

# REVISION DE LAS PROTEINAS MORFOGENETICAS DEL HUESO (PMH)

Audisio, S.A.; Audisio, S.N.; Vaquero, P.

## INTRODUCCION

Las investigaciones científicas en el área de la biología molecular permitieron la comprensión de los mecanismos de la diferenciación celular, la morfogénesis tisular y a la vez asistir a los eventos de regeneración de tejidos en la vida post-natal que normalmente ocurren durante la embriogénesis<sup>30</sup>. Esta cascada morfogénica que sucede durante el período embriológico puede ser reproducida en la vida post natal por implantación de matriz ósea desmineralizada en forma heterotópica (extraesquelética) resultando en la formación de hueso inducido<sup>41</sup>.

La inducción de la formación de hueso reside en la acción combinada de un grupo de proteínas que reciben el nombre genérico de Proteínas Morfogénicas del Hueso (PMH). Las PMH son glucoproteínas insolubles de peso molecular inferior a los 50 Kda. (17.5-35 Kda.), miembros de la superfamilia de los Factores Transformadores del Crecimiento-  $\beta$  (FTC-  $\beta$ )<sup>14,20,42,43,46</sup>. En la actualidad fueron reconocidas 14 isoformas de PMH30 diferenciadas e identificadas por números (PMH-1 a PMH-14). Los factores con acción específica sobre el hueso son las PMH-2, PMH-4 y PMH-7, también conocidas como osteogenina o proteína osteogénica -1 y -2, PO-1 y PO-2<sup>30,44</sup>. Estas proteínas gobiernan funciones críticas a nivel molecular y celular en el desarrollo de las líneas celulares progenitoras mesenquimáticas pluripotenciales, células estromales de la médula ósea, precursores de los osteoblastos, mioblastos, fibroblastos, riñones<sup>30</sup>, sistema nervioso central y periférico<sup>30,14</sup> hígado, pulmones, corazón, dientes (y otras estructuras craneofaciales), gónadas y piel<sup>30</sup>.

Las PMHs/POs inequívocamente poseen la capacidad de inducir la formación de hueso endocondral nuevo en sitios heterotópicos en una gran variedad de modelos experimentales<sup>34</sup>. La respuesta tisular a implantes que combinan una matriz apropiada que actúe como carrier y PMH/PO altamente purificada u obtenida por clonación incluye activación y migración de células mesenquimáticas indiferenciadas por quimiotaxis, mitosis y proliferación, diferenciación, mineralización e invasión vascular del cartílago, condrólisis y diferenciación de osteoblastos y deposición de matriz ósea y finalmente mineralización y diferenciación de la médula en el nuevo huesillo<sup>27</sup>

## Obtención de las PMH

Las PMH se obtienen por procesos de 1) desmineralización de la matriz ósea con HCl, hidróclorido de guanidina, cloruro de calcio y urea<sup>13,20</sup>, 2) purificación de cultivos de osteosarcomas<sup>13,38</sup>, y 3) por recombinación genética (rPMH)<sup>17,20,30</sup>. Las rPMH-2, rPMH-4 y rPMH-7 inician la formación de hueso in vivo<sup>8,14,31,35,40,42,43</sup> incluso con equipotencia quimiotáctica entre ellas<sup>29</sup>

Entre las distintas especies de las que fueron purificadas las PMH cuentan el hombre (hPMH), distintos primates, rata, cerdo, bovino (bPMH), ovinos y caninos (cPMH)<sup>23</sup>. Sólo dos aminoácidos diferencian la hPMH de la cBMP<sup>23</sup>, sin embargo la capacidad inductiva de PMHs de distintos orígenes muestran grandes variaciones<sup>12</sup>. Los

resultados de las observaciones de aplicar bPMH y rhPMH-2 intramuscular en ratas demostraron que la actividad de esta última era 1/10 que la bPMH, en tanto no se observaron diferencias entre hPMH y bPMH<sup>3</sup>.

La cPMH parcialmente purificada fue testeada biológicamente en ratas e indujo formación ósea ectópica al cabo de 3 semanas a dosis de 6.0 a 10.0 mg con signos de respuesta inmunitaria determinada por la infiltración linfocitaria rodeando el hueso. Cromatográficamente la PMH fue caracterizada como una mezcla ácida de proteínas conteniendo 3 fracciones con peso molecular variable entre 4-7,5; 7,6-12 y 70 a 120 Kda. respectivamente, siendo la fracción dominante la comprendida entre 4-12 Kda. La capacidad osteoinductiva de la cPMH fue semejante a la bovina y ovina y superior a la porcina introducida en una cápsula de gelatina e implantada en intramuscularmente en ratas<sup>23</sup>

La PMH adsorbida en hidroxiapatita (HA) y más tarde implantada en intramuscularmente en monos papiones (*Papio ursinus*) mostró diferenciación ósea llenando los espacios de HA a los 30 días post-implantación<sup>33</sup>. Investigaciones similares con igual resultado, se efectuaron con el fin de determinar la capacidad inductora de las proteínas morfogenéticas del hueso en implantes subcutáneos<sup>29</sup>

## **Las PMH como terapéutica molecular**

### ***Las PMH en la cirugía maxilofacial***

Los sitios anatómicos investigados de desarrollo craneofacial de la PMH han sido el paladar, mandíbula, huesos temporales, donde se crearon quirúrgicamente defectos que debido al tamaño no podrían curar sin tratamiento. Se emplearon biomateriales para que se comportasen como carriers de los factores de crecimiento entre los que cuentan colágeno insoluble, polímeros sintéticos (ácido D,L láctico-co-glicólico (APLG)) y biocerámicas como la hidroxiapatita porosa sintética. La PMH-2 a dosis de 5 µg en bloques de hidroxiapatita colocados subperióticamente en cráneos de conejos resultó en formación de hueso en los poros de la cerámica al término de 3 semanas<sup>25</sup>. La BMP-2 a dosis de 10 a 30 µg combinada con el APLG regeneró defectos de tamaño crítico fue resorbido al cabo de 3 semanas resultando en la restauración del defecto con contornos normales<sup>15</sup>. En experimentos similares, 6,5 µg de BMP-2 colocados en 25 mg de matriz de colágeno insoluble regeneró defectos temporales superando a la matriz ósea desmineralizada<sup>21</sup>. También en defectos temporales de papiones (*Papio ursinus*) se utilizó la PO-1 para estudiar la secuencia de la morfogénesis tisular. Los análisis histológicos e histomorfométricos demostraron que dosis de 100 y 500 µg de OP-1/gm de colágeno de papión o bovino indujeron regeneración completa tras 90 días<sup>32</sup>, diferenciación osteoblástica, secreción de la matriz ósea y mineralización ocurrió inicialmente en los aspectos pericraneales de los especímenes, seguidos de por diferenciación de hueso endocraneal. En tanto la condrogénesis se limitaba, el nuevo hueso contenía células diferenciadas de la médula ósea a los 15 días, aún a dosis de 100 µg de PO-1. Un año más tarde había restauración arquitectónica de las cortezas internas y externas de los temporales.

En defectos de espesor total de las ramas de la mandíbula tratadas con PMH-2 sobre un compuesto formado por APLG y coágulo sanguíneo a dosis de 10µg/100µl, la unión del defecto ocurrió a las 12 días con uniones de hueso que sobrepasaban los límites del defecto<sup>39</sup>. Los sitios tratados que fueron cubiertos por membranas de politetrafluoroetileno expandido (PTFe) se unieron con un contorno óptimo del hueso regenerado, lo que indica que el crecimiento del nuevo hueso puede ser controlado<sup>19</sup>.

## **Las PMH en la cirugía ortopédica**

Las aplicaciones de las PMH/PO han sido motivo de numerosos estudios en huesos largos tras crear defectos segmentales críticos, entendiéndose por espacio crítico como el espacio mínimo por el cuál el hueso no puede curar espontáneamente, el espacio crítico es igual a una vez y media el diámetro del hueso<sup>11</sup>. En ratas con defectos femorales segmentales que fueron tratados con PMH-2 a dosis 11 µg en matriz de colágeno se demostró radiológica, histológica y mecánicamente la unión al cabo de 4,5 semanas<sup>45</sup>. En ratas a las que se les realizaron defectos segmentales de fémur el espacio les fué rellenado con implantes cilíndricos cuya matriz estaba conformada por 60% de hidroxiapatita (HA) porosa y 40% de fosfato tricálcico (el diámetro de los poros varió entre 250 y 400 µ) conteniendo 100 µg de PMH y un segundo grupo el espacio fue rellenado sólo con la matriz; a los 30, 60 y 120 días fueron comparados los aspectos histológicos e histomorfométricos revelaron que el área total de hueso, el área ósea fuera del implante, el hueso que rellenaba los poros era significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) en los fémures implante/PMH que en los que no poseían PMH, en tanto no se registraron diferencias biomecánicas<sup>37</sup>. En modelos idénticos donde se empleó ácido D,L láctico-co-glicólico (APLG) como carrier, se evaluó distintos tamaños de partículas del carrier con distintas dosis de PMH-2 a las 9 semanas<sup>18</sup>. La resistencia mecánica del hueso formado fue mayor cuando aumentó la dosis de PMH-2 y el tamaño de las partículas de carrier fue de 247 µm. Los defectos femorales segmentales de 2,5 realizados en ovejas fueron tratados exitosamente con PMH-2 a dosis de 500 µg/gm de matriz de colágeno constatándose la unión a los 90 días. La resistencia a las fuerzas tangenciales fue mayor que los defectos tratados con autoinjertos<sup>7</sup>. Luego de 52 semanas y tras estudios de seguimiento se halló que el hueso recanalizó la médula ósea con corteza neoformada<sup>16</sup>. En los defectos de ulna de 2 cm confeccionados en ulnas de conejos tratados con PMH -2 en APLG como carrier hubo respuesta de acuerdo a la dosis empleada. Con 40 µg de PMH-2/100 µl. Los parámetros biomecánicos del hueso neoformado fueron semejantes al homólogo no operado<sup>5</sup>. El tratamiento de defectos de 2 cm realizados en ulnas caninas y combinadas con un complejo de APLG y rhPMH -2 a dosis de 40, 160 y 640 µg mostró que la dosis mínima necesaria para formar hueso son 40 µg, siendo mayor el contenido mineral en dosis de 160 y 640 µg, no existiendo diferencias significativas entre estas dos últimas dosis (21). La sustitución de defectos segmentales de radio de un sistema de APLG y r PMH-2 a dosis de 17 y 70 µg en conejos demostró el continuo incremento de la radiopacidad durante 8 semanas, siendo mayor en los animales que recibieron 70 µg. En los huesos que poseían 70 µg las trabéculas fueron más gruesas que en los que poseían 17 µg<sup>47</sup>. Los resultados obtenidos de comparar mecánicamente el hueso obtenido por acción de las PMH e injertos autólogos, el hueso neoformado mostró ser marcadamente superior que el injerto<sup>2</sup>.

## **Respuesta inmunitaria de las PMH**

Las respuestas específicas e inespecíficas a los implantes que contienen PMH fueron determinados en ratas que fueron tratadas con ciclosporina A, donde se observó que las ratas inmunosuprimidas demostraron mayor actividad osteogénica<sup>1</sup>. Los linfocitos T juegan un rol importante en el fenómeno inmunológico de la implantación de PMH e inducción ósea. Luego de la implantación subcutánea de matriz ósea desmineralizada conteniendo PMH en ratas timectomizadas con déficit de linfocitos T, se formó más hueso nuevo y mayor espacio medular en 24 días que en los controles<sup>22</sup>. La implantación de PMH alogénica evoca una presencia moderada de anticuerpos anti PMH en circulación en vertebrados superiores que no interfieren con la capacidad osteoinductiva de PMH. La implantación de PMH xenogénica produce un alto grado de anti PMH, que aparentemente

inhiben la actividad la capacidad osteoinductiva de PMH o bien destruye el hueso nuevo inducido. La doble implantación de PMH alogénica o xenogénica no sólo genera marcada elevación de anticuerpos específicos anti especie, sino también disminuye la capacidad inductiva por PMH. La respuesta inmunológica provocada por heteroimplantación por PMH probablemente genera actividad de macrófagos y respuesta humoral generada de linfocitos B<sup>6</sup>.

### **Las PMH en medicina veterinaria**

En medicina veterinaria las PMH fueron empleadas para el tratamiento experimental de defectos ulnares en caninos con hPMH10. Para el primer tratamiento exitoso de una no unión femoral de 6 semanas de antigüedad se empleó APLG y 400 µg de rhPMH/cm<sup>3</sup> de APLG<sup>9</sup>. La combinación de biocoral y cPMH purificada fue utilizada para el tratamiento de fracturas y no uniones<sup>26</sup> en dosis de 50 mg.

La cPMH parcialmente purificada fue usada en el tratamiento de una no-unión de radio y ulna de seis meses de antigüedad en un greyhound italiano sobre un soporte de biocoral, al cabo de dos semanas el perro apoyó el miembro y un mes más tarde los controles radiográficos mostraron la curación del defecto<sup>10,23,24</sup>. La osteoinducción de la cPMH parcialmente purificada demostró ser mayor que los autoinjertos<sup>23</sup>

En el contexto clínico la regeneración de hueso requiere un adecuado manejo de tres componentes: 1) Una señal morfogenética (PMH /PO), 2) Un carrier adecuado del cuál pueda ser liberada la señal y que actúe a la vez de matriz, y 3) Una respuesta de las células que permita la diferenciación en hueso<sup>28</sup>. La naturaleza del carrier es quizá el punto de mayor importancia<sup>30</sup>. El carrier más empleado al momento ha sido el colágeno insoluble obtenido del hueso tras los procesos de extracción e inactivación con guanidina-HCl<sup>36</sup>. La aplicación de una señal (PMH -PO) en conjunción con el sustrato insoluble para la inducción tisular demuestra la importancia de la matriz extracelular para el asentamiento de células, proliferación y diferenciación<sup>5,15,21,25,41</sup>. Las condiciones que debe reunir un carrier para que actúe como matriz se hallan perfectamente concensuadas<sup>4,30</sup>, debe ser biocompatible, inorgánica, no inmunogénica, factible de ser tallada para óptima adaptación al esqueleto, proveer soporte mecánico e integración a los tejidos periféricos y promover una rápida vascularización e invasión mesenquimática para la interacción (PMH /PO) previamente adsorbida al carrier. Finalmente debe iniciar actividad osteogénica con dosis de PMH /OP relativamente bajas y una vez que el proceso regenerativo dió comienzo.

### **CONCLUSIONES**

Las investigaciones de aplicación de esta terapia aún se mantiene en la faz experimental. Pero los beneficios que le deparan las PMH a la medicina, y en particular a la cirugía ortopédica y traumatológica es de vasta importancia. Los beneficios poseerán mayor importancia cuando el desarrollo de la ingeniería de tejidos (que combine los osteoblastos del paciente, una matriz y las PMH) permita suplantar los bancos de huesos y las enfermedades que en la actualidad no evitan se evitan con los trasplantes de huesos como son el HIV y Hepatitis B.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1 ALDINGER, G.; HERR, G.; KÜSSWETTER, W.; REIS, H.J.; THIELEMANN, F.W.; HOLZ, U.; Bone morphogenetic protein: a review. *Int Orthop* 1991; 15:169.
- 2 COOK, S.D.; BAFFES, G.C.; WOLFE, M.W.; SAMPATH, T.K.; RUEGER, D.C.; WHITECLOUD, T.S.; The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J. Bone Joint Surg.* 1994, 76A/6, 827-838.
- 3 BESSHO, K.; Ectopic Osteoinductive Difference Between Purified Bovine and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein. in *Bone Morphogenetic Proteins: Biochemistry and Reconstructive Surgery*, 1.996 Sanders Co. Austin, USA p. 105-111.
- 4 BREITBART, A.S.; STAFFENBERG, A.; THORNE, C.H.M.; GLAT, M.D.; CUNNINGHAM, N.; REDDI, A.H.; RICCI, J.; STEINER, G.; Tricalcium Phosphate and osteogenin: a bioactive onlay bone graft substitute. *Plast Rec Surg.* 96:699 1995.
- 5 BOSTROM, M.; LANE, J.M.; TOMIN, E.; BROWNE, M.; BERBERAIN, W.; TUREK, T., SMITH, J.; WOZNEY, J.; SCHILDHAUER, T., Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop.* 327:272, 1996.
- 6 GAO, T.J.; LINDHOLM, A.; MARTTINEN, A.; VILJANEN, V.; LINDHOLM, T.S. Bone Induction and Immune Occurrence in Bone Morphogenetic Protein Implantation, in *Bone Morphogenetic Proteins: Biochemistry and Reconstructive Surgery*, 1.996 Sanders Co. Austin, USA p.53-61.
- 7 GERHART, T.N.; KIRKER-HEAD, C.A.; KRIZ, M.J.; HOLTROP, M.E.; HENNING, G.E.; HIPPI, J.; SCHELLING, S.H.; WANG, E.A., Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop.* 293:317, 1993
- 8 HAMMONDS, R.G. Jr.; SCHWALL, R.; DUDLEY, A.; BERKEMEIER, L.; LAI, C.; LEE, J.; CUNNINGHAM, N.; REDDI, A.H.; WOOD, W.I.; MASON, A.J. Bone inducing activity of mature BMP-2b produced from hybrid BMP-2<sup>a</sup>/2b precursor. *Mol Endocrinol.* 5:149, 1991.
- 9 ITOH, T.; MOCHIZUKI, K.; NISHIMURA, R.; MATSUNAGA, S.; KADOSAWA, T.; SASAKI, N. Femoral Nonunion Fracture Treated with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Dog. *J. Vet. Med* 60(4):535-538, 1998.
- 10 ITOH, T.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; MATSUNAGA, S.; KADOSAWA, T.; KOKUBO, S.; YOKOTA, S.; SASAKI, N. Repair of ulnar segmental defect by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 60(4):451-458, 1998.
- 11 JOHNSON, A.L.; EURELL, J.A.; LOSONSKY, J.M.; EGGER, E.L. Biomechanics and biology of fracture healing with external skeletal fixation *Comp Cont Education* 20(4) 487:498 1998, Apr.
- 12 JORTIKKA, L.; MARTTINEN, A.; LINDHOLM, T.S. Partially purified reindeer (*Rangifer tarandus*) bone morphogenetic protein has a high bone-forming activity compared with some other artiodactyls. *Clin Orthop.* 1993<sup>a</sup>, 227:33-37.
- 13 JORTIKKA, L.; MARTTINEN, A.; Biochemical Extraction, Purification and Characterization of Native Bone Morphogenetic Protein, in *Bone Morphogenetic Proteins: Biochemistry and Reconstructive Surgery*, 1.996 Sanders Co. Austin, USA p.31.
- 14 KELLOKUMPU-LEHTINEN, P.; TULIJOKI, T.; Osteogenic Protein-1 (BMP-7), a Novel Bone Morphogenetic Protein in *Bone Morphogenetic Proteins: Biochemistry and Reconstructive Surgery*, 1.996 Sanders Co. Austin, USA p.47-51
- 15 KENLEY, R.; MARDEN, L.; TUREK, T.; RON, E.; HOLLINGER, J.O. Osseous regeneration in the rat calvarium using novel delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J. biomed. Mater. Res.* 28:1139, 1994.
- 16 KIRKE-HEAD, C.A.; GERHARDT, T.N.; SCHELLING, S.H.; HENNING, G.E.; WANG, E.A.; HOLTROP, M.E.; Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein-2 *Clin. Orthop.* 318:222, 1995.

- 17 KOSTIAINEN, K.; Recombinant Bone Morphogenetic Proteins: Cloning and Molecular Structures, in *Bone Morphogenetic Proteins: Biochemistry and Reconstructive Surgery*, 1996 Sanders Co, Austin USA, p 40-45.
- 18 LEE, S.C.; SHEA, M.; BATTLE, M.A.; KOZITZA, K.; RON, E.; TUREK, T.; SCHAU, R.G.; HAYES, W.C., Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by rhBMP-2 in PLGA matrix. *J. Biomed Mater. Research* 28:1149, 1994.
- 19 LINDE, A.; HEDNER, E. Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing guided by osteopromotive e-PTFE membranes: An experimental study in rats. *Calcif. Tissue Int* 56:549, 1995.
- 20 LINDHOLM, T.S.; VILJANEN, V.V.; MATTILA, M.; Thirty Years of Bone Morphogenetic Protein Research. in *Bone Morphogenetic Proteins: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery*. Academic Press, Austin USA, 1996.
- 21 MARDEN, L.J.; HOLLINGER, J.O.; CHAUDHARI, A.; TUREK, T.; SCHAUB, R.G.; RON, E.; Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. *J. Biomed. Materials Research* 28:1127, 1994.
- 22 MARUSIC, A.; DIKIC, I.; VULKICEVIC, S.; MARUSIC, M. New Bone induction by demineralized bone matrix in immunosuppressed rats. *Experientia* 1992; 48:783.
- 23 OKSANEN, J.; MARTTINEN, A.; PAATSAMA, S.; LINDHOLM, T.S.; Extraction and Characterization of Native Canine Bone Morphogenetic Protein (cBMP) Qualified with Osteoinductivity. *Acta Vet Scand.* 39:164-171, 1998.
- 24 OKSANEN, J.; LINDHOLM, T.S.; PAATSAMA, S.; Experiences Using Native Allogenic and Xenogenic Bone Morphogenetic Protein in Curing Bone Disturbances in Domestic Dogs. in *Bone Morphogenetic Proteins: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery*. Academic Press, Austin USA, 1996.
- 25 ONO, I.; GUNJI, H.; KANEKO, F.; SAITO, T.; KUBOKI, Y. Efficacy of hydroxiapatite ceramic as carrier for recombinant human bone morphogenetic protein. *J. Craniomaxillofacial Surg.* 6:238, 1995.
- 26 PAATSAMA, S.; LINDHOLM, S.; OKSANEN, J.; AXELSON, P. Die Anwendung Knochenmorphogenetischen Proteins bei verzögerter Frakturheilung, Pseudarthrose und bei wegwn ellbogengelenkerkrankungen durchegeführter Ulnasteotomie. *Tierärztl Prax* 24:168-8.
- 27 REDDI, A.H.; Regulation of cartilage and bone differentiation by morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol* 4:850, 1992
- 28 REDDI, A.H., Symbiosis of biotechnology and biomaterials: Applications in tissue engineering of bone and cartilage. *J. Cell.Biochem*, 56:192, 1994.
- 29 REDDI, A.H.; CUNNINGHAM, N.S., Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *J. Bone Miner Res*; 8 suppl 2:S499-502, 1993 Dec.
- 30 RIPAMONTI, U.; DUNEAS, N. Tissue Morphogenesis and Regeneration by Bone Morphogenetic Proteins *Plast. Rec. Surg.* 101:227 1998.
- 31 RIPAMONTI, U.; REDDI, A.H.; Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins, *J Periodontal Res*, 29:225-35, 1994.
- 32 RIPAMONTI, U.; VAN DEN HEEVER, B.; SAMPATH, T.K.; TUCKER, M.M.; RUEGER, D.C.; REDDI, A.H.; Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1, bone morphogenetic protein-7) *Growth Factors* 13:273, 1996.
- 33 RIPAMONTI, U.; YEATES, L.; VAN DEN HEEVER, B., Initiation of heterotopic osteogenesis in primates after chromatographic adsorption of osteogenin, a bone morphogenetic protein, onto porous hydroxyapatite. *Biochem Biophys Res Commun*: 193:509-17, 1993 Jun. 15.

- 34 ROSEN, V.H.; THIES, R.S. The BMP proteins in bone formation, and repair Trends Biotechnology 8:97, 1992.
- 35 SAMPATH, T.K.; MALIAKAL, J.C.; HAUSCHKA, P.V.; JONES, W.K.; SASAK, H.; TUCKER, R.F.; WHITE, K.H.; COUGHLIN, J.E.; TUCKER, M.M.; PANG, R.H.L.; CORBETT, C.; OZKAYNAK, E.; OPPERMAN, H.; RUEGER, D.C., Recombinant human osteogenic human protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblasts proliferation and differentiation in vitro. J Biol Chem 267:20352, 1992.
- 36 SAMPATH, T.K.; REDDI, A.H. Dissociative extraction of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:7599, 1981.
- 37 STEVENSON, S.; CUNNINGHAM, N.; TOTH, J.; DAVY, D.; REDDI, A.H.; The effect of osteogenin (a bone morphogenetic protein) on the formation of bone in orthotopic segmental defects in rats, J Bone Joint Surg Am; 76:1676-87, 1994
- 38 TAKAOKA, K.; YOSHIKAWA, H.; Bone Morphogenetic Protein Derived From Osteosarcoma. in Bone Morphogenetic Proteins: Biochemistry and Reconstructive Surgery, 1.996 Sanders Co. Austin, USA p.83-103.
- 39 TORIUNI, D.M.; KOTLER, H.S.; LUXENBERG, D.P.; HOLTROP, M.E.; WANG, E.A. Mandibular reconstruction with recombinant bone-inducing factor. Arch Otolaryngol Head Neck Surgery 117:1101, 1991
- 40 TRIPPEL, S.; COUTS, R.; EINHORN, T.; MUNDY, G.; ROSENFELD, R. Growth factors as therapeutic agents. J. Bone Joint Surg. 78-A:8 1272 1996.
- 41 URIST; M.R. Bone: Formation by autoinduction, Science 150:893, 1965.
- 42 URIST, M.; Bone Morphogenetic Protein in Biology and Medicine. , in Bone Morphogenetic Proteins: Biochemistry and Reconstructive Surgery, 1.996 Sanders Co. Austin, USA p.13
- 43 WANG, E.A.; ROSEN, V.; D'ALESSANDRO, J.S.; BAUDUY, M.; CORDES, P.; HARADA, T.; ISRAEL, D.I.; HEWICK, R.M.; KERNS, K.M.; LAPAN, P.; LUXEM;NBERG, D.P.; McQUAID, D.; MOUTSATOS, I.K.; NOVE, J.; WOZNEY, J.M. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2220, 1990.
- 44 WOZNEY, J.M.; ROSEN, V.; CELESTE, A.J.; MISTSOCK, L.M.; WHITTERS, M.J.; KRIZ, R.W.; HEWICK, R.M.; WANG, E.A. Novel regulation of bone formation: Molecular clones activities. Science 242:1528, 1988.
- 45 YASKO, A.W.; LANE, J.M.; FELLINGER, E.J.; ROSEN, V.; WOZNEY, J.M.; WANG, E.A., The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). J. Bone Joint Surg. 74:A:659, 1992
- 46 WIKLUND, J.H.; Bone Morphogenetic Protein and Transforming Growth Factor- $\beta$ . in Bone Morphogenetic Proteins: Biochemistry and Reconstructive Surgery, 1.996 Sanders Co. Austin, USA p.113-118.
- 47 ZEGZULA, D.; BUCK, D.; BREKKE, J.; WOZNEY, J.; HOLLINGER, J.; Bone formation with use of rhBMP-2 (Recombinant human bone morphogenetic protein-2) J. Bone Joint Surg. 79-A(12) 1778