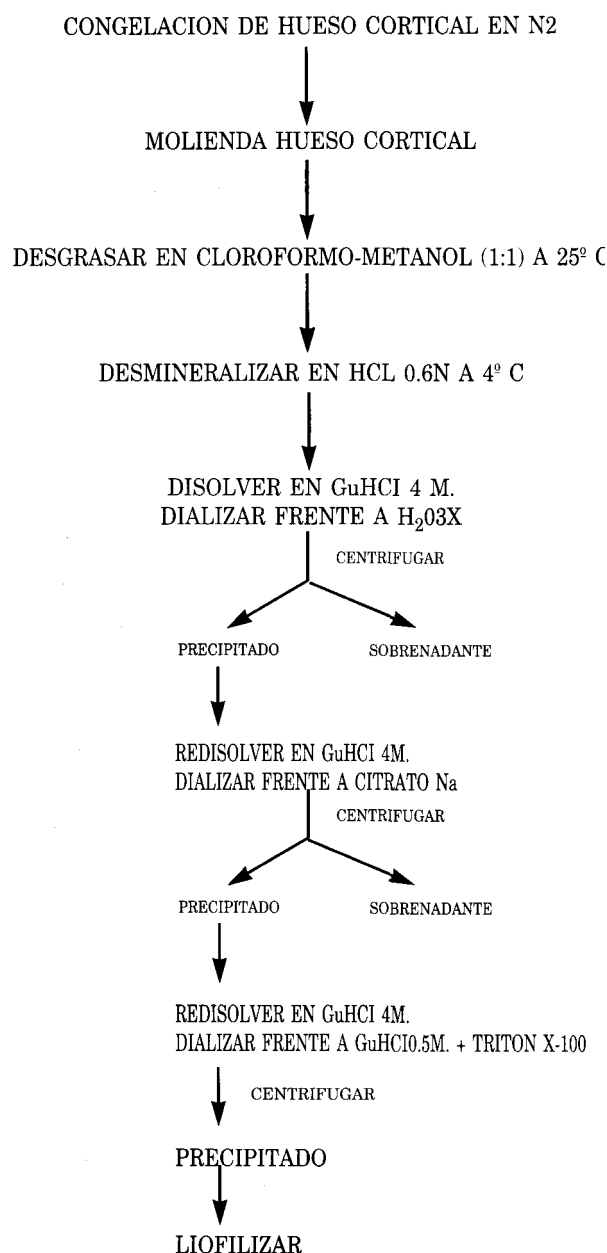
2. Valorar la acción coadyuvante de la fibronectina en dicho proceso de reparación ósea inducida por BMP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Técnica bioquímica de aislamiento de extracto de BMP/iNCP

El material del que partimos fue el hueso cortical diafisario de terneras de 1 año de edad. El proceso bioquímico de extracción de la BMP se llevó a cabo en las primeras 12 horas tras la muerte del animal, siguiendo el esquema que se recoge en la tabla I.

TABLA I. DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS PASOS BIOQUÍMICOS DE LA EXTRACCIÓN DE BMP/iNCP



La técnica bioquímica de aislamiento de BMP/iNCP bovina se realizó en tandas de 2 Kgs de hueso cortical diafisario bovino, limpio de tejidos blandos; de los que se extrajo un agregado de BMP junto con proteínas no colágenas insolubles en agua (iNCP) de peso 270 ± 87 mg al ir extrayendo aquellos componentes en los que se encontraba incluida la fracción BMP/iNCP, se fueron produciendo esas pérdidas de peso en el extracto.

Una vez limpias las diáfisis de tejidos blandos y de médula ósea, se congelan en nitrógeno líquido y se realiza la molienda del hueso en un molino de cuchillas (RESTCH) hasta obtener partículas de $1-3 \text{ mm}^3$. A continuación se extraen los lípidos mediante solución de cloroformo/metanol 1:1, después se desmineraliza el hueso tras someterlo a una solución de HCL a bajas concentraciones.

Uno de los pasos cruciales de esta técnica de aislamiento bioquímico, es la solubilización de la BMP en solución de GuHCL 4M/CaCl₂ 0.5M y su posterior precipitación en solución de GuHCL 0.5M tras someterse a los diferentes procesos de diálisis, bien frente a agua o frente a buffer de citrato sódico (19,20). El extracto obtenido, BMP parcialmente purificado junto con proteínas no colágenas insolubles en agua se liofiliza para su conservación hasta su posterior implante.

Biomodelo experimental

Para la realización de este estudio se utilizaron un total de 108 ratas macho Sprague Dawley de 10-12 meses de edad. Los animales fueron anestesiados mediante inhalación de éter. Se practicó una incisión longitudinal sobre la proyección del fémur. Se disecó el espacio fascial entre los músculos vasto externo y glúteos, desperiostizando una longitud aproximada de fémur de 2 cm.

Tras fijar los dos extremos del fémur con clamps, se procedía a la extracción de un cilindro óseo de 1.5 cm. Intramedularmente se colocaba un diseño alámbrico "en omega" con el fin de mantener los dos extremos óseos a distancias y obturar totalmente los canales medulares. Finalmente se procedía a realizar los diferentes implantes.

Grupos analizados

Grupo control: (36 animales). Implante de 1 mg de crioprecipitado de FN dentro de una cápsula de gelatina nº 5 en el defecto óseo realizado.

Grupo BMP/iNCP: (36 animales). Implante de 25 mg de extracto BMP/iNCP dentro de una cápsula de gelatina nº 5, en el defecto óseo realizado.

Grupo BMP/iNCP + FN: (36 animales). Implante de 25 mg de extracto de BMP/iNCP junto con 0.5 mg de crioprecipitado de FN, dentro de una cápsula de gelatina nº 5.

Evaluación anatomopatológica

Los estudios anatomopatológicos para valorar la aparición de inducción ósea se llevaron a cabo, recogiendo una biopsia de la zona del implante a los 3,5,7,15,21 y 31 días de la intervención. Los cambios de actividad celular en el implante fueron graduados con arreglo a la escala de Vandersteenhoven (21):

Grado 0: Ninguna célula* en el campo utilizando un objetivo 10x.

Grado 1: Escasas células* en el campo (5-10) utilizando un objetivo 10x.

Grado 2: De 10 a 15 células* utilizando un objetivo 10x.

Grado 3: Más de 15 células* en el campo utilizando un objetivo 10x.

* Células de un tipo específico (mesenquimales, condroblastos, osteoblastos u osteoclastos).

En el estudio de microscopía óptica, las tinciones utilizadas, además de la habitual Hematoxilina-Eosina, estaban orientadas hacia la evaluación del tejido óseo: Safranina-O, Tricrómico de Masson, PAS.

El estudio ultraestructural se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión, con método de fijación doble y tinción de cortes ultrafinos con Pb.

Tratamiento estadístico

En la valoración de los datos de este estudio, tras un análisis preliminar de los resultados y viendo cómo éstos no se ajustaban a una distribución normal ni tras una transformación logarítmica, se ha optado por la utilización del test no-paramétrico de Mann Whitney para la comparación de medias.

RESULTADOS

En la Tabla II, se exponen los resultados hallados al realizar una valoración estadística de la incidencia del fenómeno de inducción ósea acontecido en cada grupo así como las causas de fracaso de inducción, agrupadas en infección, fallo en la técnica quirúrgica y desconocidas.

El grupo control no indujo formación ósea en ninguno de los casos analizados. Existió una diferencia estadística altamente significativa en relación con la aparición del fenómeno de inducción ósea en los grupos de implante de BMP/iNCP (con o sin FN) cuando se compararon con el de control ($p < 0.001$).

Si bien la incidencia de aparición de inducción ósea fue mayor en el grupo de implante de BMP/iNCP junto con FN (23 de 36 casos, 63%) en relación con el de BMP/iNCP solo (20 de 36

TABLA II. INCIDENCIA DEL FENÓMENO DE INDUCCIÓN OSEA EN LOS DIFERENTES GRUPOS ANALIZADOS Y CAUSAS DEL FRACASO DE LA MISMA

GRUPO	Nº CASOS (%)	I.OSEA+	CAUSAS DE I.OSEA		
			Inf.	FT.	Desc.
CONTROL	36(100%)	0(0%)	6(16.7%)	2(5.5%)	28(77.8%)
BMP/iNCP	36(100%)	**20(55.6%)	4(11.1%)	2(5.5%)	10(27.8%)
BMP/iNCP+FN	36(100%)	**23(63.9%)	1(5.5%)	2(5.5%)	10(27.8%)

**Diferencia estadísticamente significativa de los grupos a los que se les había implantado BMP/iNCP frente a los que no llevaban la proteína (Grupo Control), $p < 0,001$.

Inf. Infección

FT: Fallo Técnico

Desc: Desconocidas

casos, 55.6%), ésta no llegó a ser estadísticamente significativa.

Los implantes que subsecuentemente formaron nuevo hueso se caracterizaron por el desarrollo sincrónico precoz de:

- Actividad mitótica de las células mesenquimales.
- Fusión de las células mesenquimales en células multinucleadas gigantes.
- Crecimiento de brotes capilares neoformados.

Esta sincronización no apareció en aquellos implantes que no indujeron la formación del hueso.

En la figura 1 se muestran los resultados en relación con la aparición del fenómeno de inducción ósea en los grupos a los que se le había implantado BMP/iNCP 1º sin FN y 2º con FN.

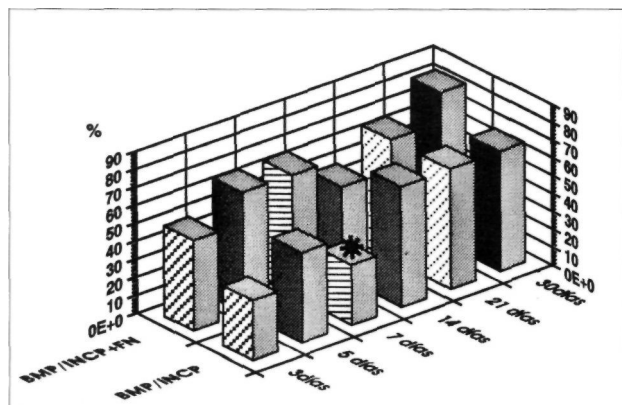


Figura 1. Comparación de la incidencia de inducción ósea en los dos grupos a los que se les había implantado BMP/iNCP (1ª sin FN Y 2ª con FN) en los diferentes perío-

ta el % de inducción ósea sobre todo en los primeros períodos analizados.

Mediante el estadístico de contraste, se pudo observar como, ese incremento llegó a ser estadísticamente significativo a los 7 días del implante ($p < 0,05$). En cualquier caso es evidente como el porcentaje de inducción ósea es más alto en el grupo de implante de BMP/iNCP + FN en relación con el implante de BMP/iNCP sola.

En términos generales la respuesta fue "todo" o "nada", ya que ninguno de los implantes presentó una respuesta parcial. Se indujo o no se indujo hueso, pero ninguno se detuvo en fases intermedias.

En la Tabla III se observa la secuencia cronológica del cambio de actividad celular en el implante, siguiendo los criterios de Vandersteenhoven (21).

Se observa como la aparición de células mesenquimales es más evidente a los 3-5 días del

TABLA III. GRADUACIÓN DEL CAMBIO MORFOLÓGICO CELULAR DEL IMPLANTE Y SUCESIÓN CRONOLÓGICA SEGÚN LOS CRITERIOS DE VANDERSTEENHOVEN

	3 días	1 semana	2 semanas	3 semanas	4 semanas
CEL MESENQUIMALES	3	15	10	08	05
CONDRÓBLASTOS	0	1.1	3.0	2.5	1.2
OSTEOBLASTOS	0	0	1.7	3.0	2.6
OSTEOCLASTOS	0	0.7	1.6	2.2	1.3

implante, cambiando la población celular hacia la aparición de condrocitos, cuyo pico máximo es alcanzado a los 15 días, para posteriormente, aproximadamente a los 21 días las poblaciones celulares predominantes fueron la de osteoblastos y osteoclastos (Fig. 2).

En aquellos casos en que se obtuvo inducción ósea positiva ante el implante de BMP/iNCVP con o sin FN la secuencia de los fenómenos celulares que fueron aconteciendo fue la siguiente:

Desde un punto de vista microscópico, el material implantado, es decir el extracto de BMP/iNCP consistía en una sustancia proteinácea, acelular y amorfa.

En la figura 3 (a-e) se observa toda la secuencia anatomopatológica del fenómeno de inducción ósea, con diferenciación de células mesenquimales en células especializadas óseas y organización en un osículo relleno de médula ósea.

Durante los 3 primeros días únicamente pudo observarse en la zona de inoculación del implante, la presencia de células mesenquimales muy indiferenciadas, con aparición de fibroblastos de tipo estrellado.

En el implante de BMP/iNCP al que se le había añadido FN, pudo observarse entre el 3° y 5° días la aparición de células de tejido con-

juntivo multinucleadas, cuyo origen parece ser la fusión de células mesenquimales. Este fenómeno también se evidenció en los implantes de BMP/iNCP sola, aunque más tardíamente (entre el 5° y 7° días) (Fig. 3a).

A los 15 días post-implante, lo más destacable fue la presencia de tejido condroide y células de tipo condroblástico y condrocítico. En el grupo al que se le había implantado BMP/iNCP junto con FN, ya pudo observarse en este mismo período de tiempo una calcificación de tejido condroide en algunas zonas (Fig. 3b).

Hemos de destacar como la diferenciación desde tejido conjuntivo laxo hacia osteoide se realizaba desde el centro hacia la periferia, con una tendencia a la formación de un osículo. Este fenómeno se evidenció en ambos tipos de implante (Fig. 3c).

A los 21 días de la realización del implante en el defecto óseo, existió una gran proliferación vascular, con aparición de capilares neoformados. También se observó la presencia de tejido osteoide así como de osteoblastos y osteoclastos, éstos al principio eran escasos, pero fueron aumentando en número y talla en relación con la neoformación vascular (Fig. 3d).

Finalmente, los estudios llevados a cabo al 30 día del implante mostraron la presencia de hueso maduro, con una actividad rellena de médula ósea con sus células precursoras (Fig. 3e).

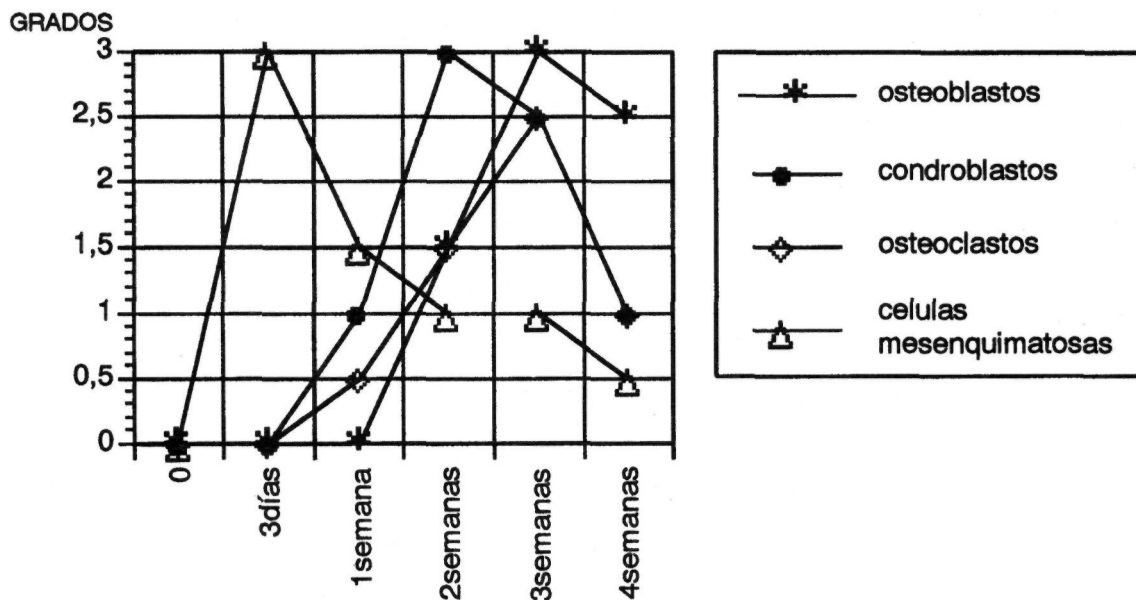


Figura 2. Cambios cronológicos en la actividad celular del implante.

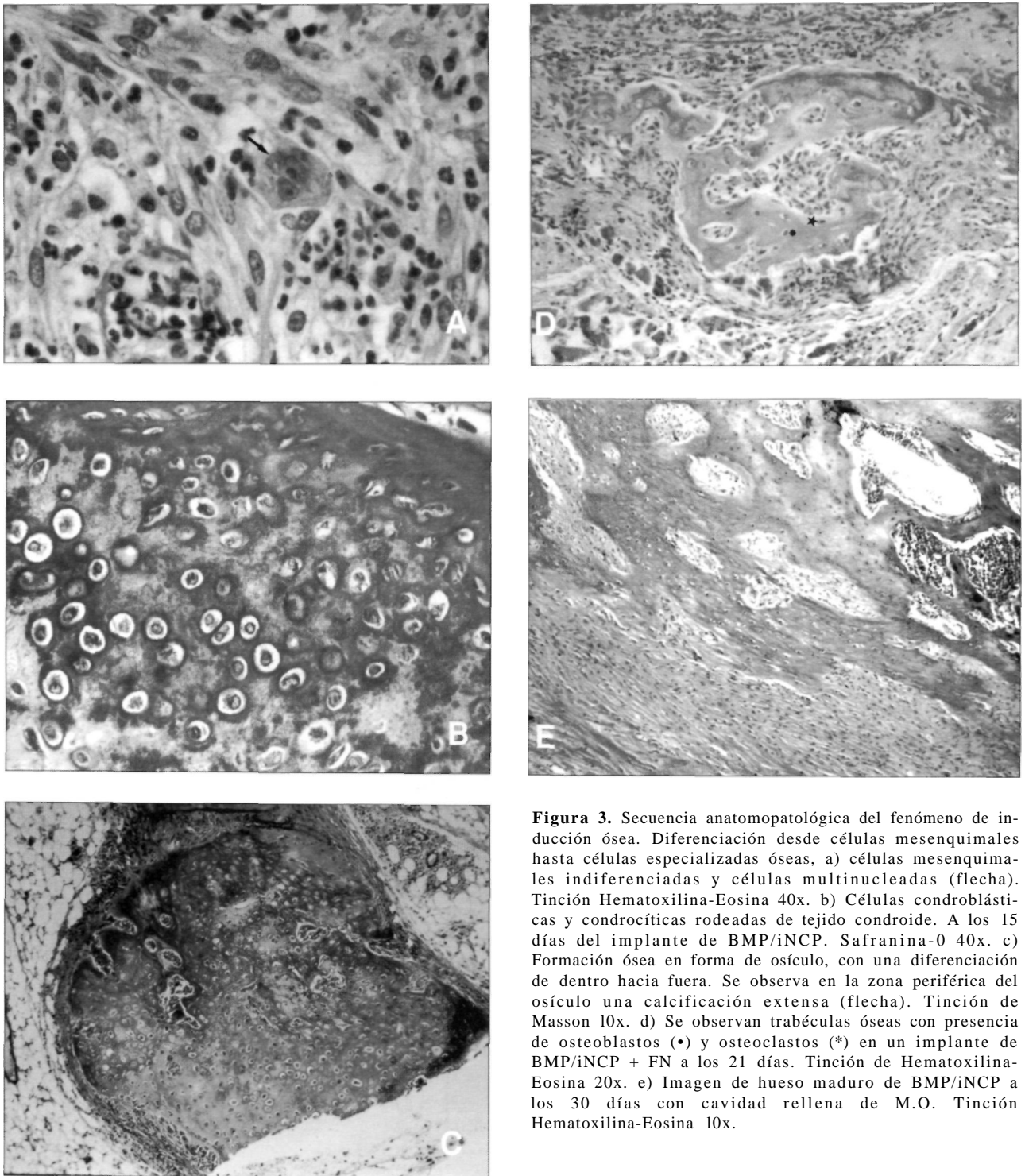


Figura 3. Secuencia anatomopatológica del fenómeno de inducción ósea. Diferenciación desde células mesenquimales hasta células especializadas óseas, a) células mesenquimales indiferenciadas y células multinucleadas (flecha). Tinción Hematoxilina-Eosina 40x. b) Células condroblásticas y condrocíticas rodeadas de tejido condroide. A los 15 días del implante de BMP/iNCP. Safranina-0 40x. c) Formación ósea en forma de osículo, con una diferenciación de dentro hacia fuera. Se observa en la zona periférica del osículo una calcificación extensa (flecha). Tinción de Masson 10x. d) Se observan trabéculas óseas con presencia de osteoblastos (*) y osteoclastos (*) en un implante de BMP/iNCP + FN a los 21 días. Tinción de Hematoxilina-Eosina 20x. e) Imagen de hueso maduro de BMP/iNCP a los 30 días con cavidad rellena de M.O. Tinción Hematoxilina-Eosina 10x.

En el estudio ultraestructural pudo demostrarse la capacidad osteogénica de la BMP y la secuencia de cambios que conducen a la aparición de hueso trabecular y médula ósea. Los cambios que surgieron en la zona del implante de BMP transcurrieron desde la aparición de elementos mesenquimales indiferenciados, fibroblastoides, a la aparición de elementos con características de tipo condroblástico o condrocítico (células de contorno ovoideo, con abundante retículo endoplásmico con persistencia de un halo matricial pericelular e inclusiones lipídicas en su citoplasma (Fig. 4a) y finalmente, hasta la aparición de células de tipo osteoblastoide, que se disponen próximas a las zonas de depósito cálcico, con finas prolongaciones filopódicas, abundante retículo endoplásmico con una configuración fusiforme y un núcleo excéntrico. Su carácter osteoblástico y osteocítico queda patente cuando van siendo rodeadas por los depósitos maduros, cuyas finas prolongaciones ocupan la luz de los conductillos calcóforos (Fig. 4b).

DISCUSIÓN

En estudios llevados a cabo anteriormente utilizando el mismo modelo experimental ya pudimos observar como el implante de la cápsula de gelatina sola (sin contener ni BMP y/o FN o cualquier otro tipo de sustancia) no inducía la formación ósea (16,36). En consecuencia, optamos por considerar como grupo control en este trabajo el implante de FN sola dentro de la cápsula de gelatina.

Nuestros resultados demuestran como la FN por sí sola es incapaz de incitar el fenómeno de inducción ósea. Sin embargo, su implante junto con BMP/iNCP parece ejercer un efecto positivo en la acción osteoinductora de esta proteína, ya que incrementa el número de casos con neoformación ósea, en relación con el grupo al que se le había implantado únicamente BMP/iNCP. Este hecho es debido a que la acción principal de la FN a nivel celular es en primer lugar fa-

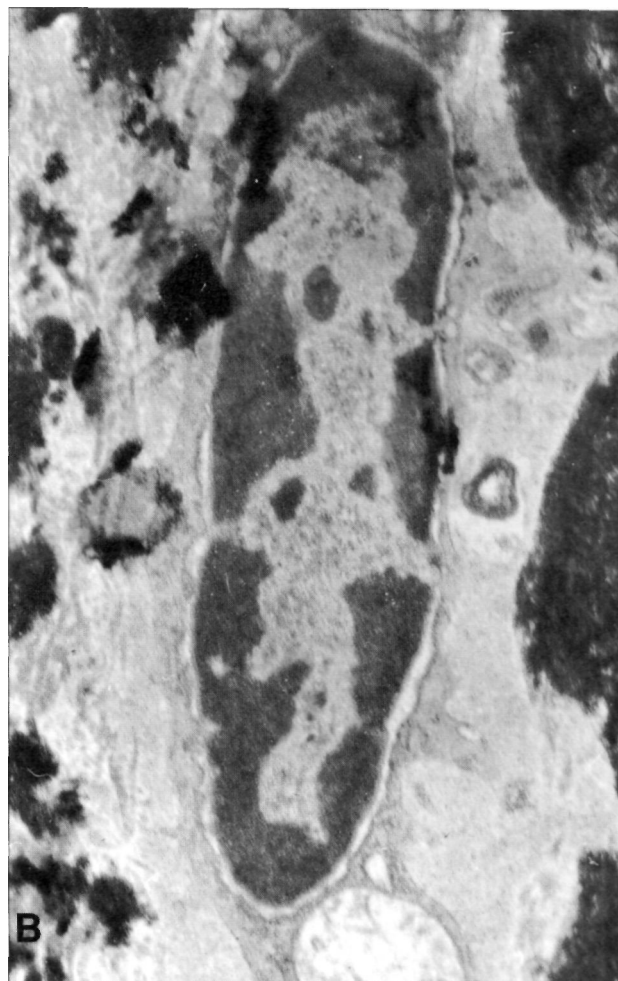
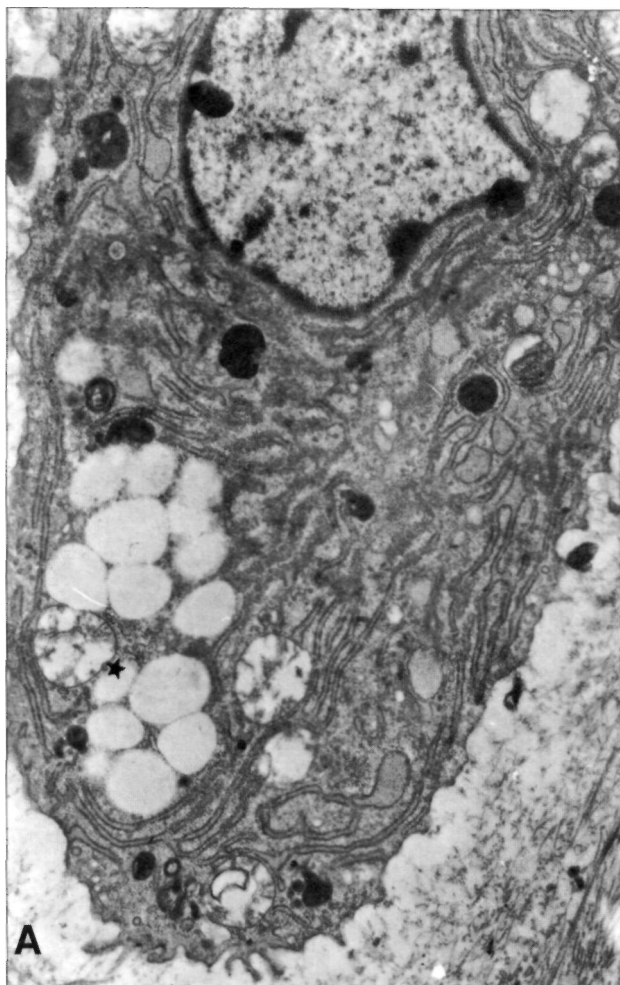


Figura 4. Datos a destacar en el estudio de microscopía electrónica de transmisión, a) Elemento con un elevado grado de diferenciación condroblástica (con abundante RER e incluso con zona periférica de una trabécula de hueso esponjoso en

relación con una zona de formación ósea, b) Osteoblasto en relación con una zona de formación ósea. (*) x3000.

vorecer la llegada de células mesenquimales al foco, para posteriormente ejercer una influencia positiva en su unión, actuando a modo de "cemento intercelular". Esta unión a su vez es un prerequisite indispensable para la proliferación y posterior diferenciación celular. Estos últimos pasos en donde comenzaría a ejercer su acción la BMP. Así pues, la FN actuaría a modo de coadyuvante en la acción osteoinductora de BMP.

Pensamos, a vista de nuestros resultados y de acuerdo con otros autores (22,23,24,25), que el inicio del fenómeno de osteoinducción, tras el implante de BMP/iNCP, podría esquematizarse de la siguiente forma:

En un primer momento, el implante de BMP/iNCP promueve la quimiotaxis celular. El implante en cápsula de gelatina, tanto de BMP/iNCP con o sin FN provoca en primera instancia un fenómeno de tipo inflamatorio reactivo, lo cual ocasiona la primera migración de células al foco. La BMP reclutaría células mesenquimales perivasculares con el fin de desarrollar una vía celular coadyuvante ya que favorece la quimiotaxis en su papel de opsonina y por otra parte une las células ávidamente entre sí (16,26,27).

Tras la quimiotaxis y unión de las células mesenquimales, seguiría su fase de proliferación. La unión de la fibronectina a las células y sustancia intercelular, se seguiría por una "síntesis de novo" de fibronectina tisular. El contacto inicial entre las células y la BMP/iNCP acontecería a los 2 ó 3 días del implante y sería un contacto dinámico, que estaría en continuo movimiento (28,29,30).

Al interactuar la sustancia inductora (BMP) y la célula mesenquimal perivascular (célula respondedora o inducida) acontecería el proceso de diferenciación celular. Estas células perivasculares con un capacidad osteogénica heredada (estado aún no activado para diferenciarse en células osteoprogenitoras), serían las células diana para la BMP. El mecanismo de transmisión de la BMP al interior de las células, así como su mecanismo íntimo de acción, aún no se conoce (31,32).

El implante de BMP/iNCP en el defecto óseo produce una osteogénesis notable por osteoinducción. Esta osteoinducción puede ser provocada exclusivamente a partir de las células mesenquimales del huesped. Además el elevado porcentaje de resultados positivos obtenidos con el implante de BMP/iNCP, hace descartar la posible existencia de una reacción inespecífica.

El principal inconveniente con el que nos enfrentamos es que se necesitan grandes cantidades de hueso (2 Kg) para obtener muy poca cantidad de extracto purificado (270 mg), debido a la excasa concentración de la BMP en el hueso (0.001%) del peso total del hueso.

Los resultados de nuestro trabajo evidencian que la BMP aumenta de forma muy notable la capacidad del huesped de regenerar grandes defectos óseos. El potencial de la BMP de iniciar el proceso de inducción ósea hace que el proceso de regeneración ósea sea mucho más rápido. Esto difiere del proceso de trasplante de aloinjertos masivos, que no mantiene su viabilidad y por tanto requiere incluso años para su incorporación y sustitución.

Existen problemas aún por resolver para que el uso de BMP en la reparación de grandes defectos óseos sea plenamente adecuado para la proteína (33,34,35). El implante de BMP/iNCP utilizando como vehículo portador la cápsula de gelatina, si bien ofrece una base adecuada para el transporte y liberación de la proteína, es incompleta, ya que se reabsorbe demasiado rápidamente, difundiendo la proteína del foco de forma casi inmediata y mucho antes de que la respuesta del lecho sea completa. Se necesita de un biomaterial que actúe por una parte como vehículo portador de la proteína y por otra como sistema de liberación de la misma, permitiendo un gradiente óptimo de concentración de BMP en el foco (36).

No obstante, el implante de BMP demuestra ser un gran avance en el tratamiento de grandes pérdidas óseas aunque aún queden grandes interrogantes, como es el poder obtener aún un extracto más concentrado y purificado y el hallar portadores biológicos ideales.

Bibliografía

1. **Senn N.** On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci (New Series)* 1989; 98: 219-43.
2. **Deaver JB.** Secondary bone implantation by a modification of Senn's method. *Med News* 1989; 55: 714-7.
3. **Bier A.** Aussprache. *Chir Kingr* 1924 (z.O. 27-72).
4. **Urist MR.** Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-9.
5. **Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM.** The bone induction principle. *Clin Orthop* 1967; 53: 243-83.
6. **Urist MR, Granstein R, Nogami H, Svenson L, Murphy R.** Transmembrane bone morphogenesis across multiple-walled chambers: New evidence of a diffusible bone morphogenetic property. *AMA Arch Surg* 1977; 112: 612-9.
7. **Urist MR, Mikulski AJ.** A soluble bone morphogenetic protein extracted from bone matrix with a mixed aqueous and nonaqueous solvent. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 162: 48-53.
8. **Urist MR, Conocer MA, Lietze A, Triffitt JT, Delange R.** Partial purification and characterization of bone morphogenetic protein. In: Cohn D, Talmage R and Matthews JL (Eds): *Hormonal Control of Calcium Metabolism*. Amsterdam Exc Med 1981; 307-14.
9. **Urist MR, Sato K, Brownell AG, Malinin TI, Lietze A, Huo Y-K, Prolo DJ, Oklund S, Finerman GA, DeLange RJ.** Human bone morphogenetic protein. *Proc Soc Expo Biol Med* 1983; 173: 194-99.
10. **Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, Temps P, Hunkapiller M, DeLange RJ.** Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxiapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81: 371-5.
11. **Canalis E, Centrella M, Urist MR.** Effect of partially purified bone morphogenetic protein on DNA synthesis and cell replication in calvarial and fibroblast cultures. *Clin Orthop* 1985; 196: 289-96.
12. **De Pedro JA, Cuadrado MA, Tome JL, De Lucas FG, Asenjo JA, Furio V, Lopez-Duran L.** Evaluation of BMP-Coated Titanium implants for use in grafting for Bone Diaphyseal Defects (abstract) *Eur Surg Res* 1991; 23: 122.
13. **Johnson EE, Urist MR, Finerman GAM.** Repair of segmental defect of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1988; 236: 249-57.
14. **Johnson EE, Urist MR, Schmalzried TP, Chotivichit A, Huano HK, Finerman GAM.** Autogeneic cancellous bone grafts in extensive segmental ulnar defects in dogs. *Clin Orthop* 1989; 243: 254-65.
15. **Kubler N, Urist MR.** Bone morphogenetic protein-mediated interaction of periosteum and diaphysis. *Clin Orthop* 1990; 258: 280-94.
16. **Cuadrado MA, De Pedro JA, Garcia de Lucas F. et al.** Bases fisiológicas de la proteína morfogenética ósea. En: López-Durán L Ed. *Estimulación ósea*. Madrid. Gallery 1989; 41-81.
17. **Benecky M.** Human plasma fibronectin structure probed by steady-state fluorescence polarization: evidence for a rigid oblate structure. *Biochemistry*. 1990; 29: 3082-91.
18. **Brownell RA, Jones HL.** The synthesis and accumulation fibronectin by human articular cartilage. *J Rheumatol* 1990; 17: 65-72.
19. **Urist MR, Mikulski AJ, Lietze A.** Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1828-32.
20. **Kawai T, Urist MR.** Bovine tooth-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1989; 68: 1069-74.
21. **Vandersteenhoven JJ, Spector M.** Histological investigation of bone induction by demineralized allogeneic bone matrix: A natural biomaterial for osseous reconstruction. *J Biomed Mat Res* 1983; 17: 1003-14.
22. **Urist MR.** Bone morphogenetic protein induced bone formation and the bone-bone marrow consortium. *Bone transplantation* 1989; 19: 186-97.
23. **Guterman IA, Boman TE, Wang GJ, Balian G.** Bone induction in intramuscular implants by demineralized bone matrix: Sequential changes of collagen synthesis. *Collagen Relat Res* 1988; 8: 419-31.
24. **Kawamura M, Urist MR.** Growth factors, mitogens, cytokines and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture. *Dev Biol* 1988; 130: 435-42.
25. **Lianjia Y, An J.** Immunohistochemical observation of bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. *Clin Orthop* 1990; 257: 249-56.
26. **Frenz DA, Akiyama SK, Paulsen DF, Newman SA.** Latex beads as probes of cell surface-extracellular matrix interactions during chondrogenesis: Evidence for a role for amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Develop Biol* 1989; 136: 87-96.
27. **Xu ZL.** Distribution of type IV collagen, laminin and fibronectin during maxillary process formation in the chick embryo. *Am J Anat* 1990; 187: 232-46.
28. **Lopez-Duran L, De Pedro JA.** Avances en Traumatología y Cirugía Ortopédica. Editorial Luzán. Madrid. 1988.
29. **Nogami H, Ono Y, Oohira A.** Bioassay of chondrocyte differentiation by bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1990; 258: 295-9.
30. **Urist MR, Caplan AI.** Bioactive factors in bone. *Connect Tissue Res*. 1989; 23: 103-6.
31. **Urist MR.** Bioactive factors in bone development and repair. *Proc Connect Tissue Res* 1990; 24: 1-81.
32. **Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang E.** Novel regulator of bone formation molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528-34.
33. **Flatley TJ, Lynch KL, Benson M.** Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clin Orthop* 1983; 179: 246-9.
34. **Higashi S, Yanamuro T, Nakamura T, Ikada Y, Hyon SH, Hamshidi K.** Polymer-hydroxiapatite for biodegradable bone fillers. *Biomaterials* 1986; 7: 183-8.
35. **Hoogendoorn HA, Renooij W, Akkermansma, Visser W, Wittebol P.** Long-term study of large ceramic implants (porous hydroxyapatite) in dog femora. *Clin Orthop* 1984; 187: 281-5.
36. **De Pedro JA, Cuadrado MA, Tome JL, De Lucas FG, Asenjo JA, Marco F, Valor R, Lopez-Duran L.** Bone morphogenesis induced by partial purified BMP. Preliminary Results (abstract). *Eur Surg Res* 1989; 21: 65.