



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

***REGENERACION OSEA EN UN DEFECTO
DIAFISARIO BAJO LA INFLUENCIA DE
BIOMATERIALES Y BMP***

TESIS DOCTORAL

Fernando García de Lucas

Madrid, Febrero, 1994

TESIS DOCTORAL

*REGENERACION OSEA EN UN DEFECTO DIAFISARIO
BAJO LA INFLUENCIA DE BIOMATERIALES Y BMP*

Realizada por:

D. FERNANDO GARCIA DE LUCAS

Dirigida por:

PROF. DR. D. LUIS LOPEZ-DURAN STERN

PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA. U.C. MADRID

JEFE DEL SERVICIO DE TRAUMATOLOGIA Y CIRUGIA ORTOPEDICA
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN CARLOS. U.C. MADRID.

PROF. DR. D. ANTONIO LOPEZ BRAVO

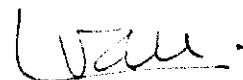
PROFESOR TITULAR DE ANATOMIA PATOLOGICA

MADRID, Febrero de 1994

**D. LUIS LOPEZ-DURAN STERN, PROFESOR TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA.
U.C. MADRID**

CERTIFICA: Que **D. FERNANDO GARCIA DE LUCAS** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación *Regeneración ósea en un defecto diafisario bajo la influencia de biomateriales y BMP*, durante los años 1990-1993. Examinado y revisado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y defensa para ser juzgado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en Madrid a diez de Febrero de 1994.



Fdo.: PROF. DR. L. LOPEZ-DURAN STERN

**D. ANTONIO LOPEZ BRAVO, PROFESOR TITULAR
DE ANATOMIA PATOLOGICA**

CERTIFICA: Que **D. FERNANDO GARCIA DE LUCAS** ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación *Regeneración ósea en un defecto diafisario bajo la influencia de biomateriales y BMP*, durante los años 1990-1993. Tras examinar dicho trabajo, considero su suficiencia para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos firmo el presente en Madrid a once de Febrero de 1994.



Fdo.: PROF. DR. A. LOPEZ BRAVO

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El Don FERNANDO GARCIA DE LUCAS viene trabajando desde hace 4 años en la línea de investigación de regeneración ósea inducida por BMP. Con anterioridad a este estudio se ha realizado otra Tesis Doctoral poniendo a punto la técnica de aislamiento de BMP. En el momento actual lo que se pretende es aunar los efectos osteoinductores de la proteína morfogenética ósea y los estructurales de los biomateriales. El objetivo del presente estudio es lograr la regeneración de un defecto óseo diafisario. En mi opinión tanto D. Fernando García de Lucas como la investigación realizada reúnen las condiciones suficientes para optar al Grado de Doctor.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

El Director de la Tesis



Fdo.: _____
(fecha y firma)

D.N.I.:

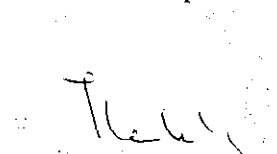
Fdo.: LUIS LOPEZ-DURAN
(fecha y firma) 10-10-93
D.N.I.: 50.268437

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral "REGENERACION DE UN DEFECTO DIAFISARIO BAJO LA INFLUENCIA DE BMP Y BIOMATERIALES", realizada por D. Fernando García de Lucas, ha sido considerada por el Consejo del Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión
Consejo Departamento
25 de octubre de 1993

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. J. L. Balibrea
(fecha y firma)

DEDICATORIA

A mi esposa e hijo

AGRADECIMIENTOS

Al **Prof. D. Luis López-Durán Stern**, Director de esta Tesis, al que debo mi interés en esta línea de investigación y sin cuyo asesoramiento no habría sido posible su desarrollo y al que agradezco mi formación como especialista en Cirugía Ortopédica y Traumatología.

Al **Prof. D. Antonio López Bravo**, Codirector de esta Tesis, por su valiosa ayuda y asesoramiento en las técnicas histológicas.

Al **Dr. José A. De Pedro Moro**, a cuya experiencia y apoyo incondicional humano y científico, debo la realización de esta Tesis.

A **Pablo Antonio González López**, Jefe de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimentales del H.U. San Carlos de Madrid, por su ayuda en los trabajos de experimentación animal.

A la **Dra. María de los Angeles Cuadrado Cenzual**, pionera de esta línea de investigación en nuestro hospital, por su asesoramiento científico en el campo de la osteoinducción.

Al **Prof. D. Julio San Román**, del Centro Nacional de Química Orgánica del CSIC, por su asesoramiento científico en el campo de los biomateriales.

A mi maestro y amigo **Dr. Antonio Sánchez-Barba**, por su apoyo durante todos estos años.

A los jefes clínicos **Dr. Joaquín Granado** y **Dr. José Alía**.

A los médicos adjuntos del Servicio de COT, Dr. Diego García Muela, Dra María Isabel Cabadas, Dr. Jaime Vargas, Dr. Antonio J. Pérez-Caballer, Dr. Rafael López-Casero, Dra. Teresa Magallón, Dr. Rafael Otero, Dr. José Rey, Dr. Enrique Galeote, Dr. Luis Izarra, Dra Dolores Gimeno, Dr. Carlos León, Dr. Fernando Marco, Dr. Felipe López-Oliva, Dr. Rafael Zarzoso y Dr. Juan C. Sánchez-Barbero, por su ayuda y colaboración en las tareas diarias hospitalarias.

A los médicos internos residentes del Servicio de COT, Dr. José Luis Tomé, Dr. Antonio García López, Dr. Juan L. Cebrián, Dr. José I. Domínguez, Dr. Gustavo García-Herrera, Dra. Belén Carsi, Dra. Carmen Gámez, Dr. Enrique Moro, Dr. Juan C. Márquez, Dra. María J. Pérez Ubeda y Dr. Alberto Francés, a los que animo a continuar en ésta u otras líneas de investigación.

A los médicos internos residentes del Servicio de Rehabilitación, Dra. Susana Muñoz Lasa, Dra. Rosa Casado, Dra. Ana Martínez Panadero, Dra. María L. Vega, Dra. Isabel Alguacil y Dr. José M. Serrano, por la colaboración recibida en urgencias y en el tratamiento rehabilitador de nuestros pacientes.

A todos los miembros del Servicio de COT y en especial al personal de quirófano por su desinteresada colaboración.

A las secretarias del Servicio de COT, Angela Durán y Carmen Durán.

Un agradecimiento especial a mis padres y hermano a los que tanto debo humana y profesionalmente.

INDICE

	<u>Pág</u>
<u>I. INTRODUCCION</u>	1
I.a.- LA ESTRUCTURA OSEA.....	5
<u>1.- Osteoblastos</u>	5
<u>2.- Osteocitos</u>	7
<u>3.- Osteoclastos</u>	8
<u>4.- Célula mesenquimal indiferenciada</u>	9
<u>5.- Sustancia fundamental</u>	9
<u>6.- Colágeno</u>	11
<u>7.- Calcificación</u>	12
<u>8.- Mineralización</u>	13
I.b.- MATRIZ OSEA DESMINERALIZADA Y OSTEOINDUCCION.....	15
I.c.- PRINCIPIO DE INDUCCION OSEA.....	22
<u>Inducción ósea heterotópica</u>	27
I.d.- LA PROTEINA MORFOGENETICA OSEA (BMP).....	28
<u>Osteoinducción y osteoconducción</u>	30
I.e.- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA BMP.....	33
<u>1.- BMP y factores de crecimiento</u>	33
<u>2.- BMP y hormonas paracrinas</u>	37
<u>3.- Cuantificación de BMP dentro de la matriz ósea</u>	39
<u>4.- BMP y regeneración ósea</u>	39
<u>5.- Caracterización bioquímica de la BMP</u>	42
<u>6.- Características bioquímicas</u>	45
<u>7.- Método de purificación</u>	49
I.f.-TEORIA MORFOGENETICA OSEA.....	51
<u>1.- Factores esenciales en la morfogénesis ósea</u>	51
<u>2.- Inducción ósea y morfogénesis</u>	51

I.g.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CAPACIDAD DE RESPUESTA A LA BMP.....	52
<u>1.- Índice de actividad metabólica.....</u>	52
<u>2.- Características de especie.....</u>	52
<u>3.- Localización del implante en las diferentes especies.....</u>	53
<u>4.- Edad.....</u>	54
<u>5.- Corticoides e inmunosupresores.....</u>	54
I.h.- LINEAS DE INVESTIGACION EN EL CAMPO DE LA OSTEOINDUCCION.....	55
<u>1.- Investigaciones clínicas y experimentales.....</u>	55
<u>2.- Situación actual de la BMP.....</u>	60
<u>3.- Biomateriales.....</u>	62
I.i.- INFLUENCIA DE LAS CITOQUINAS EN LA RESPUESTA DEL TEJIDO ESQUELETICO.....	74
<u>OBJETIVOS.....</u>	76
<u>HIPOTESIS DE TRABAJO.....</u>	77
<u>II.- MATERIAL Y METODOS.....</u>	78
II.a.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA BMP BOVINA.....	78
II.b.- ANIMAL DE EXPERIMENTACION.....	80
II.c.- PREPARACION DEL IMPLANTE	81
<u>1.- Preparación de los cilindros.....</u>	81
<u>2.- Unión de la BMP a los cilindros.....</u>	84
<u>3.- Unión de los cilindros con/ sin BMP al alambre en "omega"</u>	85
II.d.- TECNICA QUIRURGICA.....	86
II.e.- GRUPOS DE ESTUDIO.....	88

II. f.- TOMA DE MUESTRAS.....	88
II.g.- EVALUACION RADIOGRAFICA.....	89
II.h.-ESTUDIO MACROSCOPICO DE LOS IMPLANTES.....	89
II.i.- ESTUDIO MICROSCOPICO DE LOS IMPLANTES.....	90
1.- Técnica de tinción con Hematoxilina-Eosina.....	90
2.- Técnica de tinción con PAS (ácido peryódico de Schiff)...	90
<u>III.- RESULTADOS.....</u>	92
III.a.- ANALISIS MACROSCOPICO.....	92
III.b.- ESTUDIO RADIOLOGICO.....	95
III.c.- ESTUDIO DE MICROSCOPIA OPTICA.....	97
III.d.- INCIDENCIA DE INDUCCION OSEA.....	102
IV.- DISCUSION.....	106
V.- CONCLUSIONES.....	116
VI.- BIBLIOGRAFIA.....	118

INDICE DE FIGURAS

	<u>Pág.</u>
<u>Fig. 1.-</u> Teoría de Bier.....	18
<u>Fig. 2.-</u> Fotografía del Prof. Martín Lagos.....	20
<u>Fig. 3.-</u> Fotografía del Prof. Urist.....	20
<u>Fig. 4.-</u> Representación cronológica de la morfología celular	23
<u>Fig. 5.</u> Diagrama de modulación celular por ciclos mitóticos	25
<u>Fig 6.-Fenómeno</u> de inducción ósea heterotópica	29
<u>Fig. 7.-</u> Sistema de cultivo de órganos	63
<u>Fig. 8.-</u> Congelación de fragmento de diáfisis	78
<u>Fig. 9.-</u> Molino de cuchillas	79
<u>Fig. 10.-</u> Partículas óseas tras la trituración.....	79
<u>Fig. 11.-</u> Extracto de BMP liofilizado.....	80
<u>Fig. 12.-</u> Componentes del cilindro:.....	82
<u>Fig. 13.-</u> Pistola de aire caliente.....	83
<u>Fig. 14.-</u> Molde tubular de silicona incluido en un vidrio.....	83
<u>Fig. 15.-</u> Campana de vacío	84
<u>Fig. 16.-</u> Fijación del cilindro al alambre en omega.	85
<u>Fig. 17.-</u> Técnica quirúrgica.....	87
<u>Fig. 18.-</u> Grupo Control Imagen radiológica a las 12 semanas.....	95
<u>Fig. 19.-</u> Grupo BMP. Imagen radiológica a las 12 semanas.....	95
<u>Fig. 20.-</u> Grupo "Composite". Imagen radiológica a las 12 semanas..	96
<u>Fig. 21.-</u> Grupo "Composite" con BMP. Imagen radiológica.....	96
<u>Fig. 22.-</u> Grupo BMP. Osículo.....	97
<u>Fig. 23.-</u> Grupo "composite." Estructura.....	98
<u>Fig. 24.-</u> Grupo "composite"- BMP. a las 2 semanas . Estructura	99
<u>Fig. 25.-</u> Grupo "composite"-BMP a las 6 semanas. Estructura.....	100
<u>Fig. 26.-</u> Grupo "composite"-BMP a las 12 semanas. Estructura.....	101
<u>Fig. 27.-</u> Grupo "composite"-BMP a las 12 semanas. Estructura.....	101

INDICE DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
<u>TABLA I.</u> Proteínas intra y extracelulares de la matriz ósea.....	40
<u>TABLA II.</u> Proteínas estructurales no colágenas de la matriz ósea.....	43
<u>Tabla III.</u> Características bioquímicas de la BMP	47
<u>TABLA IV.</u> Inducción ósea en ratones.....	92
<u>TABLA V.</u> Inducción ósea en ratas.....	93
<u>TABLA VI.</u> Fracaso de la inducción ósea en ratas.....	94
<u>TABLA VII.</u> Evaluación de la inducción ósea en el Grupo Control.....	102
<u>TABLA VIII.</u> Evaluación de la inducción ósea en el Grupo BMP.....	103
<u>TABLA IX.</u> Evaluación inducción ósea en el Grupo "composite".....	104
<u>TABLA X.</u> Evaluación inducción ósea en el Grupo "composite"-BMP	105

INDICE DE ABREVIATURAS

BGP	Osteocalcina
BIP	Principio de Inducción ósea
hBMG	Matriz ósea humana insoluble
BMP	Proteína Morfogenética Osea
bBMP	Proteína Morfogenética Osea bovina
hBMP	Proteína Morfogenética Osea humana
rhBMP	Proteína Morfogenética Osea humana recombinada
BMP/NCP	BMP y proteínas no colágenas de la matriz ósea
CFU-F	Unidades formadoras de colonias de fibroblastos
DBP	Polvo de hueso desmineralizado
cDNA	Acido desoxirribonucleico codificado
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GuHCl	Hidrocloruro de Guanidina
HE	Hematoxilina y Eosina
HPA	Hidroxiapatita
IFN-gamma	Interferón-gamma
IL	Interleuquina
MAI	Indice de actividad metabólica
PAS	Acido peryódico de Schiff
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PG	Prostaglandinas
PGA	Acido poliglicólico
PGE	Polietilénglicol
PLA	Poliácido láctico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SO ₄ Na
TCP	Fosfato tricálcico
TGF-alfa	Factor de crecimiento transformante-alfa
TGF-beta	Factor de crecimiento transformante-beta
TNF-alfa	Factor de necrosis tisular-alfa
TNF-beta	Factor de necrosis tisular-beta

I. INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

Uno de los grandes problemas con los que se enfrenta la Cirugía Ortopédica y la Traumatología (C.O.T.) actual es la reconstrucción de grandes defectos óseos debido a lesiones secundarias a traumatismos de alta energía, desimplantaciones de las artroplastias de sustitución de los miembros y defectos tras la ablación de tumores.

El recurso clásico ha sido el empleo de autoinjertos cuya incorporación al nuevo lecho y su contribución a la osteogénesis reparadora están ampliamente probados. El principal defecto de estos injertos es el limitado volumen disponible. Las técnicas de transporte óseo descritas por Ilizarov⁹² que permiten una regeneración ósea masiva podrían considerarse como un autoinjerto dimensionado a voluntad. El inconveniente de este método es su complejidad y el largo tiempo necesario para obtener los resultados deseados, que en el niño son más fáciles de lograr que en el adulto.

Los aloinjertos óseos criopreservados constituyen otra opción en el tratamiento de los grandes defectos óseos^{39,55,62,143,223}. Gracias a la Ley de Trasplantes y a la progresiva concienciación de la población es posible disponer de una gran cantidad de huesos para injertar. Los aloinjertos en principio tienen una capacidad antigénica suficiente como para producir su rechazo cuando se emplean en fresco^{206,207}, y aún más si se hacen con un pedículo vascular que permita restablecer de forma inmediata su circulación^{54,55,62,87}. El índice de fracasos tras el uso de aloinjertos oscila entre un 10 y un 50%^{87,206}. La experimentación animal ha demostrado que este tipo de injertos masivos vascularizados debe asociarse de forma sistemática a inmunosupresión en el huésped^{43,183}. La criopreservación por debajo de los 80° C. parece eliminar de forma suficiente la antigenicidad del aloinjerto como para permitir su empleo en la clínica sin tener que recurrir a una inmunosupresión asociada^{16,206,207}.

El aloinjerto óseo criopreservado va a responder de diversas maneras en el huésped:

- El injerto de hueso esponjoso se incorpora bien a su lecho y los controles radiográficos humanos demuestran que lo hace a una velocidad cercana a la del autoinjerto cuando está sometido a solicitaciones mecánicas de compresión. Si no recibe cargas o está sometido a tensión se reabsorbe y no presenta la misma capacidad osteogénica que el autoinjerto según nuestra experiencia.
- El injerto de hueso cortical, más cuando es masivo, tiene unas características mecánicas adecuadas que pueden disminuir parcialmente durante el primer año tras su implantación y permite transmitir cargas pero tiene una capacidad limitada de incorporarse al huésped. A medida que su tamaño es mayor la incorporación es menor.

La estabilidad juega un papel fundamental en la supervivencia de los aloinjertos. La unión con la diáfisis del huésped debe ser absolutamente estable para lograr un callo reparador que una ambos extremos. El resto de la cortical del injerto sólo es invadida por el tejido vascular del huésped en sus capas más externas no consiguiendo una incorporación completa.

La irradiación de estos injertos, para lograr una esterilización absoluta, disminuye un 20% sus posibilidades mecánicas y no aumenta su capacidad de integración. La liofilización transforma sus condiciones mecánicas en inaceptables. La reabsorción masiva y la infección, así como el rechazo larvado del aloinjerto son otras complicaciones mayores de los aloinjertos.

Las prótesis masivas en sus diferentes modalidades (a medida, de serie, de alargamiento, etc.) permiten una recuperación funcional más rápida que el aloinjerto y los transportes óseos según la técnica de Ilizarov pero comparten con los primeros el riesgo de la infección. El espacio ocupado por la prótesis no se rellena con hueso y si fracasa, el defecto

suma el espacio previo de la prótesis más la lesión que haya producido ésta en su lecho de implantación. El tercer inconveniente es su falta de anclaje definitivo en el hueso que junto a la problemática propia a todas las prótesis hay que sumar las condiciones mecánicas propias de estos diseños masivos.

Surge así la búsqueda de un camino alternativo para conseguir la *regeneración ósea completa en el área lesionada sin tener que recurrir a dispositivos externos tan complejos como los de la técnica de Ilizarov*. La importancia de poder contar con una posibilidad biológica para regenerar grandes defectos óseos ha dado lugar a numerosos experimentos^{58,95,96,102,105,109,120,163,217,218,228,270,275,279,280}, y aunque los resultados han sido satisfactorios, aún queda por descubrir el auténtico sustituto ideal del injerto óseo autólogo.

Desde que en 1967, Urist²³³ definió el "principio de inducción ósea", numerosos estudios de investigación han estado enfocados a descubrir cuál o cuáles son los factores que inician la osteoinducción. En 1971, Urist²⁴³ descubre un conglomerado de proteínas no colágenas de la matriz ósea que tienen la capacidad de actuar sobre las células mesenquimales indiferenciadas y transformarlas en osteoblastos capaces de formar hueso; a este grupo de proteínas le denominó BMP (Proteína Morfogenética Osea).

El proceso de obtención de la BMP a partir de hueso cortical bovino fué el objeto de la Tesis Doctoral realizada por la Dra. María Angeles Cuadrado Cenzual³⁵ que demostró cómo se producía hueso ectópico en ratones y en defectos óseos creados en el fémur de ratas mediante osteoinducción por BMP de las células mesenquimales pero sin llegar a producir la regeneración de éste.

Numerosos biomateriales han sido y son tema de estudio en el campo de la C.O.T. (materiales acrílicos, resinas epoxídicas, fluorocarbonos, poliamidas, poliésteres, polietilenos, polipropilenos,

policloruro de vinilo, siliconas, poliuretanos, ácido glicólico, poliácido láctico y cerámicas óseas).

Se han realizado numerosos experimentos para conocer la talla de los defectos óseos irreparables. Urist²⁶² estimó que un defecto óseo craneal de un diámetro crítico oscilaba entre 1.4 y 2 cm. en un perro Mongrel adulto. Segal y col. en 1979¹⁹⁹ estimaron que el defecto óseo en el fémur de una rata Wistar sería irreparable cuando fuera de un tamaño aproximado de 1.5 cm. y, Köhler y col. en 1987¹¹⁸ consideraron que el defecto óseo en el cúbito de un conejo New Zeland debía ser de un tercio de su longitud total.

I.a.- LA ESTRUCTURA OSEA

El tejido óseo, como tejido conjuntivo, aparece formado a partir de unas células mesenquimales llamadas osteoblastos que se rodean de una sustancia fundamental rica en fibras colágenas denominada osteoide, que al calcificarse se transforma en tejido óseo e incluye en su interior a los osteoblastos, que se convierten así en osteocitos, células estrelladas con prolongaciones que, a través de los canalículos abiertos en la sustancia fundamental mineralizada, comunican unos con otros estableciendo contactos entre sí, con los osteoblastos de la superficie, así como, con los vasos encargados de nutrir estas células que aparecen a intervalos regulares. En otros puntos, el tejido óseo es reabsorbido por células denominadas osteoclastos, que actúan originando unas zonas líticas de contornos nítidos conocidas como lagunas de Howship.

Ante una lesión, especialmente en individuos jóvenes, el tejido óseo se regenera sin cicatriz, con una reconstrucción completa e impecable. Además, el hueso es capaz de desarrollarse "de novo" en lugares localizados fuera del esqueleto, por diferenciación de células mesenquimales indiferenciadas, bajo la influencia de ciertos componentes de la matriz ósea^{152,218,257,274,275,279}.

Consideraremos cada uno de los componentes del tejido óseo, describiendo las particularidades histológicas y funcionales de ellos.

1.- Osteoblastos

Se consideran como tales, aquellas células activas, formadoras de tejido óseo, capaces de producir colágeno y de calcificarlo. Aunque Goosir, Tomes y Morgan y Müller habían descrito antes estas células, fué Gegenbauer en 1864 quién consideró las células del periostio como las

productoras de hueso, y por tanto, responsables de la reparación ósea llamándolas osteoblastos¹⁷¹.

El tamaño medio oscila entre las 20 y las 30 μ de diámetro. Aparecen sobre las superficies donde se forma hueso. Presentan un aspecto prismático y piriforme con uniones entre ellas de forma discontinua adoptando una disposición seudoepitelial. El núcleo en las zonas de formación activa de tejido óseo se encuentra alejado de esta superficie, cerca de la cual aparece un gran retículo endoplasmático rugoso (RER) y entre estas estructuras se localiza un aparato de Golgi muy desarrollado. Las mitocondrias en número no excesivo disminuyen cuando la célula se transforma en osteocito y se acumulan en la periferia celular. La presencia de microtubos y microfilamentos en el citoplasma está en relación con el transporte de productos del aparato de Golgi al exterior de la célula y en concreto con el transporte de procolágeno a la matriz extracelular²⁷⁶.

El citoplasma muestra una marcada basofilia que es más intensa en las células en actividad y desaparece en las células en reposo que no están en fase de síntesis, así como en los osteocitos. La basofilia indica una intensa actividad del ácido ribonucleico (ARN), que se pierde si se trata el hueso con ribo-nucleasas, situado en los ribosomas del RER y es índice de una elevada síntesis proteica.

Los trabajos de Scott¹⁹⁸, con timidina tritiada, demuestran que los osteoblastos no se dividen, sino que proceden de otras células precursoras denominadas preosteoblastos, que según Manabe¹⁴² muestran una actividad divisoria al margen de la célula mesenquimal indiferenciada que es el origen de todas las células del hueso a excepción del osteoclasto^{69,131}.

2.- Osteocitos

Son las células derivadas de los osteoblastos una vez que quedan englobados en la sustancia fundamental calcificada, donde sufren una serie de transformaciones morfológicas y funcionales. Su frecuencia varía de unas áreas a otras debido a la intensidad de la actividad osteoblástica que varía de unas zonas a otras. Así, en el hueso embrionario aparece un mayor número de osteocitos con una distribución irregular, en tanto que, en el hueso laminar adulto hay menos y están mejor ordenados en su distribución, son más alargados y tienen más prolongaciones citoplasmáticas.

El osteocito tiene una actividad tanto lítica como formadora de tejido óseo, al margen de que puede degenerar y morir como ha demostrado Frost⁵⁷. Existen unos osteocitos con verdadera desintegración del núcleo, vacuolas autofágicas celulares e incluso lisis celular; todo ello índice de una verdadera muerte celular y que se localizan en las zonas más alejadas de los capilares; por tanto, podría considerarse la muerte osteocitaria consecuencia de la isquemia. Frente a este tipo de células, están los osteocitos sanos que a los 8 minutos de la administración de calcitonina se retraen conservando el núcleo y el resto de las estructuras celulares en buenas condiciones; es un estado transitorio, ya que, estas células recuperan su morfología normal al cabo de dos horas.

Cuando el osteoblasto queda incluido en la fase mineral y se transforma en osteocito, pierde volumen y emite prolongaciones citoplasmáticas laterales, además de las que ya presentaba como osteoblasto. Prolongaciones que se introducen en los canalículos de la sustancia fundamental mineralizada, poniendo en contacto unos osteocitos con otros y con las células superficiales.

El núcleo de los osteocitos es grande. El RER está menos desarrollado que en los osteoblastos pero sigue mostrando un citoplasma de carácter basófilo. El aparato de Golgi y las mitocondrias ocupan el mismo puesto que en el osteoblasto, pero estas últimas en menor

número. Aparecen, en mayor o menor número, vesículas lisosómicas que se acompañan de la demostración histoquímica de fosfatasa ácida y otros enzimas proteolíticos (todo ello índice de la actividad lítica de estas células). Ninguno de estas organelas celulares penetra en las prolongaciones citoplasmáticas que se distribuyen por los canalículos óseos⁶⁹.

3.- Osteoclastos

Aunque su existencia y posible función ya se conocían previamente, fue Kölliker en 1873 quien los denominó "ostoklast" pero que actualmente, y siguiendo la terminología francesa, son conocidos como osteoclastos.

Son, en general, células grandes multinucleadas que se encuentran directamente en contacto con el hueso y están encargadas de la reabsorción ósea. Su morfología es variable, unas veces son oval-esféricas como aparecen en las indentaciones que dejan en el tejido óseo conocidas como lagunas de Howship y otras veces están aplanadas sobre el hueso.

En relación a su tamaño, volumen y número de núcleos hay grandes variaciones. Desde los que miden de 85 á 100 μ de diámetro hasta las formas mononucleares más pequeñas. En general, en el hombre adulto, presentan de 2 a 6 núcleos por célula. No se observan mitosis y se cree que, al igual que las células gigantes de cuerpo extraño, se desarrollan como resultado de fusión de células, en este caso procedentes de la médula ósea. El citoplasma presenta en unas ocasiones caracteres tintoriales basófilos y en otras acidófilos, pero sin un predominio tintorial especial, que varía con la actividad funcional de los mismos. Perpendicular a la superficie ósea, la membrana celular presenta unos repliegues y prolongaciones digitales que le dan un aspecto de cepillo que está especializado en la reabsorción ósea. El citoplasma adyacente a este borde rugoso se encuentra generalmente libre de organelas (zona clara de Cameron). Las mitocondrias son muy abundantes y aparecen distribuidas

en todo el citoplasma salvo en la zona inmediata al borde en cepillo. El RER más o menos desarrollado según las células, nunca alcanza las dimensiones y complejidad que presenta en los osteoblastos. El aparato de Golgi ocupa un gran volumen celular y aparece reunido en grupos de membranas de 5 sacos cada uno, que se agrupan en torno a los núcleos. Distribuidos por el citoplasma se encuentran numerosos lisosomas y vacuolas, en ambas estructuras se ha demostrado la presencia de fosfatasa ácida y serían índice de procesos de reabsorción^{69,131}.

4.- Célula mesenquimal indiferenciada

Se encuentran en las superficies endóstica y perióstica y van a ser el origen de todos los tipos celulares óseos con la única excepción del osteoclasto¹⁴².

Desde un punto de vista ultraestructural, son células poligonales o ramificadas que se encuentran de forma libre en la matriz de colágeno y raramente presentan comunicaciones con las células vecinas. El núcleo y las mitocondrias no presentan ninguna característica especial. El RER y el aparato de Golgi están muy desarrollados⁶⁹.

5.- Sustancia fundamental

Las sustancia fundamental del tejido conjuntivo corresponde al material amorfo interfibrilar situado en el compartimento extracelular. En el caso del tejido óseo se denomina matriz orgánica u osteoide y son los osteoblastos los encargados de sintetizarla así como las fibras de colágeno que en ella se encuentran.

La sustancia fundamental del tejido óseo está formada por mucopolisacáridos ácidos (grupo de heteropolisacáridos que contienen dos tipos de unidades de monosacáridos alternantes de los cuales uno por lo menos posee un grupo ácido de tipo carboxílico o sulfúrico). Cuando

aparecen en forma de complejos con proteínas específicas se denominan mucinas o mucoproteínas, existen dos tipos: proteoglicanos o glicosaminoglicanos y glicoproteínas. La matriz orgánica representa, según Herring⁷⁶, entre el 22.7 y el 23.9% de su peso global seco. También contiene otros componentes en mucha menor cantidad como proteínas no colágenas y lípidos que constituyen un 0.035-0.067% del peso total óseo.

En el tejido óseo encontramos cuatro tipos de mucopolisacáridos ácidos:

Condrotin 4-sulfato: unidad repetitiva (ácido glucurónico-N-acetilgalactosamina).

Condrotin 6-sulfato: unidad repetitiva (ácido glucurónico-N-acetilgalactosamina).

Acido hialurónico: unidad repetitiva (ácido glucurónico-N-acetilglucosamina).

Keratán sulfato: unidad repetitiva (galactosa-N-acetilglucosamina).

Los proteoglicanos son polímeros constituidos por cadenas lineales que contienen una unidad básica repetitiva constituida generalmente por una hexosamina (hexosa que por reacción con una amina da lugar a un producto con un grupo amino unido a uno de sus carbonos mediante un enlace N-glucosilamino) y un ácido urónico (resultado de la oxidación del carbono portador del grupo hidroxilo primario que se transforma en un grupo carboxilo) y se unen mediante un enlace covalente al aminoácido terminal de una proteína.

Las glicoproteínas se diferencian de los proteoglicanos en que no se repite en su estructura la unidad disacárida de forma tan regular y los polisacáridos tienen cadenas más cortas entrando a formar parte de ellas un elevado número de monosacáridos distintos como glucosamina, galactosamina, galactosa, manosa, fucosa y ácido siálico. Parece que la cantidad de glicoproteínas disminuye a medida que el hueso se calcifica, con máximo en el osteoide y un mínimo en el hueso cortical adulto^{69,131}.

6.- Colágeno

Como señaló Rouiller¹⁸⁴ los tejidos conjuntivos derivan del mesodermo embrionario y se dividen en cuatro tipos: el tejido conjuntivo propiamente dicho, el tejido cartilaginoso, el tejido óseo y el tejido hematopoyético. Por tanto, el tejido óseo es un tejido conjuntivo con la particularidad de tener su sustancia fundamental calcificada. En todos los tejidos conjuntivos el componente fundamental de la sustancia intercelular es la fibra colágena. Su concentración en la matriz orgánica del tejido óseo ha sido revisada por Herring⁷⁶ y oscila alrededor del 80% de ésta.

Los aminoácidos que forman la fibra de colágeno varían de unas especies a otras; pero dentro de una misma especie la composición en los diferentes tejidos es bastante constante.

Los osteoblastos son células secretorias y su citoplasma, como podría esperarse, se caracteriza por un desarrollo amplio del retículo endoplásmico rugoso (RER) y del aparato de Golgi; su estructura no difiere de manera importante de la de los fibroblastos. De hecho Weinstock y Leblond en 1974²⁷⁷ demostraron que la síntesis y secreción de procolágeno en los osteoblastos del hueso alveolar de la rata es la misma que la realizada por los fibroblastos. En 1987, Robey y col.¹⁸⁰ observaron como el TGF-beta estimulaba la proliferación y la síntesis de colágeno por osteoblastos.

El colágeno en el hueso es predominantemente del Tipo I ^{17,79} mientras que el colágeno del cartilago calcificado es una mezcla de colágenos Tipos II, IX y X^{17,153,272}.

7.- Calcificación

Si consideramos el hueso como un órgano de depósito mineral, sus células tendrán como misión específica la acumulación extracelular del fosfato cálcico formado en las mitocondrias y en el retículo endoplasmático, así como la reabsorción de estos depósitos para mantener el nivel plasmático de calcio y fósforo.

Los primeros estudios seriados de mineralización, realizados en el cartílago de crecimiento, han sido aportados por Bonucci^{14,15} y Anderson² en 1969 demostrando que se hace en tres fases:

1ª fase intracelular

2ª paso del mineral a la sustancia fundamental

3ª unión del mineral al colágeno

Los mucopolisacáridos tienen una acción doble, favorecedora e inhibidora de la calcificación. Bonucci¹⁵ defiende que el núcleo del cristal de fosfato cálcico puede ser un mucopolisacárido. Dziewiatowski⁴⁰ con S-35 demuestra que la presencia de mucopolisacáridos es máxima en la zona del cartílago proliferante y de los grandes condrocitos, para disminuir en la zona de calcificación provisional y en las metafisis, por tanto los mucopolisacáridos deben desaparecer antes del comienzo de la calcificación.

Los estudios de Francis y Fleisch^{50,51} señalan que el pirofosfato a las concentraciones normales encontradas en el hueso, en el cartílago y en el osteoide, no inhibe la mineralización sino el crecimiento del cristal y la transformación del fosfato cálcico amorfo en sus formas cristalinas. Esta función inhibitoria se elimina por la acción de las fosfatasas alcalinas.

Por último, hemos de señalar un concepto, de largo tiempo conocido. Los depósitos de calcio en el osteoide ocupan volumen, para lo cual deben desplazar algún elemento previamente existente. Robinson¹⁸² demostró que las moléculas desplazadas son las de agua, que disminuye a

medida que aumenta la calcificación, de forma que el contenido en agua de los huesos totalmente calcificados es muy pequeña.

8.- Mineralización

Según Glimcher⁵⁹ el fosfato cálcico extracelular, con una estructura amorfa, se deposita directamente sobre las fibras de colágeno adoptando una estructura cristalina con un cambio en el pH, que indica que esta nueva estructura es más básica.

Estos cristales tienen una longitud media según Robinson de 500Å^{181} , su eje mayor se orienta a lo largo de la fibra de colágeno de acuerdo a la estriación de ésta, de forma que cada cuatro gránulos de mineral corresponden a una banda o estria de la fibra, y al reunirse terminan por enmascararla. Los cristales, al crecer, forman grandes agregados que mantienen el diámetro del cristal, aumentando su longitud a lo largo de la fibra de colágeno y alcanzan dimensiones de 3000 y 4000Å.

Los análisis químicos del mineral han dado lugar a muy diversas teorías sobre su estructura y composición hasta la demostración morfológica y química de dos fases minerales diferentes.

Los componentes fundamentales de la fase mineral son los iones calcio, fosfato, carbonato y agua que se combinan para formar un fosfato cálcico complejo. Engström⁴⁶ observó que la relación molar Ca/P más frecuentemente encontrada era 1.667 pudiendo variar entre 2 y 1.4 de acuerdo al tamaño del cristal y al ión carbonatado incluido. Dallemagne³⁶ encontraba por el contrario una relación Ca/P preponderante de 2.26.

En consecuencia con ello, cada uno de los autores propuso una estructura química diferente para el mineral óseo. Engström afirmaba que se trataba de una hidroxioapatita derivada cristalográficamente de la flúorapatita por sustitución del radical flúor por radicales hidroxilos, cuya

fórmula es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Dallemagne proponía un fosfato tricálcico hidratado con fórmula $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6\text{H}_2(\text{OH})_2$; este cristal óseo, frente a la flúorapatita, perdía un átomo de calcio, que era sustituido por una molécula de agua, originando así una apatita defectuosa.

En un principio no se podían compaginar ambas teorías por falta de datos morfológicos y análisis cualitativos más finos. Al demostrarse por un lado, con el microscopio electrónico, una variación en el aspecto del depósito mineral, y al estudiar, por otro, las variaciones de la relación Ca/P según las diferentes zonas del hueso, que con la microradiografía mostraban diferentes grados de mineralización, se pudo afirmar que el primer depósito mineral se hace en forma de fosfato tricálcico de estructura amorfa, que en contacto con el colágeno y al cabo de un tiempo se transforma en hidroxiapatita, lo que no hace nunca totalmente, ya que, en el esqueleto adulto hasta un 30% del mineral permanece en forma amorfa.

La falta de cristalización completa y el crecimiento limitado de los cristales se debe a la presencia en la matriz de una serie de factores no bien conocidos. El ión magnesio "in vitro" impide la transformación del fosfato tricálcico en hidroxiapatita, pero su concentración en los tejidos es insuficiente. Los polianiones y el anión carbonato tienen la misma función y los pirofosfatos son los elementos principales en la inhibición del crecimiento cristalino, como ya dijimos al hablar de la calcificación.

Boskey en 1992¹⁷ analiza las interacciones entre la matriz ósea y la mineralización en la regulación del proceso de formación de hidroxiapatita en los huesos y en los dientes. En los tejidos mineralizados, abundantes macromoléculas aniónicas se unen al mineral y por medio de esta unión son capaces de regular la forma y el tamaño de los cristales minerales y determinar el lugar para la cristalización inicial. El colágeno proporciona el soporte estructural para que los cristales de hidroxiapatita comiencen a formarse en los huecos y en las zonas de superposición de estas fibras y se produzca el crecimiento de éstos de forma paralela a las fibras de colágeno. Las proteínas no colágenas de la

matriz ósea tienen una gran afinidad por la hidroxiapatita y afectan la mineralización "in vitro" aumentando o inhibiendo la formación y el crecimiento de los cristales, dependiendo de la concentración y si se encuentran en forma libre o no.

I.b.- MATRIZ OSEA DESMINERALIZADA Y OSTEOINDUCCION

Estudios experimentales sobre los factores locales bioquímicos de regeneración e inducción ósea han sido objeto de investigación desde la antigüedad. La mayor parte de los conocimientos que tenemos actualmente se han obtenido a partir de experimentos realizados en conejos, cerdos, ratas, perros y ratones.

La verdadera controversia sobre los méritos de la matriz ósea descalcificada como sustituto del autoinjerto comenzó a finales del siglo XIX.

Sir Arthur Keith en el año 1919¹¹⁵ resumió en su obra las notas recogidas de la literatura en el siglo XIX y principios del XX. El estudio del fenómeno de inducción ósea tuvo sus orígenes en 1889 con la utilización de matriz ósea desmineralizada. En ese año, Senn²⁰⁰ implantó de forma xenogénica huesos bovinos desmineralizados con ácido muriático (como vehículo para la administración de antisépticos) en 10 pacientes con osteomielitis y en 14 perros con defectos óseos en el cráneo, informando de un inequívoco aumento de la reparación ósea y considerando a la matriz como un buen soporte para el crecimiento óseo. Senn no pudo observar ningún tipo de respuesta osteoinductiva o morfogenética de una forma ostensible ya que a pesar de haber implantado matriz ósea desmineralizada no evaluó la actividad ósea extraesquelética. Por otra parte Senn utilizó la matriz ósea desmineralizada no como sustituto del injerto óseo sino como un vehículo o soporte para el depósito de antisépticos como el yodoformo. Además, la respuesta tampoco pudo ser de gran intensidad ya que la matriz ósea xenogénica produce una escasa

respuesta osteoinductiva en perros y en humanos debido a una inhibición de la diferenciación celular mesenquimal hacia hueso, mediada por los linfocitos, células reticulares y macrófagos²⁴⁶.

A partir de este momento surgieron publicaciones con observaciones muy positivas como las de Deaver en 1889³⁷ y Mackie¹³⁹ en 1890 así como publicaciones mostrando auténticos fracasos realizados por eminencias como Bier en 1892¹¹ y Schmitt en 1893¹⁹⁴. Comenzó así la verdadera controversia sobre los méritos de la utilización de la matriz ósea desmineralizada como sustituto del injerto óseo autólogo.

Esta línea de investigación alcanzó su estado de más completa confusión cuando dos de los más importantes cirujanos de la época, Mickulicz¹⁴⁷ y Kuemmel¹²², publicaron tanto buenos como malos resultados. Con el fin de explicar estos hallazgos tan variables en la clínica, se realizaron observaciones experimentales rellenando defectos óseos con matriz desmineralizada en perros, conejos y ratas^{139,194}. Desafortunadamente los experimentos se realizaron con ligeras variantes según el investigador, empleando diferentes soluciones para la descalcificación y, como era de esperar, no pudo llegarse a una normalización de sus resultados.

Miller en 1890¹⁴⁸, que trabajaba en el hospital de Senn, corroboró las observaciones clínicas de este autor en relación con los implantes de matriz ósea en pacientes osteomielíticos, pero no repitió el trabajo experimental en perros. Barth en 1895⁶ y Schmitt en 1893¹⁹⁴, sin embargo, repitieron tanto los trabajos clínicos como los experimentales de Senn²⁰⁰ pero fueron incapaces de confirmar sus hallazgos. En ese momento y debido a los resultados desalentadores se abandonó durante aproximadamente medio siglo el uso de matriz ósea desmineralizada para la reparación de defectos óseos.

A partir de la segunda década de 1900 se vuelve a demostrar un gran interés en el campo de la inducción ósea. Bier¹², Leriche y Policard^{124,125} se dedicaron al estudio del origen de la misma negando la

necesidad de intervención de células específicas y con ello inauguraron una nueva era en el concepto de la regeneración tisular.

Bier¹² afirmó que para la formación del tejido óseo no era necesario la intervención de una célula ósea específica u osteoblasto, sino que las células que constituían el sincitio del tejido conjuntivo en su fase embrionaria eran pluripotenciales y por tanto, capaces de originar los más diversos tejidos procedentes de la misma hoja embrionaria, cuando a ello son inducidas por determinadas sustancias, "hormonas de Bier", y además se añaden ciertas condiciones del medio, Fig.1.

Leriche y Policard^{124,125}, en 1926 y en 1928, llegaron mucho más lejos al negar que en la formación del tejido óseo tomara parte activa no solo el osteoblasto, sino cualquier célula. Para estos autores, el fenómeno inicial de la formación ósea estaría en la transformación físicoquímica de la sustancia fundamental que sufriría una infiltración edematosa con disgregación de sus fibrillas y precipitación de sales de calcio.

Ambas teorías fueron admitidas por la mayor parte de los clínicos e incluso de los histólogos, pero estaban fundadas únicamente en interpretaciones meramente especulativas.

En favor de la teoría de Bier sobre la influencia de una hormona o inductor que encauce a las células embrionarias a su transformación, aparecieron los trabajos de Levander¹²⁶ y Annersten³. Levander en 1938 observó como la inyección de extractos alcohólicos autólogos de tejido óseo provocaba la inducción de hueso mientras que con la inyección de alcohol no obtuvo ningún resultado. En 1941, Annersten trató de comprobar la experiencia de Levander y clarificar qué componente del extracto era el que influía en la inducción ósea. En cuanto a la naturaleza química del extracto, este autor sostuvo que era soluble en los disolventes de las grasas y que probablemente sería análogo a un esteroide y lo denominó "sustancia inductiva".

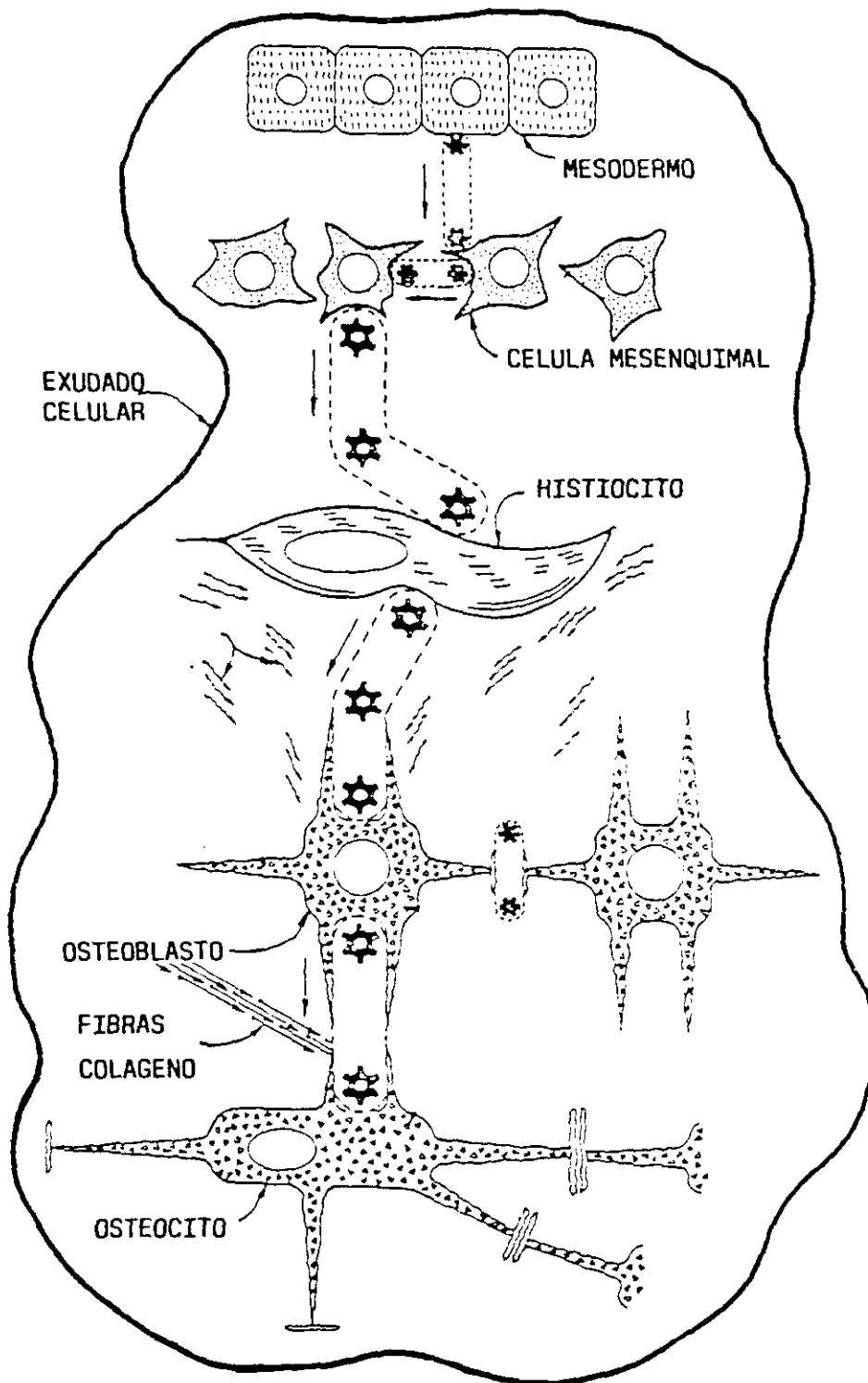


Fig. 1.- Teoria de Bier sobre el proceso de inducción ósea. Representación gráfica de la continuidad de la interacción inductiva a partir de las células del mesodermo primitivo, a células mesenquimales con capacidad de diferenciarse en células especializadas óseas^{35,235}.

Aunque a nivel de la literatura internacional no existió una gran divulgación de los trabajos del Prof. Martín Lagos, este autor en 1946 publicó en nuestro país una serie de minuciosos artículos^{133,144,145} sobre la inducción ósea. Realizaba una inyección de extractos alcohólicos de hueso autólogo en el músculo recto anterior de conejos, con el fin de dilucidar hasta que punto podía influir en la formación de hueso heterotópico la presencia de este extracto. Tras analizar los resultados, lanzó la hipótesis de que el hueso se inducía a partir de células mesenquimales con potencial óseo prospectivo. Estas células permanecerían indiferentes hasta que el medio en el que se encuentran se modificara obteniendo condiciones favorables para su desarrollo evolutivo, Fig.2.

Es en estos años, cuando surgió la duda de cómo podría determinarse si la formación ósea, tras el trasplante de un tejido, era debida a proliferación y actividad osteogénica de las células trasplantadas, o si bien, eran las células del huésped, por la inducción del tejido trasplantado, las responsables de la aparición del nuevo hueso. Urist en 1952²²⁹ sugirió una escala en la que pudiera observarse la probabilidad de que uno o ambos mecanismos estuvieran actuando simultáneamente, Fig. 3.

En 1957, Ray y Holloway¹⁷⁴ y en 1963, Hejna y Ray⁷⁵ publicaron trabajos en los que demostraban un aumento de reparación ósea en los defectos craneales de rata que se rellenaban con matriz alogénica desmineralizada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), pero asumieron que este proceso reparativo era solamente una extensión del crecimiento óseo a partir del borde de la lesión. No realizaron una evaluación de la actividad inductiva de las partes blandas y rechazaron el concepto de nueva formación ósea por inducción. Chalmers y Sissons en 1959³¹, utilizando como animales de experimentación conejos y perros, fueron incapaces de observar un aumento del crecimiento óseo o de



Al Sr. Secretario de Instrucción de la Universidad
 de Chile, Santiago, Chile, para que se
 presente a la Comisión de la Universidad
 de Chile, en el mes de agosto de 1962.
 D. Lagos

Fig. 2.- Fotografía del *Prof. Martín Lagos* tomada en el año 1962.

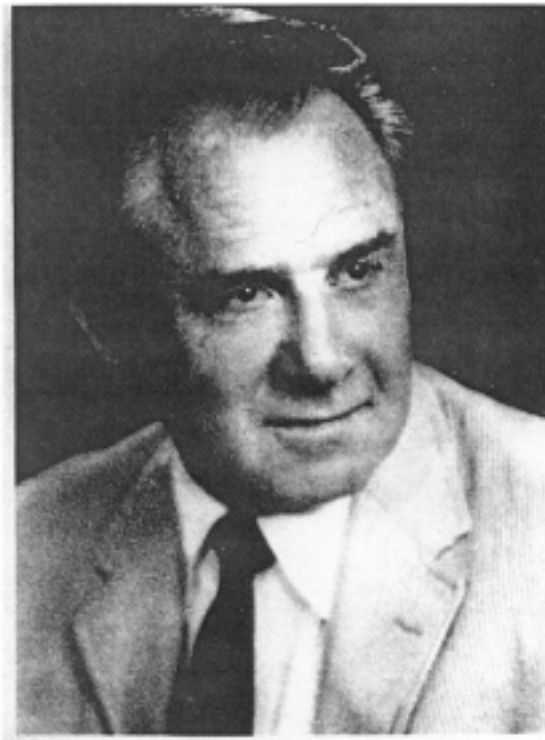


Fig. 3.- Fotografía del *Prof. Marshall R. Urist* tomada en el año 1965.

inducción ósea mediante implantes de matriz ósea desmineralizada con EDTA.

Sharrad y Collins en 1961²⁰¹ publicaron un informe preliminar sobre el uso de aloinjertos óseos desmineralizados con EDTA en las fusiones vertebrales de tres niños con escoliosis, pero no presentaron los resultados del seguimiento y control de estos pacientes. Irving y col. en 1968⁹³ realizaron estudios con matriz ósea desmineralizada con EDTA, pero también fracasaron en su intento de demostrar inducción ósea.

¿Por qué los implantes óseos desmineralizados con EDTA a un pH relativamente próximo a las condiciones fisiológicas (pH 7.2-7.4) no inducían formación ósea y sí lo hacían los implantes desmineralizados con HCl a bajo pH? ¿Por qué fueron rechazados los trabajos de Senn y col.? ¿Es que no hubo una visión de reparación de los defectos óseos a partir de la matriz implantada por Senn en 1889²⁰⁰?. Existen varias respuestas posibles a estas preguntas:

- Puede que la matriz esté desmineralizada de forma adecuada pero que fuera implantada en un defecto óseo con una talla menor a la crítica, regenerándose así principalmente por proliferación de células osteoprogenitoras preexistentes en el lecho del huésped enmascarando los depósitos de hueso desarrollados a partir de la matriz ósea implantada²³⁰.

- Puede que la matriz implantada no sea adecuada (por ejemplo, matriz degradada por las proteasas activadas por EDTA), y aunque el huésped sea adecuado, no exista inducción ósea²³¹.

- La matriz puede ser adecuada (hueso desmineralizado con HCl), pero ser implantada en especies inadecuadas en las que hay una fase de reposo o silente asociada a factores desconocidos y posiblemente supresores de la respuesta osteoinductiva.

Ninguno de los estudios llevados a cabo posteriormente presentaron resultados positivos en relación con esta línea de investigación hasta que en 1965, Urist²³² presentó la primera demostración inequívoca de formación ósea matriz-inducida, implantando matriz ósea alogénica desmineralizada con HCl en el músculo de ratas y conejos. En estos animales se pudo apreciar la evidencia indiscutible de nueva formación ósea por inducción. Este material también se implantó en defectos craneales en cobayas, con resultados positivos²⁵⁸. Urist implantaba la matriz ósea desmineralizada y sospechaba que esta matriz servía como superficie para la migración, interacción y proliferación de las nuevas poblaciones celulares. También pensó que la matriz ósea inducía la síntesis de una enzima específica para la rotura de las uniones covalentes de la estructura del colágeno. Posteriormente, descartaría estas teorías^{237,239} Fig. 4.

I.c.- PRINCIPIO DE INDUCCION OSEA

En 1967, Urist definió el principio de inducción ósea como un sistema de inducción embrionaria compuesto por células inductoras y células respondedoras inclinándose por la teoría de Bier. La célula respondedora sería una célula mesenquimal indiferenciada que se convertiría en una célula inducida cuando se diferenciase en osteoblasto, condroblasto o hemocitoblasto²³³. A pesar de estos avances, persistía el mismo interrogante: ¿qué componente de la matriz ósea desmineralizada es el que producía el estímulo para que aconteciera el fenómeno de inducción ósea?²⁴². Esta pregunta obsesionaría a Urist durante un largo período de tiempo, dirigiendo todas sus investigaciones hacia la búsqueda y caracterización de dicho componente.

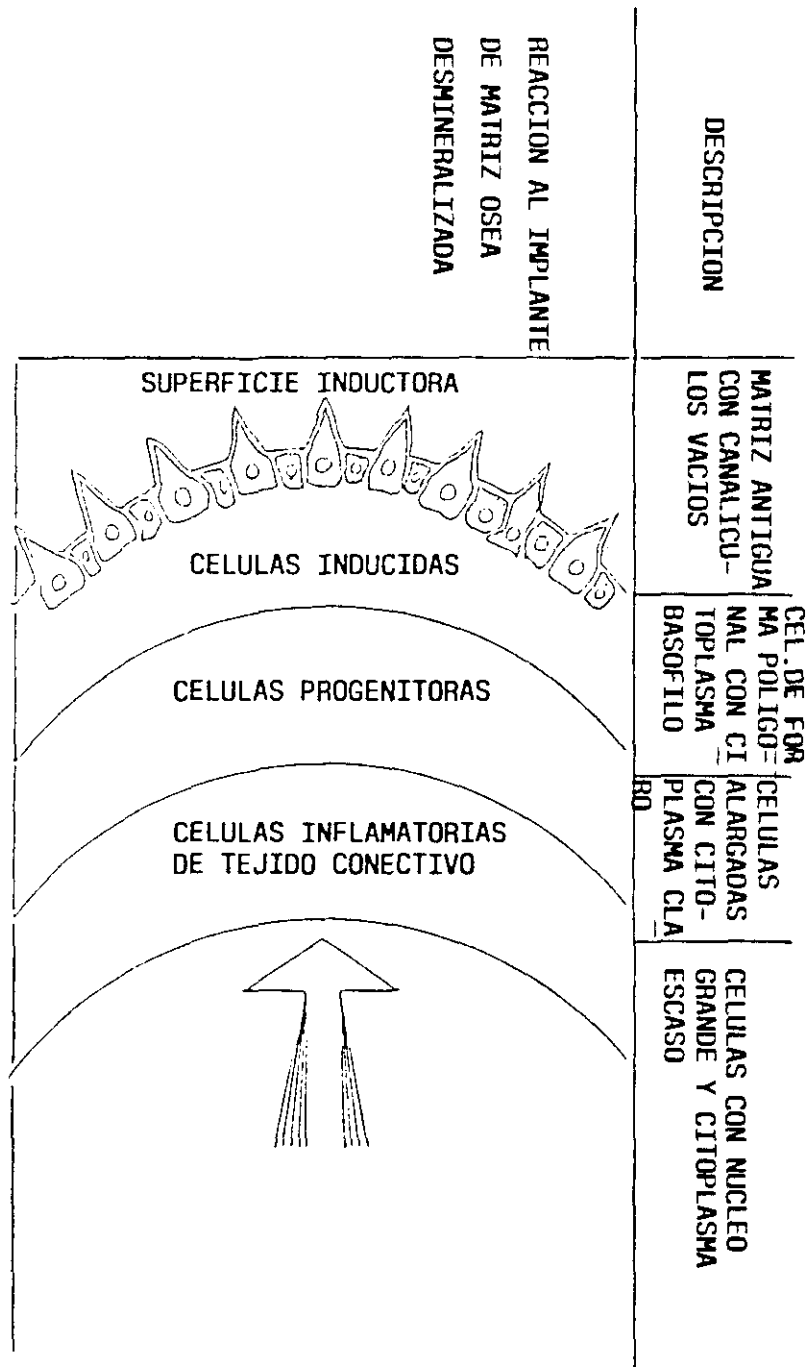


Fig. 4.- Representación cronológica de la morfología celular que se presenta al transmitir el principio de inducción ósea mediante el implante de matriz ósea desmineralizada^{35,233}.

Urist y col.²³³ en 1967 presentó varias observaciones sobre el desarrollo del sistema de inducción ósea. Urist denominó a la entidad que da lugar a la osteogénesis como "principio de inducción ósea" (BIP) y sugirió que el desencadenante de este principio sería una macromolécula proteica que se uniría a la superficie de las células mesenquimales indiferenciadas^{49,233}. Se sospechó que el inicio sería la interacción de los productos extracelulares de las células mesenquimales y la superficie de la matriz ósea implantada. Basándose en el concepto de interacciones mutuas, Urist lanzó la hipótesis de que el genoma sería el mecanismo de control intrínseco para la especialización celular y que el principio de inducción ósea sería el mecanismo de control extrínseco para la histogénesis y la morfogénesis del hueso^{240,241}. Así, la reacción osteogénica se produciría por una población celular preparada por una serie de modulaciones preliminares y de divisiones mitóticas, Fig. 5.

En los años siguientes no pudo hallarse ninguna prueba que sugiriera que un componente difusible de la matriz ósea fuera el responsable de la morfogénesis ósea. Consecuentemente, la estructura sólida de la matriz, se denominó en principio "sustrato inductivo"²³⁹ y con posterioridad "sustrato morfogenético" con el fin de enfatizar que la estructura sólida es la que conduce a la morfogénesis. Observaciones químicas y de microscopía electrónica sugirieron que la compleja estructura tridimensional del tejido óseo era la que imponía un patrón morfogenético óseo a las células mesenquimales, ¿cómo lo hacía? era un misterio.

En esta misma línea de trabajo, Goldhaber⁶³ observó como el tejido óseo vivo era capaz de inducir formación ósea transmembrana, trasplantando células fetales de la bóveda craneal incluidas en cámaras de difusión en un huésped alogénico. Miyamoto y col.¹⁵¹ en 1993 demostraron la producción de hueso a partir de cámaras de difusión, que contenían proteína morfogenética ósea (BMP) obtenida de osteosarcoma de ratón, implantadas en monos.

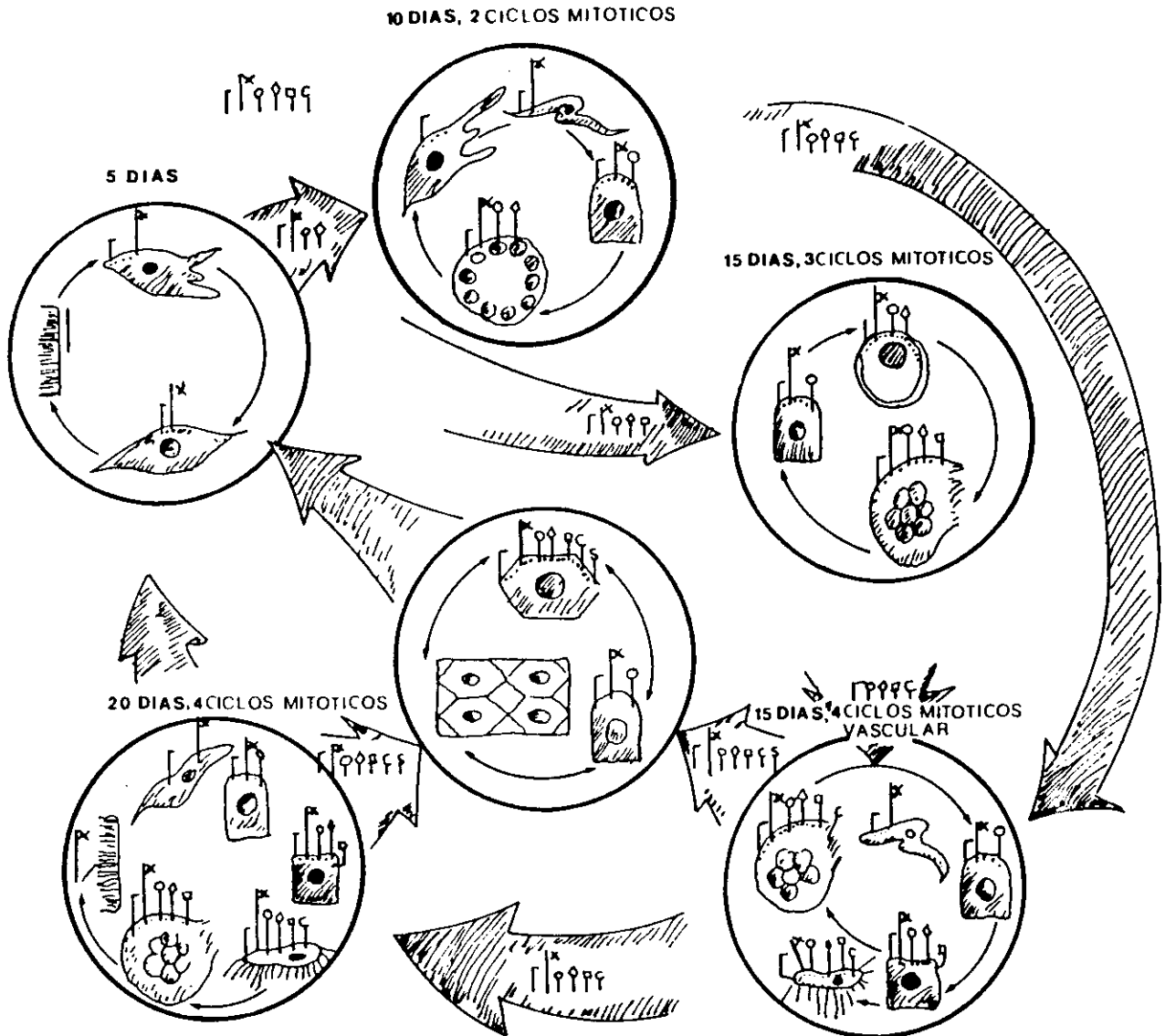


Fig. 5. Diagrama de modulación celular por ciclos mitóticos que se desarrollan a partir del implante de matriz ósea ("principio de inducción ósea" (BIP))^{35,237}.

Buring en 1967²³ demostró cómo el "principio de inducción ósea" se podía transmitir a través de un filtro, con un microporo de tamaño 0.45μ , ofreciendo una nueva clave muy importante en cuanto al tamaño de la molécula responsable de tal principio. El uso de las cámaras de difusión permitió obtener una evidencia de que este principio era una molécula difusible en los líquidos intersiticiales. Por otra parte, al ocurrir el proceso en el interior de estas cámaras, en ausencia de tejido conectivo, tejido endotelial o de cualquiera de las células sanguíneas circulantes, pudo demostrarse que la matriz ósea contenía un "principio de inducción ósea" que posiblemente tuviera como diana las células mesenquimales. El potencial fenotípico de las células mesenquimales de la médula ósea y otros tejidos ha sido estudiado con posterioridad^{52,53,158,165}. Este último concepto era apoyado por el hecho de que las células mesenquimales se disponían a lo largo de la pared externa de la membrana y posteriormente se hipertrofiaban y diferenciaban.

El acontecimiento más importante en el fenómeno de inducción ósea es el crecimiento y posterior diferenciación de una nueva población de células mesenquimales competentes. Este proceso necesita de un intervalo de 2 a 3 días para poder contar con una población de células mesenquimales lo suficientemente grande²³⁶. Mediante estudios con marcaje mediante timidina tritiada del núcleo de estas células, se observa cómo existe una rápida renovación de las mismas que se diferencian en osteoblastos y osteocitos¹⁶⁴. En resumen, cuando un tejido transmite el principio de inducción ósea, se pone en marcha un complicado sistema que produce la diferenciación de células del tejido conectivo en osteoblastos²³⁵. La inducción acontece en dos direcciones: centrifugamente para producir nuevo tejido óseo laminar y centripetamente para producir tejido óseo trabecular y tejido hematopoyético. De esta forma, el sistema de inducción ósea es un mecanismo de organogénesis con el desarrollo de un osículo mediante osificación endocondral^{1,48,232,275}.

Inducción ósea heterotópica

Una de las formas de diferenciación celular postfetal más sorprendentes y notables es el desarrollo de cartílago, hueso y médula ósea a partir de un implante intramuscular de matriz ósea o de dentina²³².

Urist en 1965²³² realizó uno de los primeros implantes de matriz ósea desmineralizada para el estudio de la formación ósea por autoinducción aportando una nueva evidencia en favor de la teoría de la inducción al obtener formación ósea a partir de un implante de matriz ósea descalcificada realizado en los músculos abdominales o cuádriceps de diferentes animales (ratas, ratones, cobayas y conejos).

Hauschka en 1986⁷³ implanta polvo desmineralizado de matriz ósea en ratas y observa en el primer día una aparición transitoria de leucocitos polimorfonucleares. Las células mesenquimales aparecen en íntima continuidad con la matriz en el tercer día y se diferencian y elaboran matriz cartilaginosa sobre el séptimo día. En el décimo día aparecen los osteoblastos formadores de hueso. Entre los días duodécimo y décimo-octavo, el hueso neoformado se remodela por los osteoclastos existiendo una concomitante disolución de la matriz implantada. Finalmente, en el vigésimo primer día se produce la diferenciación de la médula ósea hematopoyética dentro del osículo. En resumen, el depósito inicial consiste en cartílago y hueso membranoso que son reemplazados por hueso laminar y médula ósea.

Estudios clásicos de Huggins en 1931⁸⁸ demostraron que el epitelio transicional del tracto urinario podía inducir la formación de hueso cuando se trasplantaba en ciertas zonas, observando la aparición de éste cuando se implantaba en músculo o fascia, pero no cuando se realizaba en riñón, hígado o bazo.

Urist en 1969²³⁶, utilizando hueso descalcificado como estímulo, obtuvo una exuberante producción de hueso inducido cuando lo implantó en músculo, tendón y tejido subcutáneo, pero no cuando el implante se realizó en bazo, hígado o riñón. Sin embargo, cuando el implante se realizaba en primer lugar en músculo y varios días después se transfería a bazo, hígado o riñón, sí que existía inducción ósea. Estas observaciones le sugirieron que para que haya inducción ósea en tejidos blandos es necesario:

- 1) Un estímulo inductor.
- 2) Una población celular potencialmente osteogénica, que presumiblemente serían células mesenquimales.
- 3) Un tejido circundante favorable a la osteogénesis¹⁴⁷, Fig. 6.

I.d.- LA PROTEINA MORFOGENETICA OSEA (BMP)

En 1968 Urist pudo observar la osteogénesis inducida mediante implantes de matriz ósea desmineralizada con HCl en 10 pacientes a los que se les realizaron implantes intraóseos y, en 25 pacientes con los implantes en la superficie²³⁴. También observó inducción ósea con el uso de hueso humano alogénico autolisado²⁵⁵.

Tras observar este fenómeno de inducción ósea, el siguiente paso fué intentar aislar la sustancia, contenida en el hueso, responsable de esta inducción. En la búsqueda de aquellos componentes del hueso que pudieran estar involucrados en la morfogénesis ósea, Urist y col. efectuaron investigaciones exhaustivas con el fin de poder ir excluyendo aquellas sustancias que no intervenían en el proceso de inducción ósea^{233,236,239}, pudiendo así, establecer las características físico-químicas de la sustancia. Partiendo de la matriz ósea y mediante la extracción secuencial de uno o más componentes y la acción enzimática sobre otros componentes, Urist definió el carácter proteico de la BMP^{94,245}. En 1967, observó cómo las sustancias de la matriz ósea solubles en HCl no presentaban ningún tipo de actividad. Poco después demuestra como el

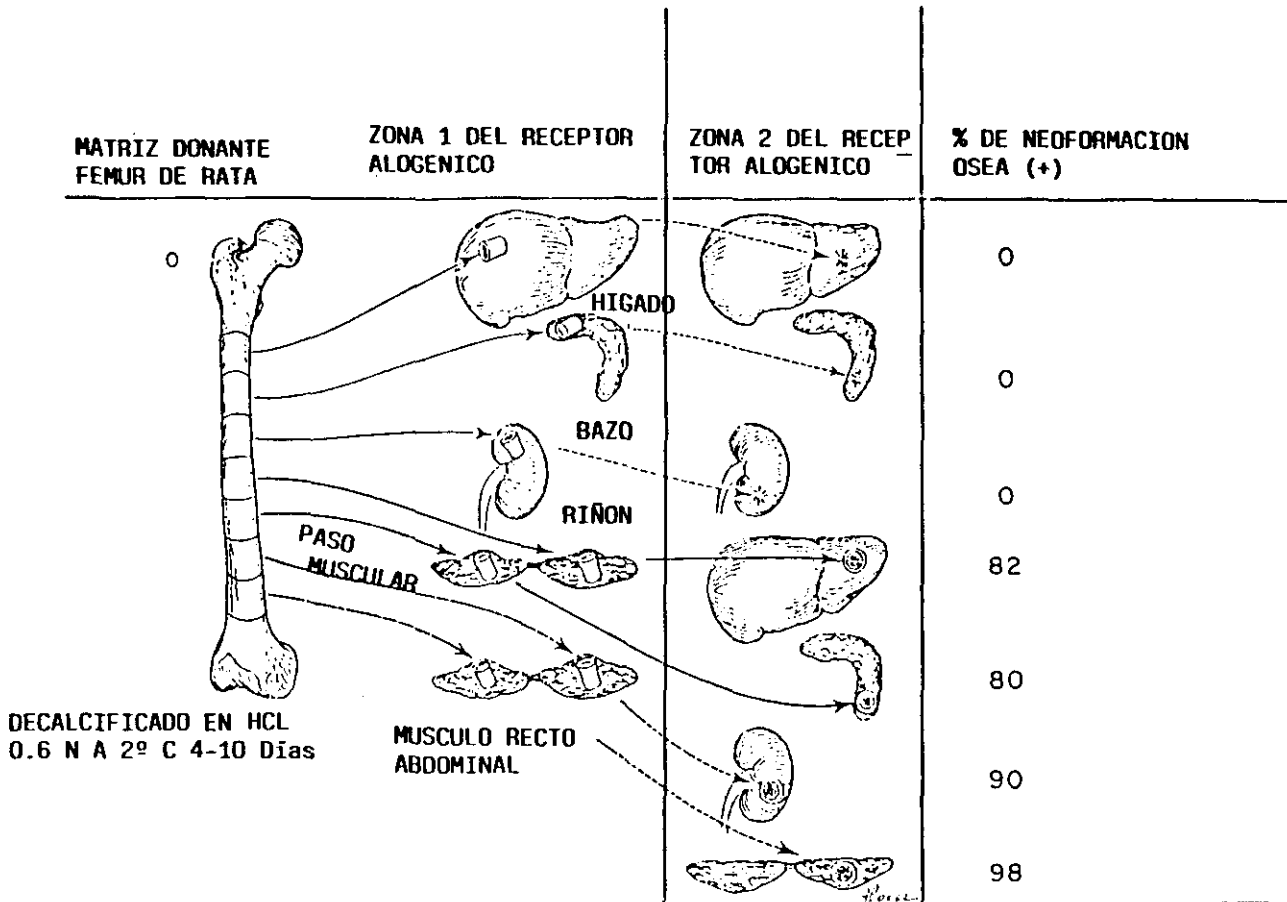


Fig. 6.- Representación gráfica del fenómeno de inducción ósea heterotópica utilizando hueso descalcificado como estímulo^{35,237}.

principio de inducción ósea dentro del extracto de matriz descalcificada tampoco se alteraba por los disolventes de grasas, las soluciones salinas y enzimas que extraen las proteínas polisacáridas o lipoproteínas del hueso. También observó que la actividad osteoinductora era mayor en la cortical que en la esponjosa del hueso.

Fue en el año 1971 cuando Urist comenzó a considerar el "principio de inducción ósea" con propiedades morfogenéticas. Tras la realización de los estudios bioquímicos expuestos anteriormente, pudo apoyarse de forma consecuente la hipótesis de que la propiedad morfogenética ósea residía en una proteína o grupo de proteínas, denominando finalmente al "principio de inducción ósea" como "Proteína Morfogenética Osea (BMP)"^{156,191,243,257}.

Osteoinducción y osteoconducción

La capacidad osteogénica se define como el estado no expresado y aún no activado que tienen algunas células para diferenciarse en tejido óseo, por contra, la determinación osteogénica es un estado activado pero aún no expresado para diferenciarse en tejido óseo³⁴. Una población celular competente es indiferenciada y precisa del estímulo de la BMP, mientras que las células determinadas son prediferenciadas y no necesitan de la BMP para diferenciarse en tejido óseo¹⁹⁰.

Brighton en 1984²¹ estudiando el callo de fractura observó que existían dos líneas celulares diferentes que contribuían a la reparación de la fractura. Owen en 1985¹⁶⁴ diferenció las células osteoprogenitoras determinadas (DOPC) de las células osteoprogenitoras inducibles (IOPC). Sato en 1985¹⁹⁰ demostró cómo una población independiente de células perisinusoidales de tipo mesenquimal podía ser activada antes de que se produjera la reparación ósea completa de la lesión, mostrando de esta forma su capacidad osteogénica. La población de células determinadas tiene capacidad de producir nuevo tejido óseo en respuesta directa a la lesión o trasplante de las mismas. Triffitt en 1987²²⁴ estudió las

interacciones moleculares en el desarrollo de un órgano y en la inducción tisular. Hulth en 1989⁹¹ en un estudio sobre la reparación de las fracturas recopila los estudios anteriores, llegando a la conclusión de que las células osteoprogenitoras determinadas (DOPC) del periostio y de la médula ósea forman parte de la respuesta primaria a la lesión y son capaces de producir osificación directa o intramembranosa; las células osteoprogenitoras inducibles (IOPC) tienen su origen en los tejidos de alrededor de la lesión²¹, son células mesenquimales pluripotenciales con potencial condrogénico que acaban produciendo osificación endocondral y formarán el callo externo reparador de la fractura; las interacciones moleculares producidas a nivel de la lesión son decisivas en la inducción de estas células inducibles.

Tras realizar un implante de matriz ósea desmineralizada, el tejido óseo neoformado va a ser proporcional a la cantidad implantada²³⁹. Este nuevo tejido se va a desarrollar a partir de células mesenquimales bajo la influencia de la BMP²⁸², que es liberada a partir de la matriz ósea. La BMP es uno de los factores locales producido por los osteoblastos y que se mantiene en el hueso; sus funciones específicas son inducir células mesenquimales indiferenciadas hacia células diferenciadas de estirpe condro-osteogénica, reclutar condrocitos y osteoblastos de estas células mesenquimales y mejorar la formación ósea y cartilaginosa "in situ"²³². Landesman y Reddi¹²³ en 1986 demostraron cómo la matriz ósea desmineralizada posee proteínas que son quimiotácticas para las células mesenquimales. Existe toda una población celular potencial de células osteoprogenitoras que responde a estas proteínas quimiotácticas. La matriz ósea desmineralizada sirve por sí misma de señal para el reclutamiento de células progenitoras así como para su proliferación y diferenciación.

Osteoinducción y osteoconducción son dos términos muy similares gramaticalmente y con diferente significado. La osteoconducción es el proceso de extensión de la reparación ósea a partir de células del lecho del huésped con capacidad osteogénica (células osteoprogenitoras determinadas, DOPC) mientras que la osteoinducción

consiste en el reclutamiento de células mesenquimales indiferenciadas del tejido conectivo con potencial osteogénico que tras ser inducidas se transforman en células osteoprogenitoras inducidas (IOPC). Ambos procesos facilitan la curación de los defectos esqueléticos mediante el aporte de injertos óseos⁵⁶. La osteoconducción es una función pasiva del injerto que actúa como soporte sobre el que se deposita el hueso generado por el huésped. La osteoinducción se caracteriza por los factores derivados del injerto que estimulan activamente la nueva actividad osteogénica.

Desde el punto de vista de los biomateriales, se considera osteoconductor aquel que sirve de soporte y facilita el crecimiento óseo y osteoinductor aquel que estimula una población celular a transformarse en osteoblastos. Mientras que la hidroxiapatita posee capacidad osteoconductiva proporcionando un medio adecuado para el crecimiento de hueso a partir de las trabéculas existentes previamente, la BMP tiene potencial osteoinductor^{192,265}.

Las células osteoprogenitoras determinadas son células mesenquimales que al proliferar en condiciones adecuadas van a dar lugar a tejido óseo. Estas son las células de la capa profunda del periostio ("cambium perióstico") y las responsables de la osteogénesis reparativa inicial en el callo de fractura. El estroma de la médula ósea tiene como función dar un soporte estructural y funcional a las células hematopoyéticas. En este estroma hay una teórica célula tronco a partir de la cual se van a formar diferentes estirpes de células progenitoras tanto para el tejido óseo como para el tejido hematopoyético.

Las células osteoprogenitoras inducidas son células mesenquimales de áreas extramedulares (músculo, timo, bazo) capaces de producir hueso cuando son inducidas a ello por otros tejidos o sustancias inductoras. Estas son las que proliferan en el mesénquima perifractuario y el músculo y van a contribuir a la masa fundamental del callo periostal de tipo condroblástico.

Los datos de cultivos tisulares indican que ambas estirpes tienen carácter clónico y son dos subgrupos diferentes.

El crecimiento de nuevo hueso inducido por la BMP acontece tanto por extensión directa de las células osteoprogenitoras (osteogénesis) como por diferenciación celular de las células mesenquimales (osteogénesis)^{212,213}. El proceso es irreversible y culmina con el desarrollo de un osículo. La BMP puede inducir células mesenquimales a diferenciarse en cartílago y hueso y se ha observado que induce formación ósea endocondral cuando se implanta en defectos esqueléticos y extraesqueléticos en animales de laboratorio^{111,160,190,213}.

I.e.- CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA BMP

1.- BMP y factores de crecimiento

La BMP aislada de la matriz ósea^{70,71,254}, de la dentina^{32,108} y de ciertos tumores óseos como el osteosarcoma^{7,70,72,214,215} no parece que sea ni un factor de crecimiento, ni un nutriente, ni un metabolito, ni una vitamina. La BMP se clasifica dentro de la categoría de morfogen o sustancia que inicia la diferenciación celular y que puede desreprimir una combinación concreta de genes en un órgano en desarrollo²²⁵. Alguna de las preparaciones de BMP secuenciada mediante un mapa de péptidos posee una estructura primaria que no se halla entre las actualmente conocidas en los factores de crecimiento²⁵. Tras los trabajos de Engstrom y col.⁴⁷ y Wozney y col. en 1988²⁷⁹ se observó que un segmento de aminoácidos de la BMP coincide con un segmento igual al del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta).

A partir de hueso humano, bovino, de mono y ratas se han aislado varias proteínas que se piensa que tienen actividad osteoinductora¹⁸⁸. Los pesos moleculares y los puntos isoeléctricos nos inclinan a pensar que se trata de proteínas diferentes o de una familia de proteínas con igual

actividad^{218,274,275,279}. Wang y col. en 1988²⁷⁴ purificaron un grupo de BMPs a partir de hueso bovino. Basándose en la secuencia parcial de aminoácidos y los datos obtenidos con sondas de DNA, se han aislado oligonucleótidos correspondientes a secuencias parciales de DNAs codificados (cDNAs) para la BMP-1, BMP-2 (2A), BMP-3, BMP-4 (2B) (B-2:9), BMP-5, B;P-6 y BMP-7 desde cDNA humanos²⁷⁹. Seis de estas BMPs (BMPs 2-7) han sido identificadas como miembros de la familia TGF-beta. Algunas de las BMPs recombinadas mostraron capacidad para inducir cartílago ectópico o formación ósea en ratas cuando se implantaron con extractos de matriz ósea desmineralizada con guanidina-HCl^{138,279}.

Los factores de crecimiento regulan la mitogénesis y la curación de la lesión. Dentro de este grupo incluimos el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factores de crecimiento transformantes alfa y beta (TGF-alfa y TGF-beta)^{47,114}.

Muchos factores de crecimiento se han implicado en el crecimiento y reparación del hueso^{73,225}. Se pueden localizar en el hueso varios factores tales como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) y factor derivado de las plaquetas (PDGF). Todos tienen alguna influencia sobre el cartílago y las células óseas "in vitro" y se ha sospechado que pudieran tener alguna influencia sobre la actividad de la BMP, sin embargo, ninguno de ellos ha demostrado inducir cartílago o tejido óseo "in vivo"^{4,29}.

Centrella y col. en 1991³⁰ realizan una actualización de los conocimientos sobre el factor de crecimiento beta. Está formado por una familia de polipéptidos que se sintetizan en los linfocitos y fibroblastos y se halla en todos los tejidos esqueléticos o no esqueléticos, aunque estudios realizados por Robey y col. demostraron la síntesis de TGF-beta por condrocitos y osteoblastos¹⁸⁰. Estudios "in vitro" e "in vivo" indican que puede tener efecto estimulador o inhibidor sobre la replicación, desarrollo y diferenciación en la población celular esquelética en función de la concentración de éste. El TGF-beta estimula la diferenciación de

células mesenquimales, proliferación de osteoblastos y síntesis de matriz, pero también induce la maduración de osteoblastos, condrocitos y osteoclastos^{13,180} siendo el responsable en parte de la reparación ósea en el callo de fractura¹⁰⁶. Además muchas de las funciones del TGF-beta están solapadas con las de otros factores osteoinductores. Se almacena en las plaquetas y se libera con la degranulación de éstas en forma de complejos inactivos que se disocian en varios péptidos mediante la exposición a condiciones moderadamente ácidas¹²¹; además se asocia con los estados precoces de formación de fibrina e inflamación. Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) pueden actuar de forma aislada pero también pueden hacerlo de forma sinérgica con múltiples factores (locales y sistémicos)²⁸, incluido el TGF-beta, que intervienen en la cascada de acontecimientos que finaliza en la osteoinducción. Ensayos realizados "in vivo" para demostrar la formación de hueso ectópico indican que a diferencia de la BMP, el TGF-beta solo no es capaz de iniciar el proceso de osteoinducción^{114,275}. Existen al menos cinco factores de crecimiento beta (TGF-betas 1-5), todos comparten una similitud de 64-82% en la secuencia de aminoácidos. Al menos seis de las siete moléculas de BMP aisladas (BMP 2-7) presentan una estructura homóloga y comparten la secuencia de aminoácidos en un 30-40% con el TGF-beta 1 (TGF-beta prototipo).

Las propiedades físicas y la actividad específica de la BMP bovina o humana parecería diferenciarla de cualquiera de los factores descritos anteriormente²⁷⁴, aunque tras el aislamiento de las BMP-1, BMP-2 (2A), BMP-3, BMP-4 (2B), BMP-5, BMP-6 y BMP-7 se ha observado que seis de estas BMPs (BMPs 2-7) eran miembros de la familia del TGF-beta^{28,138,274,279}.

La función de la BMP es actuar sobre células indiferenciadas del tejido conjuntivo perivascular, mientras que los factores de crecimiento tienen como diana una población celular diferenciada de la cual deriva el nombre del factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento fibroblástico^{114,257}.

Las fuentes de BMP son el hueso cortical^{70,71}, la dentina³² y los tumores óseos^{70,214}. El origen de los factores de crecimiento son varios órganos del cuerpo que pueden o no estar incluidos en la población de células diana. Uno o más factores de crecimiento han sido encontrados en casi todos los tejidos especializados del cuerpo¹¹⁴.

La Interleukina-1 (IL-1) difiere de los factores de crecimiento en cuanto a la fuente y a la clasificación. La IL-1 pertenece al grupo de las citoquinas que liberan los leucocitos y los macrófagos y regula la proliferación celular inespecífica así como las reacciones inmunológicas específicas. La IL-1 estimula la reabsorción y la formación de células óseas en cultivos tisulares²⁹.

La BMP se diferencia de los factores de crecimiento y de las citoquinas en que las células diana está constituida por una población restringida hacia la diferenciación de cartílago o hueso.

En el proceso de purificación de la BMP, el paso final es una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS bajo condiciones no reducidas; la actividad osteoinductora se observa en la fracción correspondiente a una talla de 30 kD²⁶⁷.

Tras la reducción que destruye la actividad biológica, esta fracción de 30 kD produce tres péptidos de 30 kD, 18 kD y 16 kD. Esta mezcla de polipéptidos representa una purificación de aproximadamente 300.000 veces en relación con el extracto de tejido óseo inicial y se obtienen únicamente 40 microgramos a partir de 40 kg de polvo de hueso²⁶⁴.

Aún sería necesario realizar una purificación adicional para observar cual de los tres péptidos es el que posee actividad osteoinductora y morfogenética.

Encaminados hacia la producción de una BMP sintética con alta actividad, se encuentran los trabajos de Wozney y col.²⁷⁹ que partiendo de los tres péptidos purificados originalmente a partir del tejido óseo bovino

han realizado el aislamiento de los equivalentes humanos de la proteína BMP-bovina a partir de cadenas complementarias de DNA.

El resultado final ha sido la purificación de 7 proteínas morfogenéticas óseas recombinadas humanas (rhBMPs) estrechamente vinculadas con la morfogénesis embrionaria en otros sistemas de animales.

Todos estos datos nos sugieren que la actividad osteoinductora de la BMP es debida a una mezcla de moléculas de regulación y que el complejo proceso de desarrollo de cartilago y tejido óseo está controlado, al menos en parte, por acción de estas moléculas.

La BMP no actúa en ausencia de un medio libre de suero "in vitro" o de hormonas de crecimiento "in vivo"; es decir, la BMP posee una actividad mitogénica relativamente baja, hecho muy característico en un factor de crecimiento^{110,208}.

2.- BMP y hormonas paracrinas

La BMP podría considerarse como una hormona paracrina²⁰⁵ que también se encuentra de forma circulante en la sangre y que cumple los cuatro requerimientos definidos por Edward Doisy³⁴ con respecto a identificar a una sustancia como hormona:

- 1.-Reconocimiento de un órgano o glándula que produce la secreción interna.
- 2.-Método de detección de la misma secreción.
- 3.-Extractos de la hormona purificada.
- 4.-Aislamiento de la hormona pura y determinación de su estructura.

De esta forma, el esqueleto podría considerarse como un enorme órgano endocrino¹³².

En relación con el primer requerimiento de Doisy, la BMP es liberada a partir de un sistema orgánico que consiste en aproximadamente un 15% de osteocitos y un 85% de sustancia intercelular. Estudios de inmunofluorescencia ponen en evidencia la BMP en los elementos celulares y almacenada en la sustancia intercelular. La evidencia definitiva del origen celular de la BMP queda demostrada por la aparición de BMP en los cultivos celulares a partir del osteosarcoma de ratón (tipo Dunn)^{78,120,217,218}, sarcoma de Ewing y otros tumores celulares^{251,252}. Lianjia y Yan en 1990¹²⁷ utilizaron anticuerpos anti-BMP bovina para conocer la localización de la proteína en el hueso y observaron que está distribuida a lo largo de las fibras de colágeno del hueso normal, en las células periósticas y en las células mesenquimales del estroma medular. Poca cantidad pudo ser encontrada en las células del hueso laminar o en la matriz ósea calcificada. También se encontró BMP en el citoplasma de las células tumorales de osteosarcomas y condrosarcomas.

El segundo requerimiento también se cumple al detectar en el suero, mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA), niveles relativamente altos de BMP en niños en crecimiento y en pacientes con enfermedad de Paget, niveles inferiores en hombres y mujeres adultos y niveles más bajos en mujeres con osteoporosis severa²⁶⁰. La concentración de BMP en el suero es alta (ng/ml) cuando se compara con los niveles de calcitonina o de hormona paratiroidea (pg/ml) y puede reflejar la enorme superficie de recambio del tejido óseo.

Con respecto al tercer requerimiento, se ha observado la actividad de la BMP en extractos de matriz ósea con proteínas colagenasa-resistentes que se han implantado en defectos óseos de perros ovejales y humanos y en el músculo de roedores^{58,102,103,105,130,134,217,265}.

Finalmente, el cuarto requerimiento se demuestra por el aislamiento de la BMP purificada tanto en humanos como en bovinos^{28,138,270,274,275,279,256,259}, la determinación de su peso molecular, su punto isoeléctrico y la composición de aminoácidos.

3.- Cuantificación de BMP dentro de la matriz ósea

El tejido óseo se encuentra tan íntimamente en contacto con el tejido graso, los vasos sanguíneos y la médula ósea, que la investigación bioquímica de las proteínas de la matriz calcificada casi siempre se lleva a cabo en el tejido óseo cortical más que en el esponjoso²²⁵. La cortical ósea consta de aproximadamente un 70% de material inorgánico (principalmente hidroxapatita) y un 30% de material orgánico. Cuando se extraen las sustancias que son solubles en agua y en cloroformo-metanol, el peso seco de la matriz libre consiste en un 88% de colágeno, 10% de proteínas no colágenas y un 2% de sustancias no determinadas.

Se han encontrado 20 grupos químicos principales en las células y en la matriz extracelular del hueso que son difusibles en el fluido extracelular óseo, Tabla I. Se observa como la BMP es una de las proteínas menos abundantes de la matriz (0.001% del peso del hueso cortical), perteneciendo al grupo de las proteínas no-colágenas²⁶⁰.

4.- BMP y regeneración ósea

La regeneración y el crecimiento del hueso están precedidos por una fase morfogénica del desarrollo, que es iniciada por la BMP. En la fase siguiente de citodiferenciación, otras proteínas específicas del tejido óseo (por ejemplo, el factor de crecimiento del cartílago, el factor de crecimiento óseo o factores de crecimiento esqueléticos)^{56,97,257}, entran en el proceso de regeneración, que incluye el proceso de remodelación ósea, mediante estimulación de la división mitótica de condroblastos y preosteoblastos.

TABLA I
Proteínas intra y extracelulares de la matriz ósea²⁶⁰.

A. PROTEINAS RESIDUALES

I. Colágeno88%
II. Glicoproteínas estructurales ..	.1%

B. PROTEINAS ESPECIFICAS DEL TEJIDO OSEO

I. Proteínas ricas en ácido gamma-carboxi-glutámico2%
II. Osteonectina2%
III. Proteína morfogenética ósea0,001%
IV. Factor óseo de crecimiento....	.0,1%

**C. PROTEINAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN INVESTIGACION CON
RESPECTO AL MECANISMO DE CALCIFICACION**

I. Proteoglicanos0,8%
II. Proteolípidos0,3%
III. Sialoproteínas óseas.....	.0,9%
IV. Fosfoproteínas0,2%
V. Fosfopéptidos0,1%
VI. Péptidos ácidosolubles0,6%

D. LIPIDOS0,9%

E. PROTEINAS PLASMATICAS ACUMULADAS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR

I. Albúmina0,3%
II. Alfa 1 glicoproteína0,4%
III. Alfa 2 HS glicoproteína.....	.0,4%

F. INMUNOGLOBULINAS

I. IgE, incluyendo anti-BMP.....	.1%
II. IgD	Trazas

G. SIN IDENTIFICAR0,9%

Se cree que la calcificación está asociada con proteolípidos o fosfoproteínas²⁷³, fosfopéptidos o proteínas iniciadoras de calcificación²⁴⁸ y osteonectina²¹⁹, pero no se conoce el mecanismo bioquímico.

La BMP está formada por un grupo de moléculas de proteínas no-colágenas que inducen la diferenciación de las células mesenquimales de tipo perivascular que de otra forma no se diferenciarían ni en condroblastos ni en osteoblastos, en cartílago y en hueso a través de una osificación endocondral^{156,191,257} y puede ser el largamente buscado factor responsable de la renovación continua y regeneración de la vida postfetal. La BMP se denomina "morfogénica" ya que inicia la disgregación, migración, reagregación y proliferación celular antes de la citodiferenciación^{1,232,275}.

La actividad de la BMP puede ser evaluada en el implante por el acúmulo de los siguientes productos celulares: hialuronidato en las primeras 24 horas⁹⁴, hialuronidasa a las 48 horas¹⁶¹ y fosfatasa alcalina a los diez días^{20,48,89,187}. La BMP es transferida desde la matriz ósea a la población celular respondedora dentro de las primeras 24 horas del implante¹⁵⁶.

"In vitro", las células del tejido conjuntivo incubadas con hueso desmineralizado¹⁹⁰ o con BMP¹⁶⁰ desarrollan un fenotipo cartilaginoso. Otros componentes proteicos aislados del hueso, como la osteogenina¹⁸⁹ y el TGF-beta²⁷⁹ han mostrado poseer actividad condrogénica "in vitro". Wozney y col.²⁷⁹ han demostrado que las BMPs humanas recombinadas pueden producir cartílago "in vivo" pero no producen hueso, sugiriendo que múltiples proteínas pueden ser necesarias para reproducir los efectos del hueso desmineralizado o los extractos de BMP parcialmente purificados.

Boyan y col.²⁰ en 1992 comparan las características bioquímicas de las células del tejido conjuntivo de diferentes especies incubadas con BMP

de origen canino o bovino parcialmente purificada con las características bioquímicas de auténticos condrocitos "in vitro", llegando a la conclusión que las células conjuntivas de un amplio espectro de especies (ratas, perros y humanos) responden de forma similar a la BMP. Además no parecen discriminar entre las BMPs de diferente origen (bovina o canina) al menos con referencia a los parámetros medidos en este trabajo (actividad de fosfatasa alcalina y síntesis de colágeno Tipos I y II). Estudios no publicados a los que se hace referencia en este trabajo²⁰ demuestran, sin embargo, que las pseudoartrosis caninas tratadas con BMP de origen bovino o canino "in vivo", precisan de BMP específica de especie par la consolidación. Estos datos sugieren que se debe tener precaución al interpretar los resultados de los cultivos celulares en cuanto a la eficacia del uso de las BMPs en la práctica clínica.

5.- Caracterización bioquímica de la BMP

La BMP es una proteína inductora de la diferenciación celular ósea que se encuentra firmemente unida en muy pequeñas cantidades a la fracción de proteínas insolubles no-colágenas de la matriz ósea, formando así un agregado junto con osteonectina, osteocalcina (BGP), proteína de la matriz de ácido glutámico, histonas y calmodulina. A causa de su escasa cantidad y su firme unión, es muy difícil aislarla libre de contaminación de las otras proteínas no-colágenas insolubles²⁶³.

Young y col. en 1992²⁸⁴ analizan la estructura y función de las proteínas no colágenas estructurales de la matriz ósea que existen en mayor cantidad, Tabla II, debido a su función en la unión celular, unión al calcio e hidroxapatita y su función en la mineralización.

La BMP se encuentra formando agregados supramoleculares con otras proteínas (osteonectina, proteína matriz gla, histonas, calmodulina y otras muchas)^{256,259}. La cantidad de BMP humana (hBMP) en la cortical ósea libre de medular es pequeña, aproximadamente 0,001% del peso húmedo del hueso fresco desmineralizado²⁵⁶.

TABLA II

Características funcionales de las principales proteínas estructurales no colágenas de la matriz ósea²⁸⁴

<u>Proteína</u>	<u>Función potencial</u>
OSTEOPONTINA (2ar, fosfoproteína 44 kD, SPP)	... Unión celular, ... unión hidroxapatita
SIALOPROTEINA OSEA (BSP II) Unión celular
GLICOPROTEINA ACIDA OSEA (BAG-75) ¿Mineralización?
TROMBOSPONDINA Unión celular
GIGLICANO (PG I) Interacciones célula-célula o célula-proteína
DECORINA (PG II, PG-40) Unión al colágeno, regulación formación fibrillas
OSTEONECTINA Unión al calcio e hidroxapatita, proliferación celular
PROTEINA GLA OSEA ¿Remodelación ósea? (Osteocalcina/BGP)
MATRIZ GLA (MGP) Desconocida

La BMP tiene que ser separada para obtenerse purificada de una serie de proteínas, Tabla I.

La BGP u osteocalcina representa un 15-25% de las proteínas no-colágenas del hueso; tiene capacidad quimiotáctica sobre los osteoclastos¹⁴¹ y células mesenquimales¹³⁵ así como importante capacidad de unión a la hidroxapatita del hueso⁴² y se puede utilizar como marcador del metabolismo óseo aunque se ha observado que en un gran porcentaje de procesos con alto remodelamiento óseo, como ocurre en la enfermedad de Paget, la BGP puede ser normal⁶⁷. También se han encontrado acumuladas en el hueso las proteínas séricas: albúmina, IgE, IgD y alfa-2 HS glicoproteínas. Además pueden encontrarse de forma eventual en la matriz ósea: lípidos, péptidos, fosfopéptidos y cantidades muy pequeñas de componentes séricos. Ciertas glicoproteínas estructurales constituyen la masa del residuo insoluble después de que son extraídos de forma secuencial otros componentes. La osteonectina es una proteína de 34 KD que forma un puente entre la fase orgánica e inorgánica del hueso^{121,219}. La proteína menos abundante de la matriz ósea es la BMP; sin embargo, al menos un 2% de las proteínas de la matriz aún no se han definido y podrían incluir un iniciador de la calcificación así como otros componentes específicos del hueso.

Hanamura y col. en 1980⁷² demostraron que la BMP podría ser extraída en condiciones disociativas con hidrocloreuro de guanidina 4M, a partir de osteosarcomas de ratón o de matriz ósea de rata. Urist y col. en 1981²⁵⁴ idearon la utilización de una mezcla de solvente de urea 6M y Cl₂Ca 2M para la extracción de BMP a partir de hueso bovino. Desde el desarrollo de estos nuevos métodos de extracción, la investigación sobre la capacidad de inducción de esta proteína, ha avanzado rápidamente.

Urist y col. en 1984²⁵⁹ purificaron la BMP utilizando la cromatografía con hidroxapatita, llegando a obtener BMP purificada con pesos moleculares de 17.5 kD para la BMP humana (hBMP) y 18.5 kD para la BMP bovina (bBMP).

Bessho y col. en 1991⁸ realizaron un análisis de las BMPs humana y bovina extraída de la matriz ósea con el fin de conocer la secuencia de aminoácidos de estas proteínas. Tras extraer la BMP de la matriz ósea con hidrocloreuro de guanidina 4M, fué purificada con ayuda de cromatografía líquida. La electroforesis en gel de poliacrilamida-sulfato sódico (SDS-PAGE) mostró que la BMP obtenida era homogénea. Los pesos moleculares de estas BMPs humana y bovina fueron de 17 y 18 kD respectivamente tras la electroforesis SDS-PAGE y la cantidad de aminoácidos fue de 165 para la hBMP y 163 para la bBMP. La secuencia de aminoácidos difiere de las BMPs analizadas por Wozney y col. en 1988²⁷⁹, pero las características fisicoquímicas son comparables a las preparaciones originales de BMP realizadas por Urist y col. en 1983, 1984 y 1987^{256,259,266}.

Kübler y Urist en 1993¹²⁰ obtuvieron un peso molecular de 18kD de una BMP derivada de osteosarcoma humano y parcialmente purificada con SDS-PAGE.

Takaoka y col. en 1993²¹⁷ purificaron y caracterizaron una BMP derivada de un osteosarcoma murino (tipo Dunn) con ayuda de electroforesis SDS-PAGE, obteniendo una proteína purificada con un peso molecular de 32 kD que separaron en dos subunidades distintas de 17 y 19 kD, ambas con actividad osteoinductiva. La secuencia parcial de aminoácidos de estas dos subunidades era la misma e idéntica a la hBMP-2B (BMP-4)²⁷⁹ que a su vez formaba parte de la familia del TGF-beta.

6.- Características bioquímicas

Las características bioquímicas de la BMP bovina evidencian una sensibilidad a los álcalis, una labilidad a tripsina y quimiotripsina, una acidez y una capacidad a ser degradada en soluciones ácido-alcohol, entre otras, Tabla III ²⁵⁹.

En estado supramolecular, la BMP puede formar agregados de proteínas con pesos moleculares de 34, 24, 17.5 y 14 kD con una solubilidad muy baja en medio acuoso. Los cuatro agregados proteicos son separables en condiciones de disociación en urea 6M o en hidrocloreuro de guanidina 4M. El agregado de 17.5 kD es relativamente soluble en soluciones salinas fisiológicas o en agua, si la proteína de 14 kD ha sido previamente extraída por ultrafiltración ya que ambos forman un complejo insoluble, posiblemente por medio un puente de calcio iónico¹⁷⁰. Kübler y Urist en 1993¹²⁰ aislan una BMP y proteínas no colágenas de osteosarcoma humano y tras la realización de electroforesis observan dos bandas de 18 kD y 14 kD, esta última sin capacidad osteoinductiva y forma agregados con la BMP. A partir de la proteína de 18 kD se han realizado técnicas de purificación proteica de alta resolución y tecnología de recombinación de DNA consiguiendo el aislamiento y purificación de siete proteínas con capacidad osteoinductora^{138,279}. Los extractos sin purificar de BMP tienen una mayor naturaleza hidrofóbica^{214,232}, pero tras varios procesos de purificación, la proteína adquiere una naturaleza hidrosoluble^{157,216,259}. En resumen, la solubilidad de la BMP en agua depende de la extracción de otras moléculas hidrofóbicas con las que forma complejos. "In situ", las proteínas de la matriz ósea insolubles pueden mantener un gradiente de concentración entre la superficie de la matriz ósea y los receptores celulares de membrana de BMP; este complejo BMP-proteínas insolubles podría servir como un sistema de liberación de la BMP^{68,155}.

La insolubilidad de la BMP en agua fría se encuentra correlacionada con la concentración de iones calcio en la solución. Cuando se añade calcio a la solución, la sal cálcica de BMP es soluble en agua fría. Entonces la solubilidad de BMP en medio acuoso va a depender de la presencia de otras moléculas hidrofóbicas con las que forma agregados insolubles por una parte y con iones calcio por otra, con lo que se convierte en un complejo soluble en agua.

Tabla III
Características bioquímicas de la BMP bovina^{35,259}

- Polipéptido ácido.
- Pm aparente 18 kD
- pI = 5.0 + 0.2
- Unión con hidroxiapatita.
- No se han detectado carbohidratos.
- Soluble en soluciones neutrales a pH 7.2.
- Degradada en soluciones ácido/ alcohol.
- Sensible a álcalis.
- Insoluble en cloroformo/ metanol, alcohol absoluto y acetona.
- Insoluble en Tritón X-100.
- Insoluble en HCl 0.6N.
- Soluble en urea 6M, GuHCl 4M y HCl 0.2M.
- Parcialmente soluble en etilén-glicol.
- Nucleasa (RNasa, DNasa) resistente.
- Lábil a tripsina y quimiotripsina.
- Resistente a condroitinasa A, B y C/ Amilasa/ Neuraminidasa/ Hialuronidasa/ Fosfatasa Alcalina/ Fosfatasa Acida/ Quimopapaína/ Colagenasa/ Tirosinasa y Termolisina.

Desafortunadamente, la implantación de BMP purificada e hidrosoluble generalmente no produce una respuesta osteoinductiva debido a la rápida difusión de la proteína del lugar donde se ha implantado^{157,216}.

Aunque la BMP tiene una estrecha relación con el colágeno que contamina la mayoría de las preparaciones más purificadas, pudiendo contener algún residuo de hidroxiprolina, es una proteína diferente a las proteínas colagenas como lo demuestra el hecho de que la BMP contiene una cantidad demasiado alta de carbohidratos, su estructura es distinta a la de la triple hélice de la molécula de colágeno y además es resistente a las colagenasas²⁵³.

Numerosos estudios bioquímicos se han realizado con el objetivo de conocer la naturaleza bioquímica de la BMP. Recientemente, un grupo de BMPs fue purificado a partir de hueso bovino²⁷⁴. Basándose sobre secuencias parciales de aminoácidos de BMP y utilizando oligonucleótidos correspondientes a cadenas de DNA humanas se han obtenido siete moléculas de BMP: BMP-1, BMP-2 (2A), BMP-3, BMP-4 (2B)²⁸, BMP-5, B;P-6 y BMP-7. Algunas de las BMPs recombinadas mostraron capacidad para inducir cartílago ectópico o formación ósea en ratas^{270,275,279}.

Takaoka y col. en 1993²¹⁸ a partir de una secuencia parcial de aminoácidos de una proteína con capacidad para inducir hueso aislada de un osteosarcoma murino (tipo Dunn) y una cadena de DNA del sarcoma consiguieron clonar la secuencia de genes complementarios de la proteína. La cadena de DNA complementario (clonado) fue transderida a las células ováricas de un hamster chino para la producción de proteínas con capacidad inductora. La secuencia de nucleótidos del DNA clonado y las proteínas sintetizadas a partir de éste fueron homólogos a la BMP-4 (BMP-2B). Estas proteínas producidas por las células ováricas eran capaces de producir osículos ectópicos en ratones a las dos semanas de su

implantación utilizando colágeno como portador de la proteína^{58,138,275,279}.

7.- Método de purificación

La primera evidencia de que la BMP podía aislarse surgió al conseguir que se liberara de la matriz ósea insoluble o matriz gelatinosa, separándose de ésta por coprecipitación con fosfato de calcio²⁵⁰.

Bajo ciertas condiciones, la BMP puede encontrarse en los tres compartimentos del hueso: células, matriz extracelular y mineral. La conversión de matriz ósea a gelatina, a baja temperatura, facilita la liberación de BMP "in vivo" y la extracción química o aislamiento "in vitro". Puesto que la BMP es colagenasa resistente, la colagenasa produce la liberación de BMP de la gelatina de matriz ósea, junto con otras proteínas no colágenas y los productos de degradación del colágeno. La BMP soluble se separa de otras proteínas de la matriz ósea mediante extracción de la gelatina de la matriz ósea por un solvente orgánico-inorgánico, mezcla de CaCl_2 0.5M en urea 6M o con GuHCl 4M.

La BMP se aísla de la matriz ósea y de otras proteínas de las que se disocia, exclusivamente y con dificultad, mediante extracción secuencial con desnaturizantes, precipitación diferencial, filtración en gel, cromatografía de hidroxapatita, fase inversa (columna hidrofóbica) y cromatografía líquida de alta resolución^{259,264}. Afortunadamente la acción de los solventes desnaturizantes (urea 6M en CaCl_2 0.5M o de hidrocloreuro de guanidina 4M) utilizados para romper los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de proteína, es reversible. En términos de actividad biológica e inmunológica, una molécula de BMP es renaturalizada cuando se retiran los desnaturizantes mediante diálisis contra agua. La actividad biológica de BMP no se pierde por liofilización y se ha conservado durante varios años tanto en la matriz ósea como fuera de ella, en forma aislada. La actividad de la BMP también sobrevive a la alquilación y a la esterilización²⁶¹.

La BMP se encuentra estrechamente unida a la hidroxiapatita pero se disocia con una solución tampón consistente únicamente en ión fosfato a una concentración en el rango de 0.18 a 0.2M. Esta disociación es tan consistente que la BMP puede liberarse a partir de la solución mediante un método en serie y entonces es separada de la hidroxiapatita mediante decalcificación en un saco de diálisis, primero contra HCl 0.1N y después contra agua. La BMP es ligeramente soluble en HCl 0.02N y prácticamente insoluble en HCl 0.6N con ninguna pérdida de su actividad biológica.

Existen diversos métodos para separar la BMP del resto de las proteínas óseas. Un procedimiento es el que separa la mayoría de las proteínas con Pm 34 kD, como la osteonectina (que representa el 50% de las proteínas no-colágenas) mediante la capacidad de solubilización de éstas en Tritón X-100 0.2%. La BMP es insoluble en Tritón X-100¹⁶⁹. La ultrafiltración separa las proteínas con Pm de 14 kD y otras proteínas de bajo Pm que tienen una alta afinidad por la BMP. Tras la retirada de estas proteínas, la BMP se hace soluble en agua.

El método más directo de preparación de BMP consiste en la extracción química de hueso desmineralizado con HCl en una solución de GuHCl 4M. Este extracto consiste en una mezcla compleja de proteínas intra y extracelulares que es extremadamente difícil de fraccionar. Un extracto ligeramente más manejable con un alto nivel de actividad BMP es el que se obtiene a partir de la matriz ósea insoluble o matriz gelatinosa preparada mediante extracción secuencial de proteínas no-colágenas relativamente solubles²⁶⁴, ésto retira aproximadamente un 20% de proteínas no-BMP. La BMP se encuentra íntimamente unida a agregados de proteínas insolubles dentro de la estructura conformada de forma muy densa con uniones cruzadas de la matriz del hueso cortical. La BMP se encuentra dentro de estos agregados de proteínas que van a ser solubles únicamente en urea 6M o en GuHCl 4M.

I.f.-TEORIA MORFOGENETICA OSEA

1.- Factores esenciales en la morfogénesis ósea

La regeneración del hueso se lleva a cabo por una asociación tejido óseo-médula ósea que promueve los intercambios bioquímicos entre la matriz del tejido óseo y el estroma de la médula ósea^{174,269}. Los factores que influyen sobre esta asociación tejido óseo-médula ósea son: el índice de actividad metabólica relacionado con la especie, la edad, los factores de crecimiento angiogénicos, el factor de crecimiento derivado de los macrófagos, otros factores de crecimiento polipeptídicos e interacciones indefinidas de procesos locales, regionales y sistémicos^{118,268}.

Los requisitos necesarios para la morfogénesis ósea son:

- Célula con codificación genética para diferenciarse en células óseas^{164,175}.
- Interacciones entre el sustrato inductor y las células a inducir^{175,221}.
- Medio ambiente favorable en el que se incluyan todos los requerimientos metabólicos, endocrinos, nutricionales y minerales para el desarrollo de productos celulares especializados^{220,238}.

2.- Inducción ósea y morfogénesis

El principio de inducción ósea significa más de un fenómeno en el desarrollo celular. No solo estimula la diferenciación de células mesenquimales competentes en condroblastos, osteoblastos y osteocitos, sino que también organiza, de manera simultánea, las células especializadas en un órgano u osículo relleno de células funcionantes de la médula ósea²⁰³. La histogénesis culmina en la morfogénesis a través de una sucesión de interacciones inductivas extracelulares²³⁶.

I.g.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CAPACIDAD DE RESPUESTA A LA BMP

1.- Índice de actividad metabólica

Coulson en 1983³³ basándose en el hecho de que el metabolismo es diferente dependiendo de las especies evaluó una serie de parámetros (frecuencia cardíaca, flujo sanguíneo, índice metabólico basal, frecuencia respiratoria y temperatura) que en conjunto forman el Índice de Actividad Metabólica (MAI). tomando como punto de referencia el MAI humano, al cual se le asigna en valor 1, obtiene el MAI de otras especies: el del perro tiene un valor de 1,58 y es muy similar al del humano, el de la rata es de 5,15 y el del ratón de 15,6²⁶⁸.

2.- Características de especie

Existe controversia acerca de la inducción ósea por BMP²⁰⁴ debido a que su actividad biológica ha sido estudiada predominantemente en roedores, que son más susceptibles a la formación ósea^{60,241,250} mientras que no está claro si es efectiva en animales mayores^{5,160,197}. La matriz xenogénica provoca una respuesta inmune citotóxica que bloquea el proceso morfogenético óseo; sin embargo, por algún mecanismo aún desconocido, mientras que en ratones provoca una elevada producción ósea, la misma preparación en ratas y conejos produce bajas cantidades²⁵⁹. Heckman y col. en 1991⁷⁴ estudiaron el efecto de BMP bovina y BMP canina en un modelo pseudoartrosis experimental en el radio de perros y observaron que la BMP canina vehiculizada en poliácido láctico si producía importante formación ósea hasta conseguir la consolidación en tres meses, sin embargo la respuesta inmunológica producida por la BMP bovina, también vehiculizada en poliácido láctico, no producía hueso. Boyan y col. en 1992²⁰ también observaron en pseudoartrosis caninas tratadas con BMP bovina y BMP canina que la reparación ósea requiere una BMP específica de especie.

Aspenberg y col. en 1988⁵ no encontraron ningún tipo de formación ósea en monos adultos a los que se les había trasplantado matriz ósea autóloga, pero este mismo extracto sí que fué activo en roedores. Esto podría ser debido a factores inhibitorios presentes en la matriz del primate con pérdida de respuesta en las células o receptores en la zona del implante. Sharawy en 1990²⁰² estudia el fenómeno de inducción ósea también en el primate obteniendo similares resultados. Ripamonti en 1991¹⁷⁷ llegó a la conclusión de que los mandriles poseen proteínas con capacidad osteoinductiva en su matriz ósea y células mesenquimales capaces de diferenciarse en osteoblastos. Miyamoto y col. en 1993¹⁵¹ estudiaron el efecto de BMP obtenida de osteosarcoma de ratón en cámaras de difusión implantadas en los músculos dorsales de monos (*Macaca fascicularis*) y observaron la producción de hueso con médula ósea en la superficie en contacto con el huésped al cabo de seis semanas, aunque el hueso inducido fué la mitad del observado en ratones. Aunque los monos son menos susceptibles a la formación ósea por osteoinducción que los roedores, las razones que explican el fracaso en anteriores experimentos podrían ser dos. En primer lugar, ya que los monos son menos susceptibles a la BMP, necesitan mayor cantidad de proteína para observar un efecto positivo. La segunda razón probable descansa sobre el portador de BMP; los implantes intramusculares aislados de la proteína fracasan en la inducción ósea, mientras que si es vehiculizada en cámaras de difusión permite una liberación mantenida de BMP hacia la superficie externa del filtro.

3.- Localización del implante en las diferentes especies

Los implantes alogénicos de BMP en zonas heterotópicas inducen un volumen pequeño de hueso en perros comparado con el gran volumen que se produce en ratones, incluso en el caso de implantes xenogénicos.

Estas características de especie implican un papel crítico de las poblaciones celulares diana en el lecho del receptor, en respuesta tanto a la matriz ósea desmineralizada como a la BMP²⁶⁸. En especies con larga vida e incluso en algunos roedores como el cobaya, la BMP está en forma inactiva²⁴⁴ y tiene que ser dissociada de las proteínas portadoras para que esté libre y reaccione con los receptores de las membranas celulares²⁴⁷. En cualquier caso, la capacidad osteogénica del lecho del huésped no se encuentra menos desarrollada en humanos que en ratas o ratones a causa de traumatismos, infecciones, etc; y si está influenciada por la susceptibilidad individual a la osificación heterotópica⁹³.

4.- Edad

La edad también parece influir en la cantidad de hueso inducido, demostrándose cómo la respuesta disminuye con la edad, prácticamente en todas las especies estudiadas^{99,268}. Jergesen y col. en 1991⁹⁹ estudiaron los efectos de la edad sobre la inducción ósea con polvo de hueso desmineralizado (DBP) observando que la osteoinducción en las ratas de mediana edad era menor que la observada en las más jóvenes. Curiosamente el DBP extraído de las ratas de mediana edad tenía mayor capacidad inductiva que el preparado de los animales más jóvenes.

5.- Corticoides e inmunosupresores

Ekelund y Nilsson en 1992⁴³ observaron el efecto de la Ciclosporina-A en ratas sometidas al estímulo osteoinductor mediante matriz ósea alogénica desmineralizada (ratas) y matriz ósea xenogénica desmineralizada (conejos). Las reacciones inmunológicas que retrasan o inhiben la osteoinducción pueden ser contrarrestadas con ciclosporina-A de forma que a las ocho semanas, la cantidad de hueso en las ratas tratadas con matriz ósea xenogénica y ciclosporina-A era igual a la observada en las ratas tratadas con matriz ósea alogénica.

Jirattanaphochai y col. en 1993¹⁰⁰ estudiaron la incorporación de aloinjertos y BMP porcina en conejos a los que se trataba con metilprednisolona llegando a la conclusión de que ésta inhibía la formación ósea inducida por la BMP porcina y la incorporación del aloinjerto óseo.

I.h.- LINEAS DE INVESTIGACION EN EL CAMPO DE LA OSTEOINDUCCION

Los estudios sobre la inducción de la osteogénesis se han desarrollado a partir de líneas de investigación individuales pero relacionadas. Una primera línea consiste en estudios clínicos y experimentales de reparaciones inducidas por matriz ósea en defectos óseos y en pseudoartrosis^{60,61}; los mayores esfuerzos en este sentido se han dirigido hacia las observaciones de la influencia de la BMP en la reparación de defectos óseos en ratas, perros, monos y humanos^{20,58,74,100,101,102,103,120,130,134,160,178,195,217,218,267,280,283}. Una segunda línea de trabajo consiste en las investigaciones bioquímicas sobre el crecimiento óseo^{24,25,26,58,109,162} y el estudio de una proteína morfogenética ósea^{120,217,218,250,280}; la investigación sobre la BMP se halla orientada hacia su caracterización y la producción biosintética que induzca poblaciones celulares^{25,28,138,270,274,275}. La última línea de investigación sería el uso de biomateriales como alternativas al injerto óseo y como vehículos portadores de BMP^{109,150,168,192}.

1.- Investigaciones clínicas y experimentales

La posibilidad de que la BMP pueda inducir el crecimiento y regeneración ósea mediante el implante de matriz ósea¹²⁸ o por una preparación parcialmente purificada de proteínas no colágenas se ha evaluado tanto en defectos experimentales^{20,58,74,100,103,120,130,134,160,161,163,178,195,212,217,218,280,283}

como en pacientes con defectos óseos clínicos^{74,101,102,104,105,172,173,222,280}. Johnson EE¹⁰¹ en 1988 utilizó BMP en seis pacientes con defectos tibiales segmentarios de 3 a 17 centímetros y en doce pacientes con pseudoartrosis femoral, desarrollando una sólida unión mediante el implante de 50-100 mg de BMP-humana (hBMP), en cápsulas de gelatina o en PLA/PGA (copolímeros de poliácido láctico y poliglicólico) e injertos esponjosos autólogos junto a una estabilización de la lesión. Uno de los datos más significativos fué que la hBMP puede ser implantada sin ningún tipo de efectos perjudiciales, además se sugiere que la hBMP aumenta la capacidad del lecho del huésped para regenerar grandes defectos segmentarios en la diáfisis tibial. El mismo autor ha utilizado clínicamente BMP humana purificada con éxito en el tratamiento de pseudoartrosis de fémur¹⁰² y de tibia¹⁰⁵ en los años 1988 y 1990. Desafortunadamente esta hBMP purificada está disponible en cantidades limitadas.

Las proteínas morfogenéticas óseas humanas producidas por métodos de recombinación (rhBMPs) presentan importantes ventajas sobre la extraída de la matriz ósea para el uso clínico. Pueden ser producidas en cantidades ilimitadas y con mayor pureza⁵⁸. Tras el aislamiento de siete rhBMPs en 1988 por Wozney y cols²⁷⁹, Wang y cols en 1990²⁷⁵ han demostrado que la rhBMP-2 induce formación ósea ectópica en ratas.

Xiaobo y col. en 1993²⁸⁰ realizaron un estudio clínico experimental con gelatina de matriz ósea humana insoluble (hBMG). Después de comprobar la actividad osteoinductiva de la hBMG en ratones se implantó en 24 pacientes que presentaban fracturas, pseudoartrosis o retrasos de consolidación y tumores. La aparición de hueso fué clara en torno a los dos meses y la curación de las lesiones se produjo en torno a los 4-6 meses. La respuesta inmunológica en los ratones fué muy baja, solamente pequeñas cantidades de linfocitos migraron y se acumularon alrededor de la hBMG, pero no evitó la formación ósea en 2-3 semanas.

La antigenicidad del hueso es debida principalmente a los componentes celulares, proteínas no colágenas y colágeno. En este trabajo, los componentes celulares y el 95% de las proteínas no colágenas se han extraído mediante métodos químicos y por tanto la poca antigenicidad es debida al colágeno que ya Friedlander⁵⁵ advirtió su poca capacidad antigénica.

En cualquier caso estas observaciones clínicas sólo representan una evidencia circunstancial, siendo necesario mayores estudios a doble ciego, randomizados y multidisciplinarios. En otras series en las que no se utilizó hBMP¹⁴⁶ fueron incapaces de obtener la unión sin múltiples operaciones y además el promedio de tiempo para la consolidación fué de aproximadamente un año. Si el implante de hBMP prueba ser un avance en el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas y si se encuentran portadores biológicos adecuados para la liberación de BMP, el éxito para las pseudoartrosis y los defectos óseos segmentarios sería prácticamente total.

Johnson y col. en 1990¹⁰⁵ utilizaron BMP humana (hBMP) en el tratamiento de defectos óseos en la metafisis tibial secundarios a pseudoartrosis infectadas consiguiendo la consolidación de la lesión en todos los casos al cabo de 4,4 meses. En dos pacientes, la hBMP incluía otras proteínas no colágenas de la matriz ósea (BMP/NCP) y se vehiculizaron en poliácido láctico-poliglicólico, en otro paciente se utilizó una cápsula de gelatina absorbible y en el último caso se añadió a la cápsula un compuesto de hueso alogénico corical. No hubo evidencia clínica ni radiológica de respuesta inmunológica a la BMP/NCP.

Defectos óseos que no consolidarían de forma espontánea a lo largo de la vida media de una rata o de un conejo, regenerarán únicamente implantando matriz ósea desmineralizada. Defectos óseos comparables en especies con una vida media mayor, por ejemplo, perros, monos y humanos no regenerarán sin un trasplante de hueso o BMP y médula ósea autóloga. En perros, defectos segmentarios de 2 cm. en el límite de la talla crítica, regenerarán con un implante de BMP sin

necesidad de un trasplante de médula ósea siempre que el sistema de liberación de la BMP esté formado por otras proteínas no colágenas de la matriz ósea y los extremos óseos se encuentren abiertos con un libre acceso al estroma hematopoyético de la médula ósea.

Gerhart y col. en 1993⁵⁸ estudiaron la reparación de un defecto osteoperióstico diafisario de fémur de 2,5 cm de longitud en ovejas en las que se utilizó la proteína morfogenética ósea humana recombinada 2 (rh-BMP-2) y comprobaron que en el grupo tratado con la proteína vehiculizada en matriz ósea inactiva de ovejas apareció consolidación del defecto a las doce semanas. Además no se detectó ningún anticuerpo anti-rhBMP-2 probablemente debido a la mayor pureza de esta proteína y a la similitud en la secuencia de aminoácidos con la BMP ovina.

Kawamura y col.^{113,114} estudian la formación del callo en la interfase hueso-periostio en respuesta a la BMP. Para ello implantan BMP en cápsulas de gelatina, sola o mezclada con PLA/PGA en forma granular o junto a médula ósea, bajo el periostio. Demuestran que éste puede activarse por células troncales osteogénicas de la médula ósea y aún puede activarse más intensamente por el implante de BMP. Bajo la influencia de la BMP, la formación del callo y el desarrollo óseo se instaura sin ningún tipo de fractura.

Hulth y col.⁹⁰ demuestran como la BMP se libera en los extremos fracturarios del hueso. Este autor observa como los implantes de los extremos desmineralizados de las fracturas de tibia, tomados en diferentes intervalos tras las fracturas, se comportaron como inductores óseos más potentes que los implantes de matriz ósea desmineralizada en ratas Sprague Dawnley. La neoformación ósea más rápida se produjo en los extremos de la fractura a los ocho días. La cuestión estriba en cómo el hueso fracturado es capaz de liberar BMP, que únicamente es accesible después de la desmineralización. La hipótesis de este equipo de trabajo es que la BMP es exudada a partir de los extremos óseos del hueso fracturado y de forma particular a partir de las trabéculas óseas neoformadas en el periostio y en la médula. Por otra parte, la matriz de las fracturas (excepto

en el primer día) podría tener una superficie de contacto mayor con células potencialmente respondedoras, debido a la presencia de las trabéculas óseas del callo¹⁰¹.

Yasko y col. en 1992²⁸³ estudian el efecto de la rhBMP-2 en defectos óseos de 5 mm en ratas, observando que en todos los casos se produce hueso a través de un mecanismo de osteoinducción entre la 2-4 semanas y que la cantidad es dosis dependiente. La matriz ósea alogénica desmineralizada con guanidina se utilizó como vehículo portador de la proteína.

El clonaje del gen de la interleukina-1 (IL-1) y la disponibilidad de rIL-Delta y rIL-Beta humana han animado no únicamente a la investigación "in vitro" de los efectos de pequeñas dosis de rIL-1 sobre la condrogénesis inducida por BMP⁴⁴, sino también a la relación dosis-respuesta de la rIL-1 sobre ratones con osificación heterotópica inducida por BMP¹⁴⁰. Los trabajos realizados por Mahypr y col.¹⁴⁰ con rIL-1B muestran que la cantidad total de hueso heterotópico es dos a seis veces mayor en comparación con los implantes de BMP b ovina o humana sola. Las dosis de rIL-1 aumenta visiblemente la formación ósea cuando se acompaña del implante de BMP alcanzando una meseta con 100 Unidades inyectadas, la IL-1 sola no produce formación ósea y la BMP sola produjo menos formación. La IL-1 es un potente estimulante para la proliferación de osteoclastos y sus células precursoras^{9,44,66}. Estas células en contacto con los osteoblastos pueden liberar o inducir la producción de un factor osteoblástico asociado o dependiente de la BMP para aumentar la formación ósea⁶⁴. Berresford y col.⁹ observaron como la IL-1 estimula la proliferación celular ósea; sin embargo en condiciones específicas "in vitro", la IL-1 también estimula las células óseas resortivas y las formadoras⁶⁶.

Gowen⁶⁶ observó como la estimulación de la reabsorción ósea por la IL-1 no era dependiente de la síntesis de PG por las células. La IL-1 parece ser un nuevo y distinto agente resortivo óseo y además puede

aumentar la síntesis de colágeno Tipo I y de glicosaminoglicanos en osteoblastos.

De todo lo anterior se deduce que la IL-1 puede tener un papel de regulación en el metabolismo del tejido conectivo, por tanto puede modular tanto los osteoclastos como las actividades sintéticas de los osteoblastos y podría ser en este sentido, uno de los mecanismos responsables del proceso de acoplamiento entre destrucción y formación ósea.

Los trabajos de Lindholm^{128,129} aportan más datos a esta línea de trabajo. Observó que la producción de hueso es mayor en los injertos compuestos de matriz y de médula ósea que en los trasplantes de matriz ósea o de médula ósea aislados. El fenómeno de neoformación ósea parece ser incluso más pronunciado con implante de células de la médula ósea y matriz ósea desmineralizada.

2.- Situación actual de la BMP

Un inconveniente con el que nos encontramos es la obtención de muy poca cantidad de BMP a partir de grandes cantidades de hueso. Las dosis de BMP purificada necesarias para inducir la formación ósea son muy altas. Implantes de aproximadamente 1 mg de BMP humana aislada induce cantidades apenas detectables de volúmenes de hueso, pero 1 mg de agregados de proteínas (que incluyen BMP) con peso molecular de 24 y 14 kD induce la formación de un relativo gran volumen de hueso, por lo que es razonable asumir que las impurezas pueden servir como portadores²⁵⁶. Sin embargo, se necesitan de 5 a 10 mg. de BMP humana, impura o purificada, para observar una inducción de formación ósea visible macroscópicamente.

Otro inconveniente con el que nos enfrentamos es el hecho de que el implante de matriz ósea por sí solo es insuficiente. Se ha observado como los implantes de BMP bovina (bBMP) en los músculos se

reabsorben rápidamente. En los ratones, Sato¹⁹⁰ observó como la bBMP se reabsorbió complementamente dentro de las 2 ó 3 semanas y casi invariablemente indujo la formación de hueso. Sin embargo, en los perros, con un índice de actividad metabólica mucho menor, el implante de bBMP en los músculos cervicales también se absorbió rápidamente y fracasó en la inducción de cartílago o hueso a las 8 semanas del implante. En resumen, cuando se realizan implantes de BMP sin un portador, la rápida desaparición del implante, mucho antes de que la respuesta en el lecho sea completa, indica que es necesario un sistema de liberación y de soporte calibrado que nos permita obtener un gradiente óptimo de concentración de BPM en el foco.

Las últimas investigaciones se centran en el estudio sobre la purificación de la BMP humana y la extraída de osteosarcomas murinos^{28,120,138,218,270,274,275,279} y el estudio de la inducción de las células mesenquimales para transformarse en condrocitos, utilizando cultivos tisulares^{65,107,203,221}. Su fin es el de intentar profundizar en el mecanismo íntimo de la osteoinducción.

Kataoka y Urist en 1993¹⁰⁷ estudian el efecto de cultivos tisulares de tejido conectivo muscular y médula ósea de ratas sometidos a la acción de BMP bovina y otras proteínas no colágenas de la matriz ósea (BMP/NCP). Estos cultivos son transferidos a cámaras de difusión e implantados en la pared abdominal anterior de ratas. Las dos poblaciones celulares, después de haber sido sometidas a la acción de la BMP, son capaces de inducir hueso en el huésped.

Syftestad en 1984²⁰⁸ y Beresford en 1989¹⁰ observaron como las células mesenquimales en cultivo son capaces de diferenciarse en condrocitos, pero son incapaces de diferenciarse a osteoblastos. Estas preparaciones obtenidas "in vitro" e implantadas a un animal dan lugar a una condrogénesis ectópica y a una posterior osteogénesis²⁴⁹. El mecanismo por el cual se produce este fenómeno es desconocido²⁷¹. Canalis²⁴ demuestra que la BMP purificada estimula la síntesis de DNA y la replicación celular en cultivos de fibroblastos pero no estimula una

función osteoblástica diferenciada en los cultivos de órganos. La respuesta a la matriz ósea osteoinductiva termina "in vitro" en la condrogénesis y las condiciones ambientales necesarias para la posterior formación ósea, únicamente pueden hallarse en el animal vivo, no pudiendo actualmente ser duplicada en cultivo^{137,190,221}.

Beresford en 1989¹⁰ estudió la relación de las células osteogénicas con el estroma de la médula ósea para corroborar la hipótesis de que las células de estirpe osteogénica, que incluyen osteoblastos y condroblastos, derivan de una misma célula indiferenciada del estroma medular en el organismo postnatal. Realizó cultivo de fibroblastos del estroma medular. Estos cultivos no demostraron diferenciación osteogénica "in vitro". Cuando se transplantaron "in vivo", en cámaras de difusión mostraron diferenciación hacia cartílago y hueso. Las colonias de fibroblastos formadas "in vitro" a partir del estroma medular se denominan CFU-F (unidades formadoras de colonias de fibroblastos). Una proporción de estas CFU-F muestran un gran potencial proliferativo "in vitro" e "in vivo". Los resultados del trabajo apoyan la hipótesis de que existen estirpes celulares presentes en el estroma de la médula ósea capaces de transformarse en diferentes líneas celulares, incluyendo la línea osteogénica (condroblastos y osteoblastos).

Mediante el estudio de estos cultivos tisulares se ha podido demostrar como la BMP induce diferenciación de las células de tipo mesenquimal y posiblemente también de los mioblastos a precondroblastos y condrocitos formándose un tejido cartilaginoso organizado^{114,191}, Fig. 7.

3.- Biomateriales

Varias razones hacen que esta línea de investigación ocupe un capítulo importante en el estudio de la regeneración ósea.

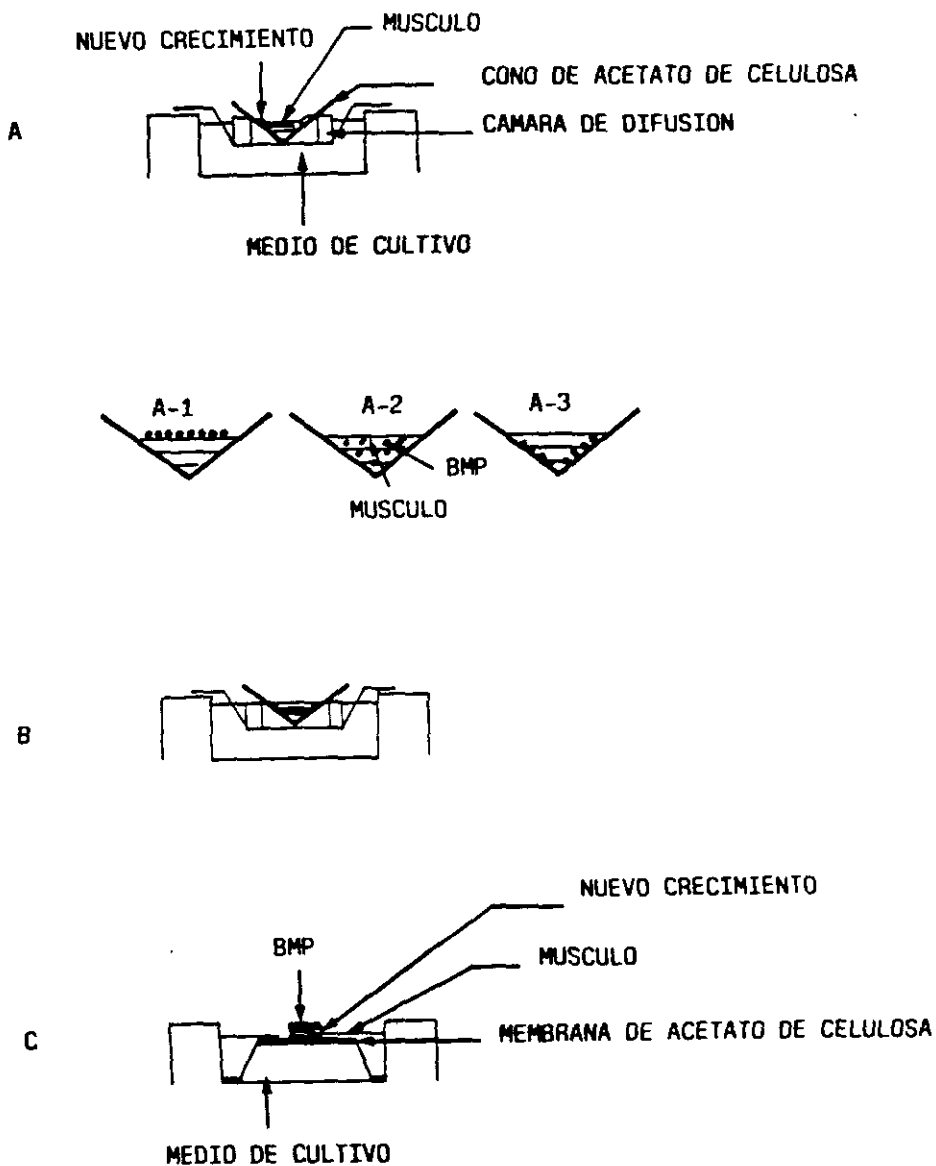


Fig. 7.- Representación gráfica de un sistema de cultivo de órgano ^{35,114}. (A): Aplicación de BMP sobre el músculo. (B): Aplicación de BMP en músculo y en medio de cultivo. (C): Aplicación de BMP sobre el músculo, a través de una membrana.

1. Se necesita un material de injerto que soporte el defecto óseo: Si este material además se reabsorbiera de una forma gradual a medida que se va reemplazando por el nuevo hueso inducido (por acción de la BMP), la reconstrucción clínica se llevaría a cabo de una manera más efectiva.

2. Se necesita un material de injerto que actúe como vehículo de transporte de la BMP: Se obtiene muy poca cantidad de BMP a partir de grandes cantidades de hueso; son necesarios 10 Kg de hueso para obtener 1 gramo de BMP. Por otra parte las dosis de BMP purificada necesarias para inducir la formación ósea son muy altas. A esto hay que añadir que la BMP se va a reabsorber muy rápidamente de la zona del implante. Todos estos inconvenientes nos hacen comprender la inminente necesidad de la utilización de un biomaterial que actúe como vehículo portador para esta proteína. Desafortunadamente, la implantación de BMP purificada e hidrosoluble sin un portador generalmente no produce respuesta osteoinductiva debido a la rápida difusión de la proteína del lugar de implantación^{157,216}. Para solventar este problema, es necesario un sistema que permita una liberación mantenida de BMP y pueda manifestar la actividad osteoinductiva de ésta. Idealmente, este portador debería ser inmunológicamente inerte y susceptible de ser absorbido por los tejidos del huésped. El producto así obtenido constituiría un importante sustituto del injerto óseo¹⁴⁹.

En resumen, cuando se realizan implantes de BMP sin un portador, la rápida desaparición de éste, mucho antes de que la respuesta en el lecho sea completa, indica que es necesario un sistema de liberación y de soporte calibrado que nos permita obtener un gradiente óptimo de concentración de BMP en el foco.

3.a.- Sistemas de soporte y su relación con la regeneración ósea

Se han realizado numerosos estudios con el fin de hallar el mejor material a utilizar como sistema de soporte. Durante mucho tiempo se

utilizó el yeso como material de relleno de defectos óseos, demostrándose como se reabsorbía rápidamente "in vivo" pero tenía el inconveniente de alterar los niveles plasmáticos de calcio¹⁶⁶.

Otros autores han preconizado que el método más simple en los grandes defectos óseos sería el reimplante de los tumores óseos resecados después de un proceso de autoclave, lo que nos ofrece igual talla y forma¹⁰¹. El proceso estandar de autoclave (121° C, 20 minutos), causa una reducción moderada de la fuerza de torsión (23%) y de la rigidez (20%) de la diáfisis ósea; esto indica que, desde el punto de vista mecánico, el hueso permanece como un sustituto esquelético adecuado tras el proceso de autoclave. La mayor objeción a este tipo de implante es que ya se sabe que va a tener una baja capacidad osteogénica, pues causa una desnaturalización de las proteínas, incluyendo lógicamente la BMP^{128,243}. Köhler y col.¹¹⁸ realizaron estudios utilizando este tipo de reimplante tratado mediante el proceso de autoclave, añadiendo además matriz ósea desmineralizada. Esta indujo la formación de nuevo hueso a lo largo de la reconstrucción esquelética, y una vez que se logra la unión del defecto esquelético, la continuidad ósea prevalece y el hueso viable puede ser sometido a carga mecánica. La utilización de matriz ósea desmineralizada demostró que tiene una importancia decisiva para la incorporación de los implantes óseos tratados por autoclave⁶⁸. La reconstrucción de grandes defectos esqueléticos utilizando unicamente matriz ósea desmineralizada alogénica o autóloga parece asociarse a uniones incompletas²⁷⁸. El hueso reimplantado podría actuar como un estabilizador temporal, hasta que se obtiene una continuidad ósea viable. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que en estos tipos de experimentos no se han investigado todavía las reacciones inmunológicas que puedan acontecer con el uso de hueso tratado por autoclave y por otra parte, parecen existir recidivas tumorales.

En la pasada década muchos biomateriales sintéticos, incluidas las cerámicas inertes como las de aluminio y las bioactivas como las cerámicas de fosfato cálcico (entre las que se incluyen la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico) han sido objeto de investigación con el fin de tener una alternativa adecuada al hueso autólogo^{98,117,119,226,227,228}. Como sistema

de soporte, la hidroxiapatita (HPA) implantada en los defectos óseos como un hueso artificial, proporciona un adecuado soporte para la nueva formación ósea^{58,85,109,192}. Sato y col. en 1991¹⁹² estudiaron el potencial osteoconductor de BMP de conejo, hidroxiapatita, fibrina (fibrinógeno humano esterilizado y trombina) y varias mezclas de estos componentes en defectos óseos creados en los cóndilos femorales de conejos. Observaron que la fibrina es capaz de mantener a la BMP unida a la hidroxiapatita y de esta forma facilitar la osteoinducción. En los grupos que se combinaban los tres componentes, la cantidad de hueso neoformado por osteoinducción y osteoconducción^{154,265} fue mayor que en el resto, apareciendo hueso laminar en contacto directo con la hidroxiapatita al cabo de las ocho semanas.

Implantes metálicos de superficie porosa se utilizan habitualmente como atroplastias de sustitución y el crecimiento óseo en éstos ha sido demostrado por Engh y col.⁴⁵. Sin embargo, la unión hueso-implante es mecánica y no química por lo que se ha intentado mejorar esta unión recubriendo los implantes con hidroxiapatita mediante plasma-"spray"⁴¹ aunque en los resultados obtenidos no se ha observado diferencia en el volumen de hueso formado en el implante entre las prótesis cubiertas con hidroxiapatita y las prótesis porosas de titanio¹⁷⁹. En esta línea de trabajo, Kotani y col.¹¹⁹ en 1992 estudiaron el efecto del polvo óseo desmineralizado (DBP) en la unión de hueso neoformado a cerámicas bioactivas. El DBP contiene factores osteoinductores como la BMP^{259,279}. En este trabajo utilizaron DBP alogénico que incluían en la cavidad medular de la metafisis proximal de conejos y placas rectangulares de apatita-wollastonita observando que entre las dos y las ocho semanas, el hueso inducido por el DBP en la cavidad medular se unía a la cerámica. Los exámenes histológicos y de microscopía electrónica de barrido demostraron que esta unión era química mediante una capa de hidroxiapatita similar a la del hueso de forma que al cabo de 25 semanas la resistencia adquirida por la cerámica y el hueso neoformado no difería de la del hueso intacto.

Dentro de los poros de HPA proliferarían los osteoblastos activos y el osteoide evolucionaría a hueso laminar. Sin embargo estudios histológicos²²⁶ han demostrado como en una gran parte de los casos los poros de HPA estaban rellenos de material fibroso.

Varios estudios experimentales se han realizado utilizando hidroxiapatita con una porosidad de en torno a las 150-200 μ en localizaciones ortotópicas y heterotópicas^{82,83,84,119,167,192}, sin embargo existe poca información sobre hidroxiapatita con una porosidad de 600 μ , similar a la del hueso esponjoso de la cresta ilíaca humana⁸³. Mientras que la implantación ortotópica en aposición con hueso viable ha mostrado una clara evidencia del potencial osteoconductor de ambos tipos de hidroxiapatita, la implantación heterotópica ha descartado su potencial osteoinductor¹⁶⁷. Ripamonti¹⁷⁶ realizó implantes intramusculares de hidroxiapatita con una porosidad de 600 μ , obtenido después de la conversión hidrotérmica del exoesqueleto de coral, en mandriles adultos y observó la aparición de hueso en cantidad progresiva desde los tres a los nueve meses. Esta morfogénesis ósea estaba íntimamente relacionada con condensaciones de tejido conjuntivo y no apareció en ningún momento una fase endocondral. Una posibilidad que explica esta osificación directa es que la osteogenina, proteína que inicia la diferenciación ósea y está presente en el plasma sea adsorbida a la hidroxiapatita y de esta forma comience la morfogénesis ósea^{176,189}.

Se piensa que la HPA porosa tiene una cierta capacidad osteoconductor pero no tiene una capacidad osteogénica u osteoinductor por si misma¹⁷⁶. Si pudiera formarse una cantidad de nuevo hueso dentro de los poros de HPA y pudiera alcanzarse una unión más fuerte con el tejido óseo circundante, se podría minimizar la desventaja de la debilidad mecánica que existe con el uso de la HPA demasiado porosa. Con el fin de poder desarrollar una HPA con una mayor actividad morfogenética, Kawamura y col.¹¹⁰ prepararon un extracto crudo de BMP unido a HPA, incluyendo la proteína dentro de los poros del biomaterial.

Sato y col en 1991¹⁹² estudiaron el efecto de la hidroxiapatita, la BMP no purificada obtenida de la cortical desmineralizada de conejo, fibrina humana (fibrinógeno y trombina humana esterilizada) y combinaciones de estos componentes sobre defectos óseos creados en los cóndilos femorales de los conejos. Observaron que los compuestos de hidroxiapatita con BMP y los de hidroxiapatita con BMP y fibrina produjeron mayor cantidad de hueso entre los poros de la hidroxiapatita que la fibrina o la hidroxiapatitas solas.

3.b.- Como vehículos de transporte y distribución de BMP

Como vehículos de transporte de BMP se han utilizado materiales orgánicos e inorgánicos. Urist y col., Lucas y col. y Muthukumaran y col. señalaron la necesidad de desarrollar un sistema de liberación de BMP a partir de un vehículo natural o sintético que mantenga concentrada la BMP, que se degrade fisiológicamente y se reemplace por cartílago y hueso en un relativo corto periodo de tiempo; tejidos preóseos en dos semanas, cartílago en tres y hueso en cuatro a seis semanas^{136,155,262,282}. Además es deseable que el material compuesto tenga consistencia para servir de soporte al defecto óseo y sea inmunologicamente inerte¹⁵⁰.

Se han ensayado diferentes tipos de sistemas de liberación y distribución de BMP. Sato y Urist¹⁹⁰ y Lucas¹³⁶ utilizaron sistemas naturales de distribución de BMP compuestos de la matriz proteica del ácido gamma-carboxi glutámico, colágeno y fosfato cálcico. El agregado de matriz proteica del ácido junto con la BMP retarda la resorción y el desplazamiento de BMP a partir del lecho del huésped. Con respecto a la utilización del colágeno, parece que se resuelven los mismos problemas^{68,155}; se cree que las moléculas de colágeno podrían prevenir la rápida difusión y pérdida de las moléculas de BMP, permaneciendo esta proteína el tiempo suficiente como para inducir la formación ósea. El colágeno puede ser demasiado antigénico y se absorbe quizás de forma excesivamente lenta. Sin embargo, parece ser que la matriz rica en ácido

gamma-carboxiglutámico, se reabsorbe demasiado rápidamente, o bien es fagocitada antes de que tenga lugar la transferencia de BMP a la superficie de los receptores de las células diana. El sistema ideal sería aquel en el que la BMP pudiera ser liberada a partir de un coágulo fibrinoso o de un fluido seroso durante un período de tiempo suficiente para obtener una densidad de población óptima de células mesenquimales migratorias respondedoras de BMP²⁶⁷.

En un estudio realizado por Kawamura y Urist¹¹⁴, se utilizó fibrina "empaquetada" como sistema de transporte y distribución de BMP. Este tipo de fibrina se ha utilizado como adhesivo en cirugía cardiovascular, cirugía nerviosa y cirugía ortopédica^{112,192,193}. A causa de las propiedades biológicas y fisiológicas de unir los tejidos vivos y de proporcionar la hemostasis, pensaron que podría ser de interés su utilización en este campo de investigación, pudiendo ser un buen distribuidor portador biodegradable de BMP.

Otra línea de investigación en este campo es la utilización de fosfato-beta tricálcico (TCP) y de hidroxapatita (HPA) como sustitutos óseos^{86,110,116}. El TCP y la HPA tienen la ventaja de ser materiales no biológicos y no inmunogénicos, pero no tienen capacidad osteoinductiva o reparadora ósea¹⁶⁷, únicamente guían la formación ósea a partir del hueso huésped²⁸¹. Como sistemas de liberación de la BMP, el TCP puede ser mejor que la HPA ya que ésta no es soluble en el líquido extracelular "in vivo". Urist y col.²⁵⁸ implantaron un compuesto biodegradable de TCP y BMP en un músculo de ratón y hallaron que la producción de nuevo hueso fue doce veces mayor que la de BMP sola. EN 1987, el mismo autor²⁶⁵ implantó un disco de TCP con BMP soluble en agua (TCP-BMP) en un defecto craneal de suficiente tamaño como para no poder regenerarse de forma espontánea. El TCP-BMP implantado indujo depósitos de nuevo hueso pero el TCP estuvo presente cuatro meses después del implante. Urist sugiere que es necesario una mayor investigación en este campo con el fin de encontrar una fórmula de calcio-fosfato que puede ser reabsorbida y reemplazada por hueso de forma más rápida y fácil que el TCP.

Iyoda y col. en 1993⁹⁶ estudiaron el efecto de condrocitos cultivados y unidos a hidroxiapatita en la reparación de defectos óseos de conejo. Los condrocitos se extraían de la cresta ilíaca, se cultivaban durante dos semanas junto a bloques de hidroxiapatita porosa con un tamaño de poros de 200μ . Al cabo de este tiempo se creaba en el mismo conejo un defecto cubital de 6 mm en el que se colocaba el bloque de hidroxiapatita que contenía los condrocitos. Entre las 4 y las 6 semanas se apreciaba un importante crecimiento óseo y a las 13 semanas los implantes eran reabsorbidos y rodeados por hueso que contenía médula ósea. Los osteoblastos serían preferibles a los condrocitos, pero su obtención es difícil cuando se pretenden realizar aplicaciones clínicas en humanos. Los resultados obtenidos con este estudio sugieren que los implantes de hidroxiapatita-condrocitos permiten una fijación y reparación temprana en grandes defectos óseos.

Böstman en 1991¹⁸ realizó un estudio sobre los biomateriales utilizados como implantes absorbibles en el tratamiento de las fracturas llegando a las siguientes conclusiones:

- 1.- Muchos compuestos macromoleculares orgánicos han sido utilizados como implantes biodegradables, pero solo el poliácido láctico, el ácido poliglicólico y la poliparadioxanona poseen las propiedades químicas y físicas necesarias para ser utilizados en el tratamiento de las fracturas.
- 2.- Químicamente, estos polímeros son alfa poliésteres completamente absorbibles en el tejido óseo y el hueso neoformado es depositado en o sobre el implante cuando se lleva a cabo el proceso de degradación.
- 3.- La degradación de estos polímeros ocurre principalmente por escisión hidrolítica y en menor proporción a través de una acción enzimática no específica. La diferencia en el metabolismo final de estos polímeros es pequeña y sus metabolitos finales tras entrar en el ciclo del ácido tricarbóxico son CO_2 y H_2O que son eliminados por la respiración. La

excreción de metabolitos intermedios a través de la orina y las heces es mucho menos importante.

4.- El peso molecular, la cristalinidad, las características térmicas y la geometría de los implantes influyen considerablemente en el proceso de degradación. Un implante de poco espesor se degrada mucho más rápido que uno denso. Sin embargo, la degradación no implica una absorción inmediata del implante.

5.- La única complicación que presentan estos polímeros es una reacción inflamatoria inespecífica de cuerpo extraño con abundantes células gigantes fagocitando restos del polímero. Teóricamente, esta respuesta inflamatoria disminuiría con el uso del poliácido láctico, que presenta una degradación más lenta que el ácido poliglicólico y el copolímero poliácido láctico-ácido poliglicólico.

Hollinger en 1983⁸⁰ observó que defectos óseos en tibias de ratas que contenían un implante del copolímero poliácido láctico-ácido poliglicólico en un proporción del 50% consolidaron más rápido que aquellos que no tenían el implante, sugiriendo el potencial osteoconductor de estos biomateriales. Schmitz y Hollinger en 1988¹⁹⁶ obtuvieron resultados similares cuando combinaron el copolímero con polvo óseo desmineralizado alogénico.

Nelson y col. en 1977¹⁵⁹ fueron los primeros que utilizaron el copolímero PLA-PGA con el fin de evaluar el potencial osteogénico en la reparación de lesiones óseas, observando una curación de éstas. Higashi y col.⁷⁷ utilizaron PLA-HPA para reparar lesiones endocondrales en ratas; el PLA se reabsorbió en tres semanas y se reemplazó por nuevo hueso que se formó en contacto directo con la HPA. Schmitz JP¹⁹⁶ utilizó los alfa-hidroxi poliesteres polilácticos (PLA) y el poliglicólico (PGA) como material de implante para la reparación del tejido óseo. Estudian el potencial osteogénico de un copolímero biodegradable (PLA-PGA) combinado con un hueso alogénico desmineralizado en la reparación de

los defectos craneales en conejos. Un posible uso de este polimero es el de portador de agentes osteogénicos como la BMP.

A pesar de la frecuente aplicación clínica de materiales metálicos, prácticamente no existen estudios que combinen la BMP con éstos. Kawai y col. en 1993¹⁰⁹ estudiaron la capacidad osteoinductiva de compuestos de titanio y BMP. Utilizaron el titanio debido a su mayor biocompatibilidad con respecto a otros metales. Los compuestos estaban formados por titanio rugoso y BMP parcialmente purificada que era adherida al metal a través de una solución gelatinosa y después liofilizada. Los implantes se realizaban en los músculos del muslo de ratones. Observaron que no había diferencia significativa entre la cantidad de hueso formado en el grupo control (BMP sólo) y en el grupo titanio-BMP al cabo de tres semanas. El hueso neoformado estaba en contacto directo con la superficie de titanio pero no existía una unión química. Cuando la BMP se combinaba con hidroxiapatita o fosfato tricálcico, la actividad osteoinductiva de la BMP se ve aumentada¹¹⁰, comparado con estas dos cerámicas, el titanio mostró en este trabajo un área de neoformación ósea ligeramente más pequeña. La liberación de iones de titanio del implante no inhibieron la osteoinducción. El resultado final del estudio fue satisfactorio pudiendo utilizarse el titanio como un portador de BMP que no altera la capacidad osteoinductiva de ésta y además posee mejores propiedades mecánicas que las cerámicas para su uso en el tratamiento de grandes defectos óseos.

En recientes estudios, San Román y col.²⁰⁹ y ²¹⁰ han analizado el interés en Ortopedia de diferentes biomateriales. Pihlajamäki y col. en 1992¹⁶⁸ realizaron un estudio clínico en el que utilizaron agujas de poliácido láctico de 250 kD en el tratamiento de fracturas y osteotomías de huesos que no tenían que soportar cargas axiales. No observaron signos inflamatorios de cuerpo extraño y en dos casos en los que se realizó una biopsia al cabo de 20 y 37 meses no observaron respos del biomaterial. Miyamoto y col. en 1992¹⁴⁹ evaluaron polímeros de poliácido láctico (PLA) con diferentes pesos moleculares como portadores de BMP. Para ello utilizaron BMP parcialmente purificada obtenida de osteosarcoma

murino y polímeros de PLA con pesos moleculares de 105000, 21000, 3300, 650 y 160d. Los compuestos contenían 4 mg de BMP hidrosoluble y 100 mg de uno de los polímeros y se implantaron en los músculos dorsales de ratones. Los compuestos PLA105000/BMP, PLA21000/BMP, PLA3300/BMP y PLA160/BMP no indujeron formación ósea; PLA105000, PLA21000 y PLA3300 dieron lugar a una reacción de cuerpo extraño y/o reacción inflamatoria crónica, y PLA160 produjo una necrosis tisular. PLA650/BMP indujo formación de cartílago en una semana y hueso con médula ósea hematopoyética en tres semanas, siendo completamente reabsorbidos. De este trabajo se deduce que solo el PLA650 puede ser utilizado como portador de BMP.

Casteleyn y col. en 1992²⁷ realizan un estudio comparativo en la fijación de fracturas de la extremidad distal del radio tratadas con agujas de Kirschner y de ácido poliglicólico. Los resultados funcionales al cabo de seis meses son mejores en el grupo de las agujas de Kirschner debido a las reacciones inflamatorias de cuerpo extraño que produce el ácido poliglicólico, lo que unido al alto coste de este biomaterial supera la ventaja de no tener que retirar el material de osteosíntesis y por tanto los autores desaconsejan su uso en estas fracturas. Böstman y col. en 1992¹⁹ utilizan tornillos biodegradables de ácido poliglicólico en osteotomías femorales de conejos y estudian el proceso de reabsorción del implante. Los primeros signos de degradación aparecen a las seis semanas acompañado de una reacción inflamatoria de cuerpo extraño inespecífica. Al cabo de 36 semanas se produce la reabsorción completa del biomaterial y se observa una cavidad osteolítica rellena de un tejido de granulación laxo en el lugar que ocupaba el tornillo en algunos animales, mientras que en otros aparece la cavidad rellena de un tejido óseo trabecular. El patrón de respuesta al ácido poliglicólico es altamente variable lo que hace cuestionable su uso clínico en dispositivos de fijación interna de gran volumen.

Heckman y col. en 1991⁷⁴ estudiaron la actividad de implantes cilíndricos de poliácido láctico (no hacen referencia al peso molecular de éste) como portador de BMP purificada^{102,259} en un modelo de

pseudoartrosis en el radio de perros. Observan que los implantes del biomaterial sin BMP producen una pequeña cantidad de hueso al cabo de los tres meses, persistiendo en este momento resto del biomaterial por lo que puede afirmarse que actúa como osteoconductor. En el grupo de poliácido láctico-BMP canina se observó un incremento significativo e la formación de hueso pero no ocurrió igual si la BMP era bovina, de lo que se deduce que el poliácido láctico actúa como un portador de la proteína pero que existe una respuesta específica de especie al menos en los perros.

I.i.- INFLUENCIA DE LAS CITOQUINAS EN LA RESPUESTA DEL TEJIDO ESQUELETICO

Aunque no han sido objeto de nuestro estudio, una breve reseña sobre estas moléculas se hace necesaria debido al importante papel que representan actualmente en la iniciación y control del crecimiento y desarrollo del tejido esquelético así como en la regulación de la remodelación ósea^{28,93,94,211,275}.

Las citoquinas se definen como productos solubles liberados a partir de una célula y que pueden modular la actividad de otras células jugando un papel crítico en la comunicación celular²⁷⁹.

Las citoquinas pueden presentar múltiples actividades biológicas y compartir propiedades funcionales comunes. Basado en esta aseveración, el término citoquina ha sido utilizado de una forma más general para incluir sustancias originalmente descritas como factores de crecimiento, como por ejemplo, las interleuquinas, linfoquinas, etc.^{24,257}.

Las principales citoquinas que parecen jugar un papel sobre el tejido esquelético incluyen factores que previamente se han descrito como "monoquinas o linfoquinas" tales como interleuquina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF-alfa y Beta) e interferon-gamma (IFN-gamma), "factores estimulantes de colonias" y "factores de crecimiento y diferenciación" que incluyen factores de crecimiento transformantes alfa

y beta (TGF alfa y beta), factor I de crecimiento insulina- "like" (IGF-I), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF), que han sido mencionados anteriormente.

Todos estos factores o citoquinas van a intervenir, por vía paracrina o autocrina, en la formación, desarrollo y remodelación ósea.

OBJETIVOS

La técnica de aislamiento de BMP ha sido conseguida con anterioridad en nuestro grupo y comprobado su eficacia³⁵. Con el fin de disponer de un portador para la BMP y un soporte estructural para el crecimiento óseo se ha elegido la hidroxiapatita en bloques cilíndricos porosos recubiertos de BMP. Estos cilindros ocuparían el espacio creado en los fémures de ratas tras la resección de un segmento central diafisario de 1.5 cm de longitud. Para excluir la posibilidad de neoformación ósea a partir de las células osteoprogenitoras de la médula ósea es necesario ocluir el canal medular de los extremos óseos mediante un sistema que sirva al mismo tiempo como medio de osteosíntesis estable. Un alambre de acero inoxidable con forma de "omega" cumpliría estos requisitos con los que se completa el modelo experimental a utilizar.

En definitiva los objetivos a seguir son:

- 1.- Puesta a punto del modelo experimental en ratas, que debe reunir las siguientes características:
 - Creación de un defecto óseo lo suficientemente grande como para no permitir una regeneración espontánea del defecto.
 - Oclusión perfecta de los canales medulares con el fin de que las células osteoprogenitoras de la médula ósea del huésped no puedan colonizar el implante.
- 2.- Estudio del fenómeno de inducción y reparación ósea en los diferentes grupos analizados.

La regeneración del defecto óseo creado mediante osteoinducción mediada por BMP y la asociación de hidroxiapatita supondría un gran avance hacia la resolución de los grandes defectos óseos.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Si la BMP ha demostrado ser un agente osteoinductor de forma aislada, su asociación a un portador supondrá una mayor regeneración ósea.

Si la hidroxiapatita ha evidenciado ser un material osteoconductor en defectos intraóseos, entonces su aplicación en un defecto óseo que no se regeneraría espontáneamente comportará una respuesta similar.

Si el poliácido láctico de bajo peso molecular es un material biodegradable y ocupa los espacios porosos de un cilindro de hidroxiapatita, estos espacios serían susceptibles de ser ocupados por tejido óseo neoformado.

Si asociamos un material inerte con capacidad adhesiva (polimetacrilato de metilo) que permita configurar una estructura de hidroxiapatita porosa y resistente, estas condiciones estructurales se mantendrán en el tiempo tras someterse a carga libre por parte del animal.

Un defecto óseo que no se regenera espontáneamente y se ocupa por un "composite" (compuesto de varias sustancias que interactúan entre sí) formado por hidroxiapatita (material osteoconductor), poliácido láctico (material biodegradable) y polimetacrilato de metilo (material adhesivo) supondrá un soporte estructural para el crecimiento óseo. Si este "composite" además es capaz de vehicular la BMP (agente osteoinductor) tendremos los componentes necesarios para la regeneración del defecto óseo creado.

II. MATERIAL Y METODOS

II - MATERIAL Y METODOS

II.a.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA BMP BOVINA

El material del que partimos es el hueso cortical de terneras de un año de edad. Tras ser sacrificadas en el Matadero Municipal de Madrid se recogen los huesos largos en dicho lugar. Se cortan los extremos epifisarios de éstos y las diáfisis se limpian de tejidos blandos y de médula ósea. A continuación se congelan en nitrógeno líquido, Fig. 8 y se trituran en un molino de cuchillas de la casa Restch hasta obtener partículas de 1 a 3 mm, Fig. 9 y Fig. 10 que son sometidas a un complejo método bioquímico³⁵ que finaliza en un extracto liofilizado de BMP y proteínas no colágenas de la matriz ósea, Fig. 11.

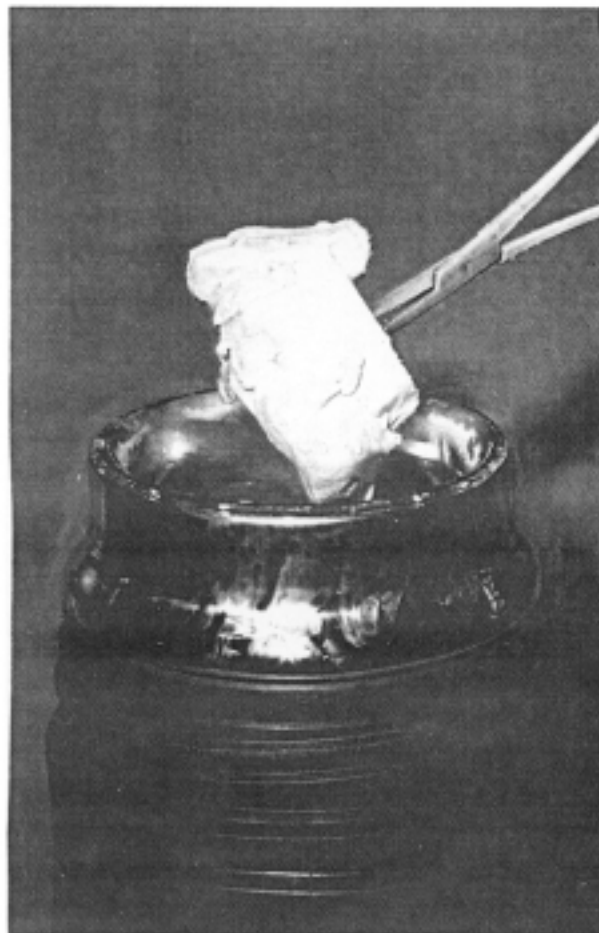


Fig. 8.- Congelación de fragmento de diáfisis ósea en nitrógeno líquido.

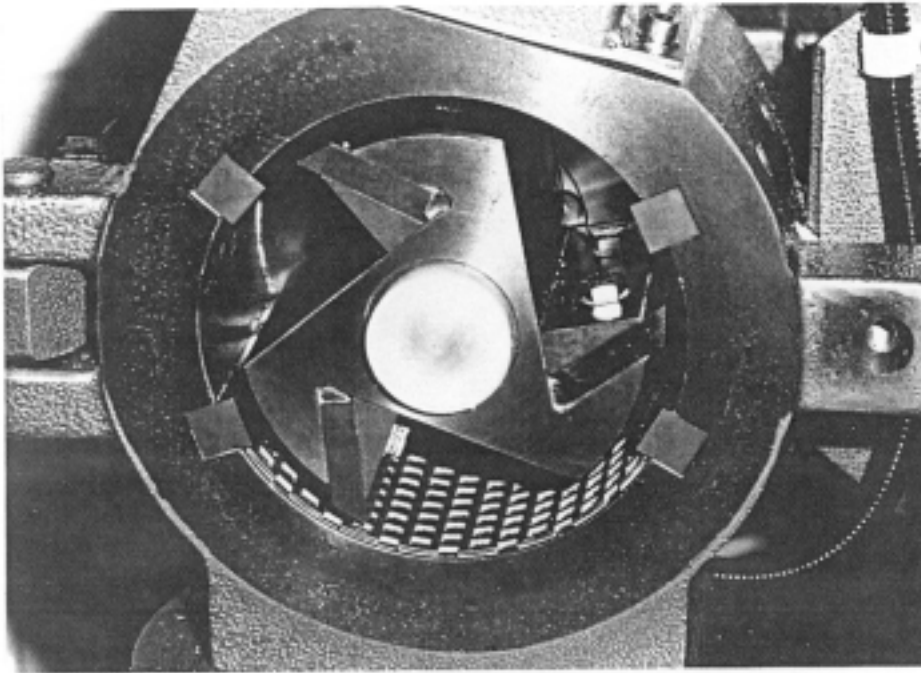


Fig. 9.- Molino de cuchillas (Restch®).

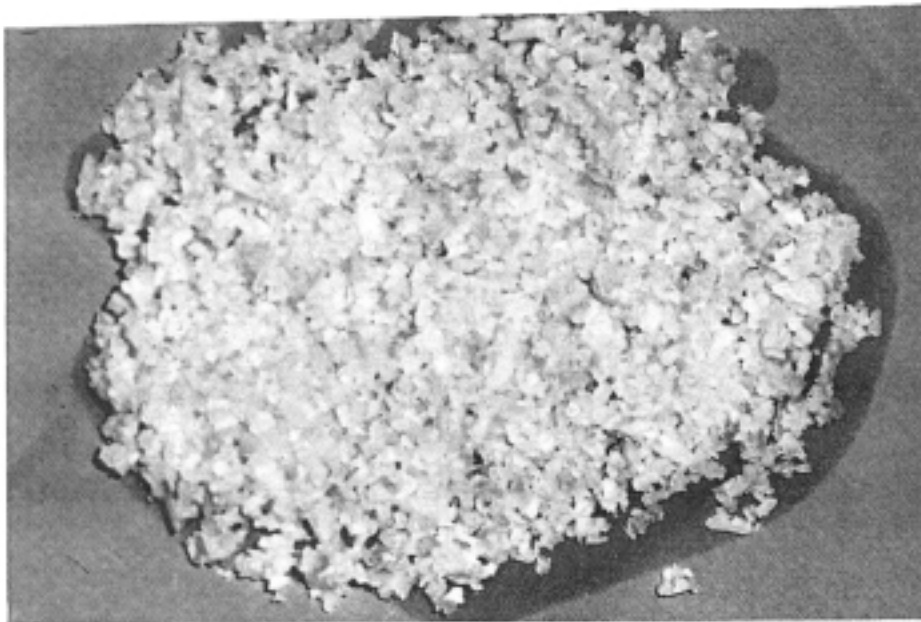


Fig. 10.- Partículas óseas tras la trituración. Su tamaño oscila entre 1 y 3 milímetros cúbicos.

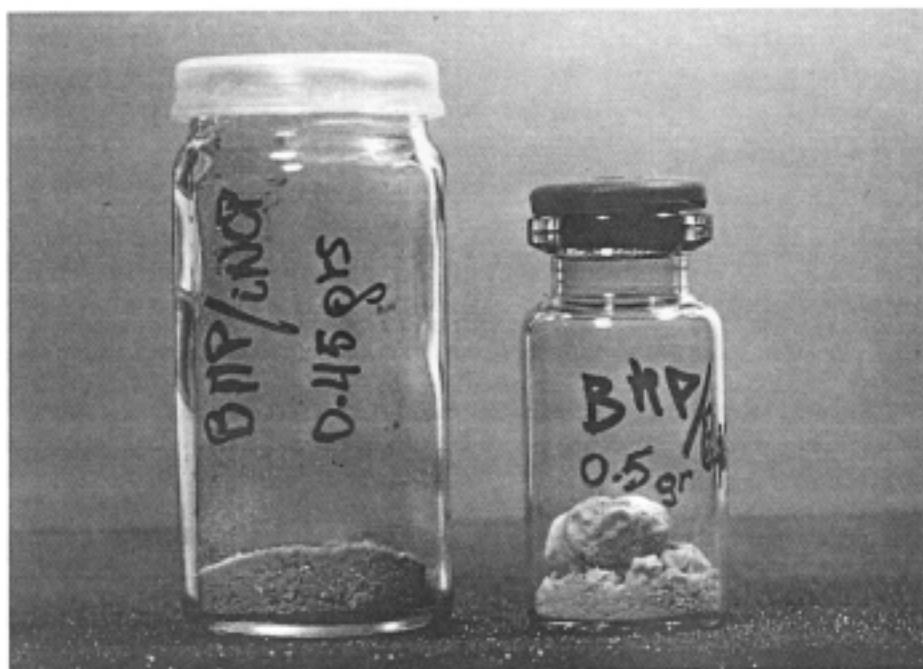


Fig. 11.- Extracto de BMP liofilizado.

IIb.- ANIMAL DE EXPERIMENTACION

Se han utilizado dos tipos de animales de experimentación para comprobar la bioactividad de la BMP aislada. Para observar la actividad osteoinductora de la BMP se utilizaron ratones hembra adultos de la cepa Swiss de 6 meses de edad con un peso medio de 50g (40g-60g) y para el modelo quirúrgico experimental se emplearon un total de 120 ratas hembra adultas de la cepa Wistar de 10 a 12 meses de edad y un peso medio de 250 gramos (230g-280g).

Los animales fueron suministrados por la Unidad de Medicina y Cirugía Experimentales del Hospital Universitario San Carlos de Madrid, seleccionando para el estudio animales completamente sanos. Se ha observado en toda la experiencia la reglamentación española referente a

experimentación animal: Real Decreto 223/1988 de 14 de Marzo sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, BOE del 18-3-1988 y el Instrumento de Ratificación del Convenio Europeo sobre protección de animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos. Se han cumplido las líneas directrices europeas relativas a enjaulado de pequeños roedores, tanto en lo que se refiere a la superficie mínima del suelo de la jaula y la altura, como en la superficie mínima del suelo de la jaula en relación al peso de la rata. Dichas directrices proceden de la directiva del Consejo Europeo 86/609/CEE de 24 de Noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y con fines científicos, Diario Oficial de la Comunidad Europea de 18-12-1986.

Tras la intervención quirúrgica los animales fueron estabulados de manera individual sin tratamiento postoperatorio dejando comida y bebida "ad libitum".

II.c.- PREPARACION DEL IMPLANTE

1.- Preparación de los cilindros

Partiendo de hidroxapatita en esferas de 500μ de diámetro suministradas por la Dra. Isabel Lopez Valero (OSTEOSYNTH[®]) se

fabricaron cilindros de 15 mm de longitud y 5 mm de diámetro en el Centro Nacional de Química Orgánica (Madrid) con la colaboración del Dr. Julio San Román. Para conseguir la unión de las esferas de hidroxiapatita y darle consistencia al cilindro, se utilizó poliácido láctico (biomaterial degradable) de bajo peso molecular ($M_n=3600d$) y polimetacrilato de metilo. La proporción de los tres componentes que formaban la estructura de los cilindros fue la siguiente: 2g de hidroxiapatita, 600 mg de poliácido láctico y 400 mg de polimetacrilato de metilo, Fig 12.

Tras realizar una mezcla homogénea de los tres componentes se procedió a calentarlos a una temperatura de 135-140°C mediante una pistola de aire caliente en un molde tubular de silicona Fig. 13 y Fig 14. Una vez producida la compactación se deja enfriar el molde durante 20 minutos procediendo a continuación a la extracción del cilindro de hidroxiapatita del sistema de montaje.

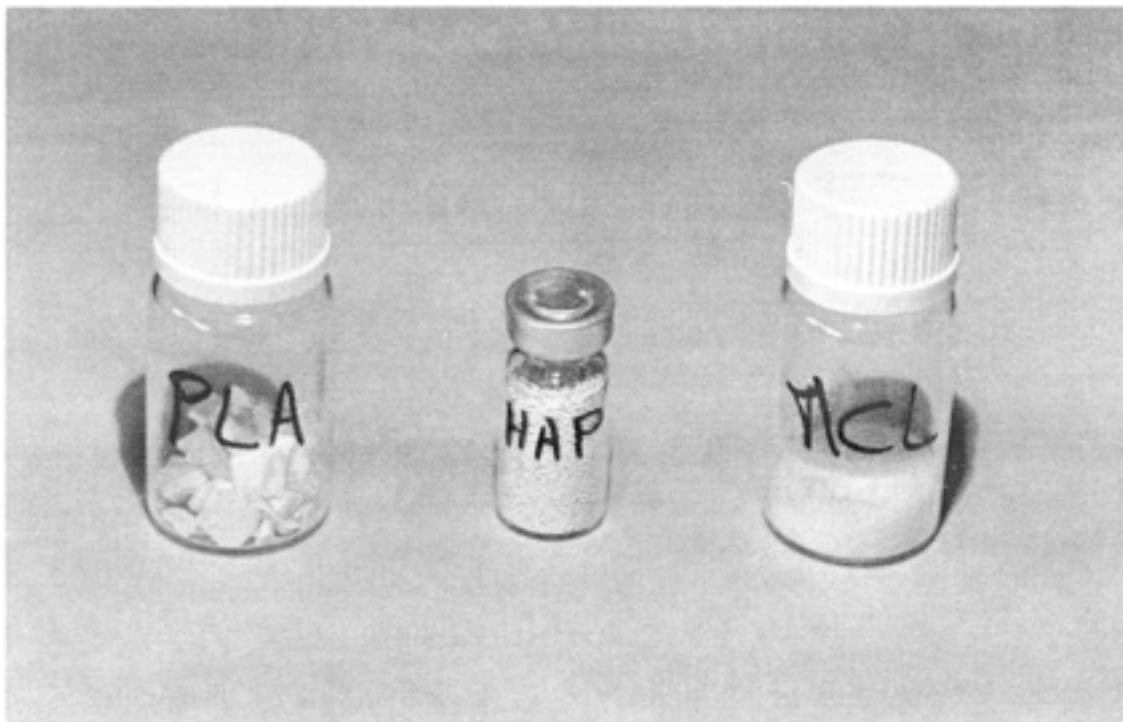


Fig. 12- Componentes del cilindro: 2g de hidroxiapatita, 600mg de poliácido láctico y 400mg de polimetacrilato de metilo.

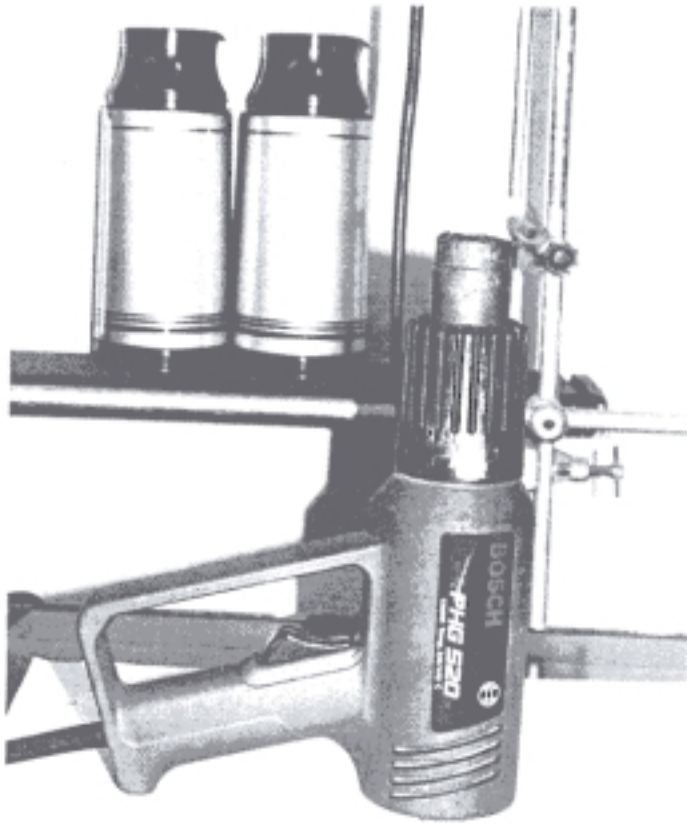


Fig. 13.- Pistola de aire caliente. Mantiene la temperatura de 135-140°C.

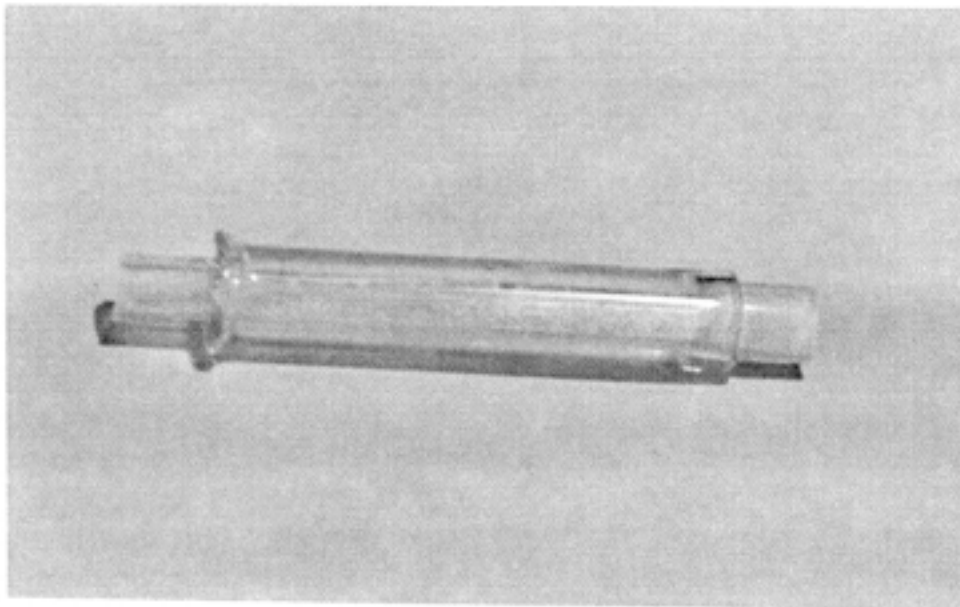


Fig. 14.- Molde tubular de silicona incluido en un vidrio.

2.- Unión de la BMP a los cilindros

Tras realizar una mezcla de BMP con agua destilada se obtuvo una gelatina adherente que se colocó en torno al cilindro. La desecación se efectuó durante 24 horas en una campana de vacío comprobando la unión de la BMP al cilindro, Fig 15.

La cantidad de BMP incluida en cada cilindro se calculó pesando el cilindro antes y después del recubrimiento. La diferencia de peso correspondió a la BMP.



Fig. 15.- Campana de vacío donde se produce la desecación del cilindro.

3.- Unión de los cilindros con/sin BMP al alambre en "omega"

La unión debe ser sólida para evitar que el cilindro se desplace del defecto óseo creado en el fémur del animal. El encaje a presión del cilindro en el alambre proporciona una fijación mecánica a la que se añade una unión mediante fibrina (Tisucol®) consiguiendo una estructura suficientemente estable para mantener el cilindro en el eje longitudinal del fémur de la rata, Fig. 16.

El último paso consiste en esterilizar todo el montaje (alambre-cilindro con/sin BMP) en óxido de etileno.

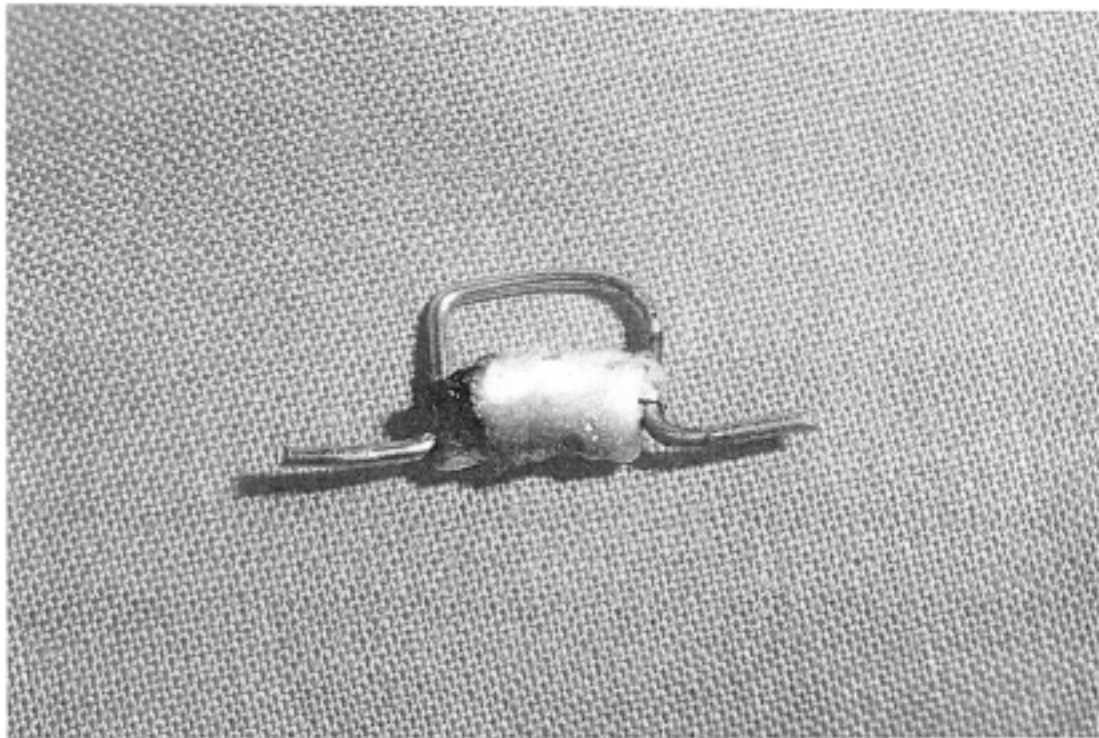


Fig. 16.- Fijación del cilindro al alambre en omega.

II.d.- TECNICA QUIRURGICA

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en los quirófanos de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimentales del Hospital Universitario San Carlos de Madrid.

La anestesia se realiza mediante la inhalación de éter en una campana de vacío hasta adormecer al animal tras lo cual se le inyecta en el muslo derecho una mezcla de 20 mg de diacepam (Valium®), 0.25mg de ketamina (Ketolar®) y 1mg de atropina, a razón de 1cm³ por cada 300g de peso.

Con el animal anestesiado se procede a rasurar su extremidad inferior izquierda y se aseptica la piel con povidona yodada (Betadine®). Tras realizar una incisión cutánea siguiendo el eje longitudinal del fémur se disecciona el espacio fascial entre los músculos glúteo superior y bíceps femoral para acceder al cuádriceps femoral que se desinserta del fémur entre el recto femoral y el vasto externo. Se desperiostiza una longitud aproximada de 2 cm de la diáfisis femoral en todo su perímetro para proceder a reseccionar un cilindro óseo en el centro de la diáfisis de 15 mm de longitud, utilizando para ello una sierra.

El alambre de acero inoxidable con forma de "omega" se introduce en la cavidad medular de ambos fragmentos óseos con el fin de mantenerlos a distancia evitando los componentes rotacionales y consiguiendo la obturación total de éstos, Fig 17. Esta técnica no precisa ningún soporte externo y es perfectamente tolerada por el animal.

Tras la colocación del enclavado endomedular se comprueba la solidez del montaje procediendo al cierre de la herida quirúrgica del plano fascial con sutura reabsorbible de catgut 3/0 y la piel con seda 3/0.

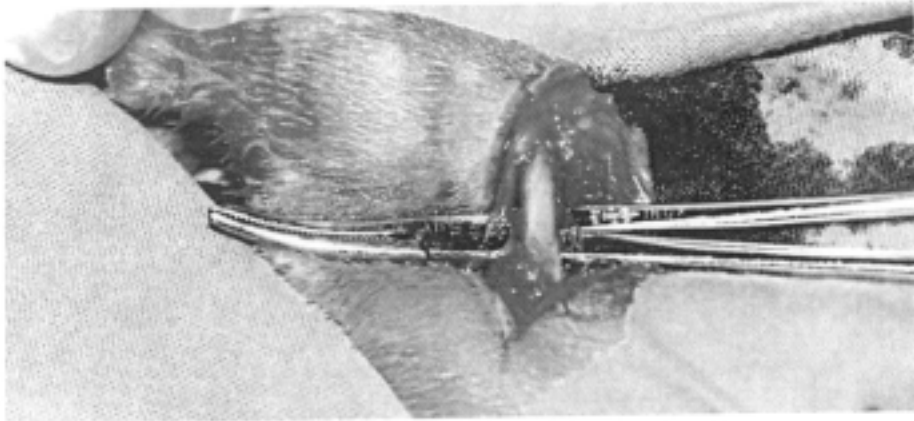


Fig. 17a.- Técnica quirúrgica. *Desperiostización del fémur izquierdo.*

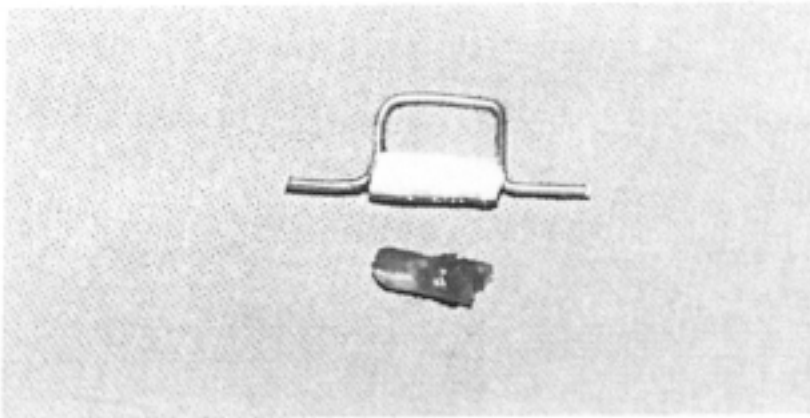


Fig. 17b.- Técnica quirúrgica. *Detalle del implante que sustituye el defecto óseo resecado de 15 mm.*



Fig. 17c.- Técnica quirúrgica. *Colocación del implante en el defecto.*

II.e.- GRUPOS DE ESTUDIO

Para la realización de este estudio se dividieron los animales en los siguientes grupos:

GRUPO 1 o GRUPO CONTROL: Resección de un defecto óseo cilíndrico de 15 mm de longitud en el fémur izquierdo e inmovilización con un alambre en "omega". 10 animales por cada período estudiado (total 30 casos).

GRUPO 2 o GRUPO BMP: Resección de un defecto óseo cilíndrico de 15 mm de longitud en el fémur izquierdo que se rellena con un implante de 25 mg de BMP dentro de una cápsula de gelatina del número 5. Inmovilización con un alambre en "omega". 10 animales por cada período estudiado (total 30 casos).

GRUPO 3 o GRUPO "COMPOSITE": Resección de un defecto óseo cilíndrico de 15 mm de longitud en el fémur izquierdo que se rellena con un cilindro cuya estructura está formada por hidroxiapatita, poliácido láctico de bajo peso molecular y polimetacrilato de metilo. El peso medio es de 129 mg (mínimo de 90 y máximo de 152 mg). Inmovilización con un alambre en "omega". 10 animales por cada período estudiado (total 30 casos).

GRUPO 4 o GRUPO "COMPOSITE " CON BMP: Resección de un defecto óseo cilíndrico de 15 mm de longitud en el fémur izquierdo que se rellena con un cilindro igual al del Grupo 3 recubierto con BMP en cantidades que oscilan entre 13 y 45 mg. Inmovilización con un alambre en "omega". 10 animales por cada período estudiado (total 30 casos).

II. f.- TOMA DE MUESTRAS

El sacrificio de los animales se llevó a cabo en diferentes períodos de tiempo con el fin de observar los cambios radiológicos e histológicos del

implante. Se realizó el sacrificio a la segunda, sexta y duodécima semana de la intervención para cada uno de los grupos.

La técnica empleada para la muerte del animal fué una sobredosis de éter por inhalación, introduciendo al animal en una campana de anestesia.

Tras la toma de muestras se procede a la extracción del fémur izquierdo con las partes blandas que rodean el defecto óseo creado.

II.g.- EVALUACION RADIOGRAFICA

Tras la toma de muestras se realiza el estudio radiográfico utilizando placas de máxima sensibilidad de mamografía.

II.h.-ESTUDIO MACROSCOPICO DE LOS IMPLANTES

Tras la extracción de la pieza se observan y anotan todos los detalles de interés (existencia de fibrosis, osículos, etc).

La fijación se realiza de forma inmediata en formol neutro al 10% para la realización de microscopía óptica.

Composición del formol tamponado al 10%

- Formol al 40%: 100 ml
- Agua destilada: 900 ml
- Fosfato sódico monobásico 1M: 4 gr
- Fosfato sódico dibásico anhidro: 6,5 gr

II.i.-ESTUDIOMICROSCOPICODELOSIMPLANTES

Las piezas fueron sometidas a decalcificación en ácido nítrico concentrado al 70%, tras lo cual se procedió a la inclusión en parafina siguiendo la metodología convencional en un aparato de inclusión automática (Autotechnicon®).

Con las piezas montadas se realizaron cortes de 3 a 5 micras de grosor efectuándose las siguientes tinciones: Hematoxilina-Eosina y PAS.

1.- Técnica de tinción con Hematoxilina-Eosina

- Se desparafina en Xilol haciendo dos pases de 10 min cada uno.
- A continuación se introduce en alcohol de 96° durante 7 a 10 min.
- Se lava en agua corriente.
- Se pasa a Hematoxilina durante 15 a 20 min.
- Se lava con agua corriente y se deja en la misma hasta virar.
- Se pasa a Eosina durante 2-3 min.
- Se lava con agua corriente.
- Se introduce en alcohol de 96° durante 5-7 min.
- Posteriormente se pasa a alcohol absoluto durante 10 min, a Carboxilol otros 10 min y a Xilol otros 10 min.
- Finalmente se realiza el montaje en bálamo.

2.- Técnica de tinción con PAS (ácido peryódico de Schiff):

- Se desparafina con Xilol.
- Se hidrata con alcoholes regresivos.
- Se introduce en ácido peryódico de Schiff durante 10 min.
- Se lava en agua corriente 10 min.
- Se pasa a leucofucsina 5 min.
- Posteriormente se pasa a bisulfito sódico durante 10 min.
- Se lava en agua corriente durante 10 min.
- Se pasa a hematoxilina durante 3 min.

- Se lava en agua corriente.
- Se deshidrata pasando por alcoholes progresivos.
- Se monta en bálsamo.

III. RESULTADOS

III.- RESULTADOS

En 7 ocasiones se realizó la técnica de aislamiento de la BMP a partir de 14 Kg de hueso cortical de terneras de menos de 1 año de edad en tandas de 2 Kg, obteniendo 1825 mg de BMP. Es decir a partir de 1 Kg de hueso cortical de diáfisis de vaca se ha obtenido un extracto liofilizado de 130,3 mg de BMP. De la globalidad de BMP obtenida apareció inducción ósea en músculo de ratón en un 67% de los implantes, Tabla IV.

TABLA IV
Inducción ósea en ratones

Periodo Postimplante	N° Implantes	Inducc. Osea	Fracasos	
			Infec.	Causa Descon.
7 días	5	(3) 60%	(1) 20%	(1) 20%
14 días	5	(3) 60%	(1) 20%	(1) 20%
21 días	5	(4) 80%	0	(1) 20%
Total	15	(10) 67%	(2) 13%	(3) 20%

III.a.- ANALISIS MACROSCOPICO

En el Grupo BMP, los especímenes que presentaban inducción ósea, 18(60%), Tabla V, en los estadios más precoces (2-6 semanas), el material presentaba una consistencia firme y estaba formado por tejido cartilaginoso. En las muestras de más larga evolución (12 semanas), el tejido óseo fue notable.

TABLA V
Inducción ósea en ratas

Período Postimplant.	Control	BMP	COMPOSITE	COMPOSITE-BMP
2 sem. (10 ratas)	0%	(6) 60%	0%	(6)60%
6 sem. (10 ratas)	0%	(6) 60%	0%	(7)70%
12 sem. (10 ratas)	0%	(6) 60%	0%	(9)90%
Total	0%	(18) 60%	0%	(22)73.3%

En los Grupos "composites" con/sin BMP no se apreciaron diferencias macroscópicas en su disección en todas las muestras, si bien en dos especímenes apareció una unión sólida a los extremos óseos del huesped.

En el Grupo Control el defecto óseo fue ocupado por tejido fibroso. En las muestras del Grupo BMP que no presentaron inducción ósea, 12 (40%), Tabla VI, el aspecto fue similar al Grupo Control.

En las muestras de los Grupos "composites" con/sin BMP que no mostraron ningún tipo de inducción ósea, 38 (63.3%), Tabla VI, el implante se mantenía inerte envuelto por una cápsula fibrosa alrededor del defecto óseo sin adherirse a los extremos óseos del huesped.

TABLA VI
Fracaso de la inducción ósea en ratas

Grupo	Infección	Fallo Técnica	Desconocida
Grupo 1 (CONTROL.30 ratas)	(5) 16.6%	(1) 3.3%	(24) 80%
Grupo 2 (BMP.30 ratas)	(2) 6.6%	(2) 6.6%	(8) 26.6%
Grupo 3 (COMPOSITE.30 ratas)	(1)3.3%	(2)6.6%	(27)90%
Grupo 4 (COMPOSITE-BMP.30 ratas)	(1)3.3%	(1)3.3%	(6)20%
Total	(9)7.5%	(6)5%	(65)54.1%

Las muestras que presentaron infección en los Grupos Control, 5(16.6%), Tabla VI y BMP, 2(6.6%), Tabla VI, presentaron un aspecto encapsulado, fusiforme unido a los extremos óseos del huesped y conteniendo en su interior un material caseoso amarillento. Los extremos óseos del huesped se habían reabsorbido parcialmente. En la infección en los Grupos "composite" con/sin BMP, 2(3.3%), Tabla VI, presentaban también un aspecto encapsulado, amarillento con un líquido seroso en el que "nadaba" el implante desprendido del alambre en "omega".

El fallo técnico, común en todos los grupos, 6(5%), Tabla VI, consistió en una osteolisis endomedular en los extremos del alambre en "omega" que ocasionó una angulación del fémur y en algunos casos una fractura del mismo.

En los grupos que contenían BMP se presentó una ausencia de inducción ósea por causa desconocida en 14 casos (23.3%), Tabla VI.

III.b.-ESTUDIORADIOLOGICO

En el Grupo Control no se observó ningún tipo de formación ósea radiológica en ninguno de los períodos observados, Fig. 18. En el Grupo BMP, en el día 14 se pudo apreciar una cierta trama radiopaca que fué consolidándose en los siguientes períodos de tiempo. A las 6 semanas de la intervención la neoformación ósea en el defecto va haciéndose más evidente. A las 12 semanas de su realización, destaca la existencia de una neoformación ósea en el defecto realizado en el fémur de la rata, Fig. 19.

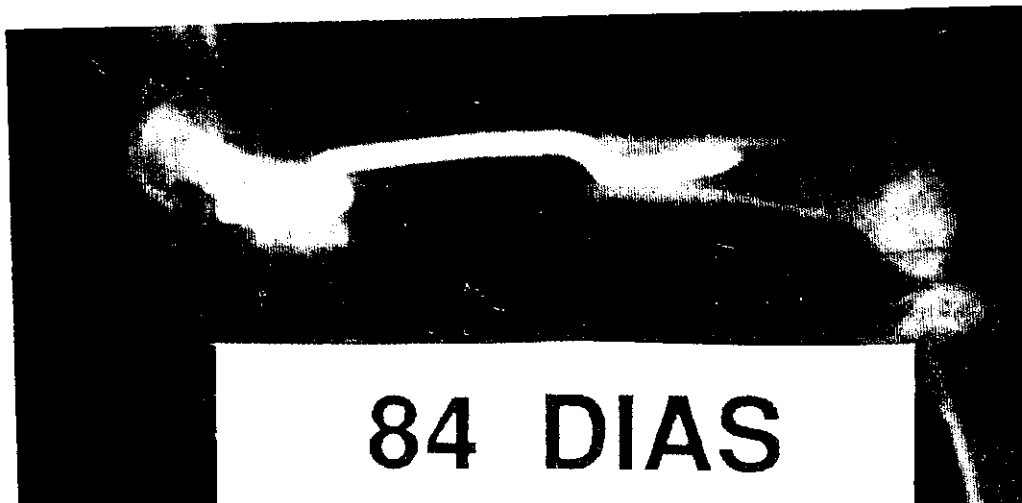


Fig. 18.- *Grupo Control* Imagen radiológica a las 12 semanas.

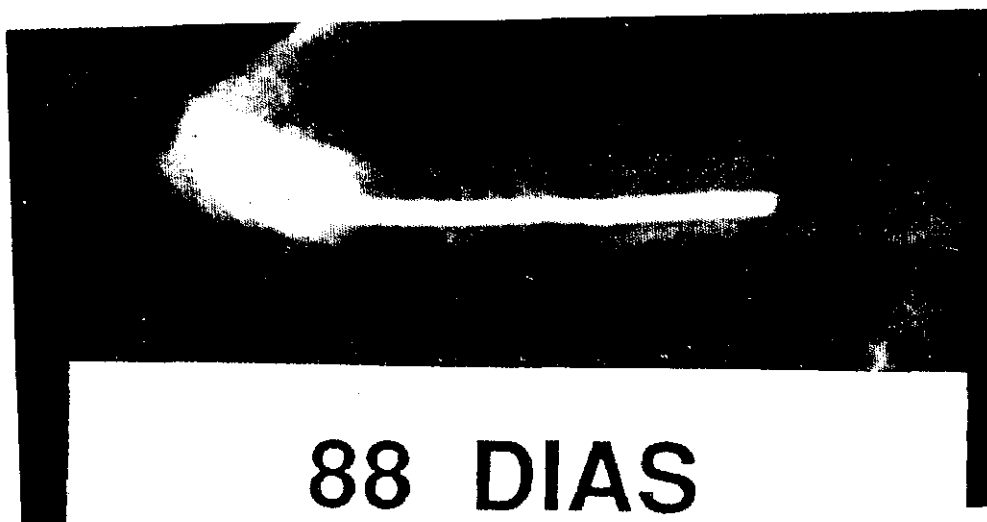


Fig. 19.- *Grupo BMP.* Imagen radiológica a las 12 semanas.

En el Grupo "composite" la imagen radiológica típica es un cilindro poroso y radiotransparente, Fig. 20. En el Grupo "composite" con BMP se observó un cilindro de aspecto más radioopaco que se mantenía alineado en el eje femoral con imágenes sugerentes de fusión con el hueso del huesped, Fig. 21.



Fig. 20.- Grupo "composite". Imagen radiológica a las 12 semanas.



Fig. 21.- Grupo "composite" con BMP. Imagen radiológica a las 12 semanas.

III.c.-ESTUDIO DE MICROSCOPIA OPTICA

En el Grupo BMP, en aquellos implantes que presentaron el fenómeno de inducción ósea, se observó que a las 2 semanas aparecieron condrocitos y osteoblastos que fueron madurando hasta formar hueso con tejido óseo y hematopoyético al cabo de las 6 semanas.

En las dos primeras semanas, se puso de manifiesto la presencia de tejido cartilaginoso que daría lugar a tejido óseo mediante osificación endocondral

A veces se observó la formación ósea en "osículo" con una diferenciación desde dentro hacia afuera, Fig. 22.



Fig. 22.- Grupo BMP. Formación ósea en osículo. H-E X10.

A las 6 semanas, aparte de los osteoblastos, también se observó la existencia de trabéculas óseas con presencia de osteoblastos y osteoclastos que muestran evidencia de la remodelación ósea

En las formas más desarrolladas, a las 12 semanas, se observa una trabeculación ósea con un ribete osteoblástico y una cavidad rellena de médula ósea.

En el Grupo "composite" sin BMP la imagen histológica característica es un cilindro rodeado de cápsula fibrovascular de la que parten tractos conjuntivos con vasos sanguíneos que disocian en mayor o menor grado los diferentes biomateriales, Fig. 23.

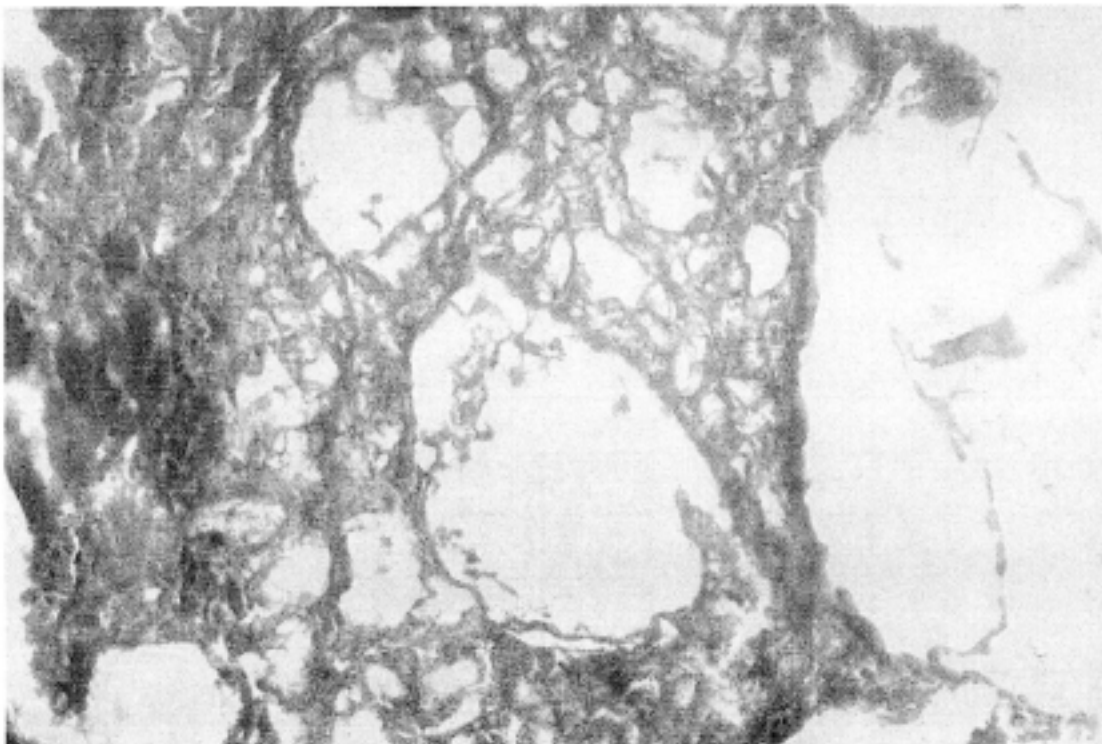


Fig. 23.- Grupo "composite" a las 12 semanas. Tractos conjuntivos entre los componentes del cilindro.

En el Grupo "composite" con BMP, a las 2 semanas del implante, apareció en ocasiones una intensa respuesta fibrosa que forma una cápsula gruesa alrededor del cilindro. Tractos de tejido conjuntivo disocian los componentes del cilindro y se mezclan con una estructura trabecular calcificada exacta al hueso esponjoso.

En el interior de los tractos conjuntivos aparecen numerosos vasos y una intensa respuesta celular. El poliácido láctico presenta una fragmentación que corresponde a la primera fase de su proceso reabsortivo. Esta respuesta se observó en seis de las diez ratas (60%), Fig. 24.

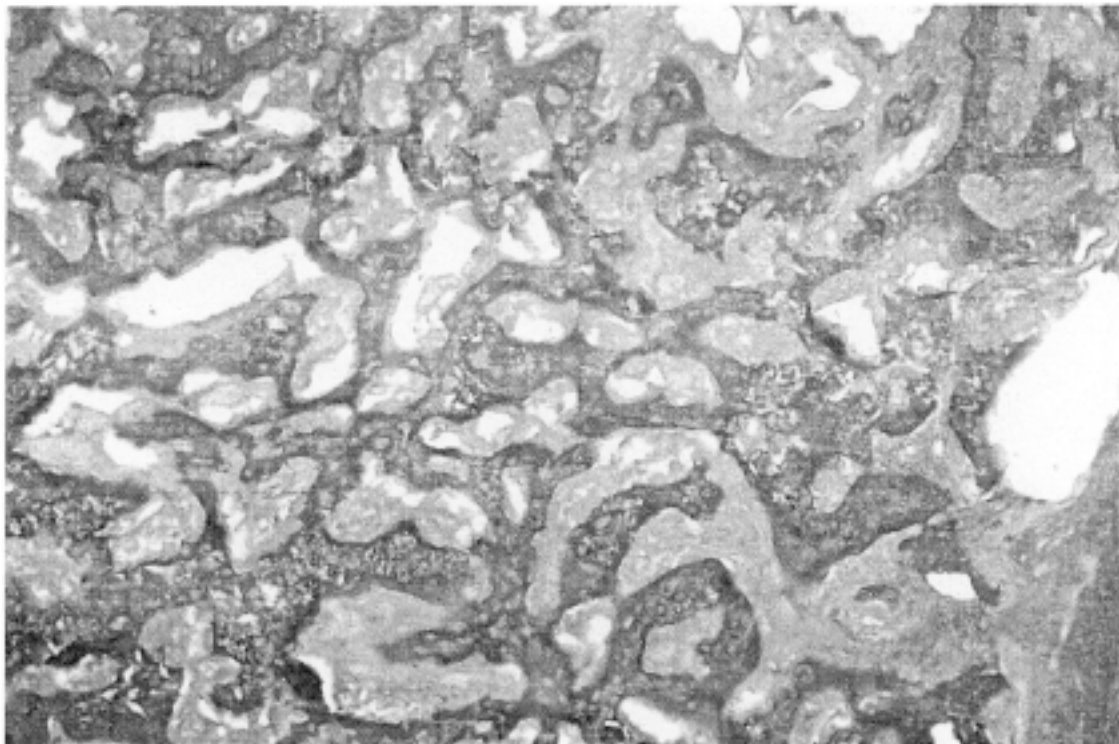


Fig. 24. Grupo "composite"- BMP, a las 2 semanas Estructura trabecular y respuesta fibrosa intensa. H-EX4

A las 6 semanas, se observa una estructura trabecular calcificada rodeada de finos tractos conjuntivos y estructuras de aspecto cristalino y fragmentadas que ofrecen un aspecto intensamente birrefringentes y que corresponden al poliácido láctico. Esta respuesta se observó en 7 de las diez ratas, Fig. 25.

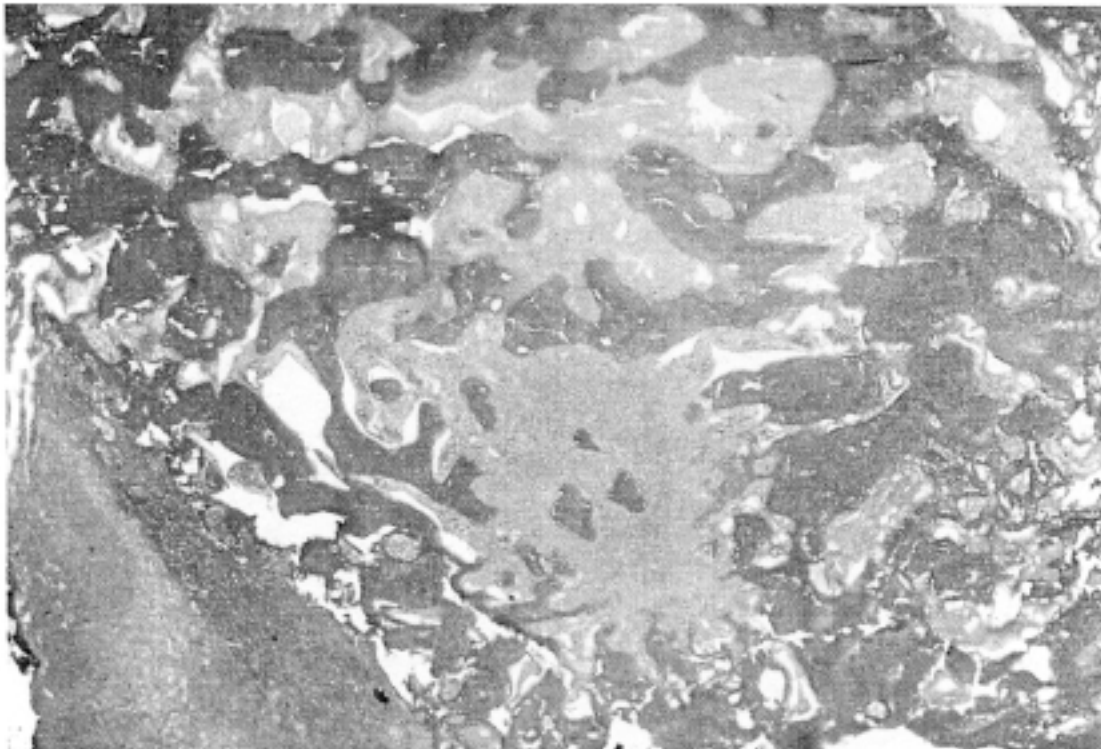


Fig. 25.- Grupo *composite*"-BMP a las 6 semanas. Aspecto trabecular y fibroso. H-EX10.

A las 12 semanas aparece una calcificación intensa tanto en la periferia como en el interior del implante en los huecos dejados por el poliácido láctico reabsorbido con una estructura trabecular basófila que recuerda el hueso esponjoso. Esta respuesta apareció en 9 de las diez ratas (90%), Fig. 26 y Fig. 27.

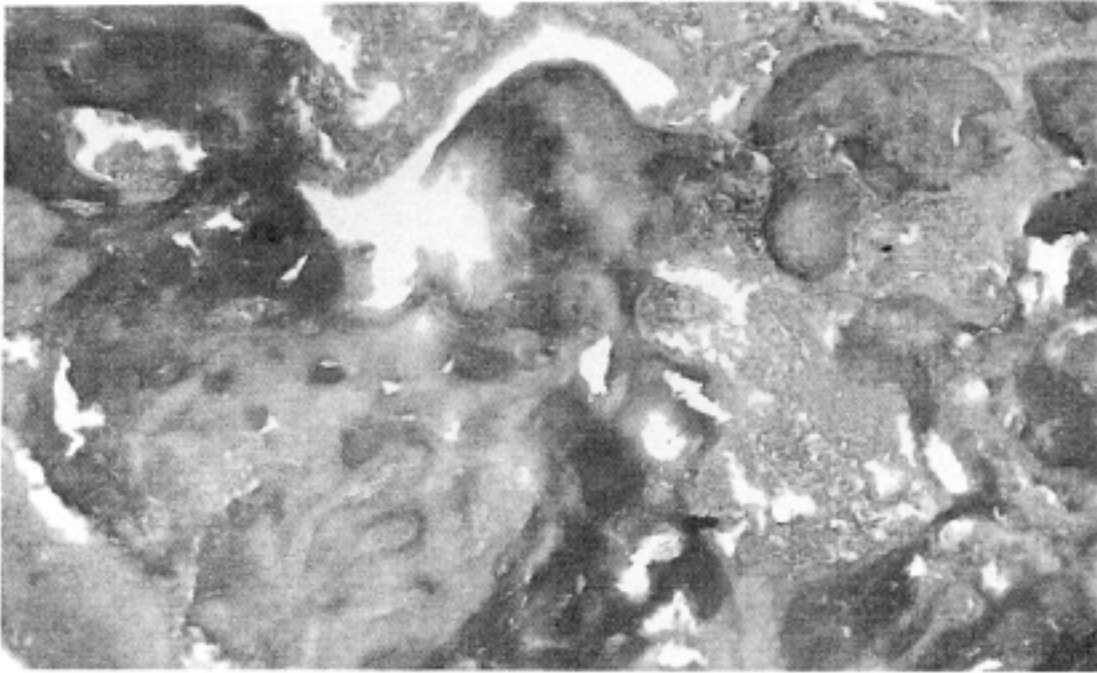


Fig. 26.-Grupo "composite"-BMP a las 12 semanas. Aspecto de amplios tractos trabeculares, aislados en la periferia que se introducen hacia el biomaterial. PASX4.

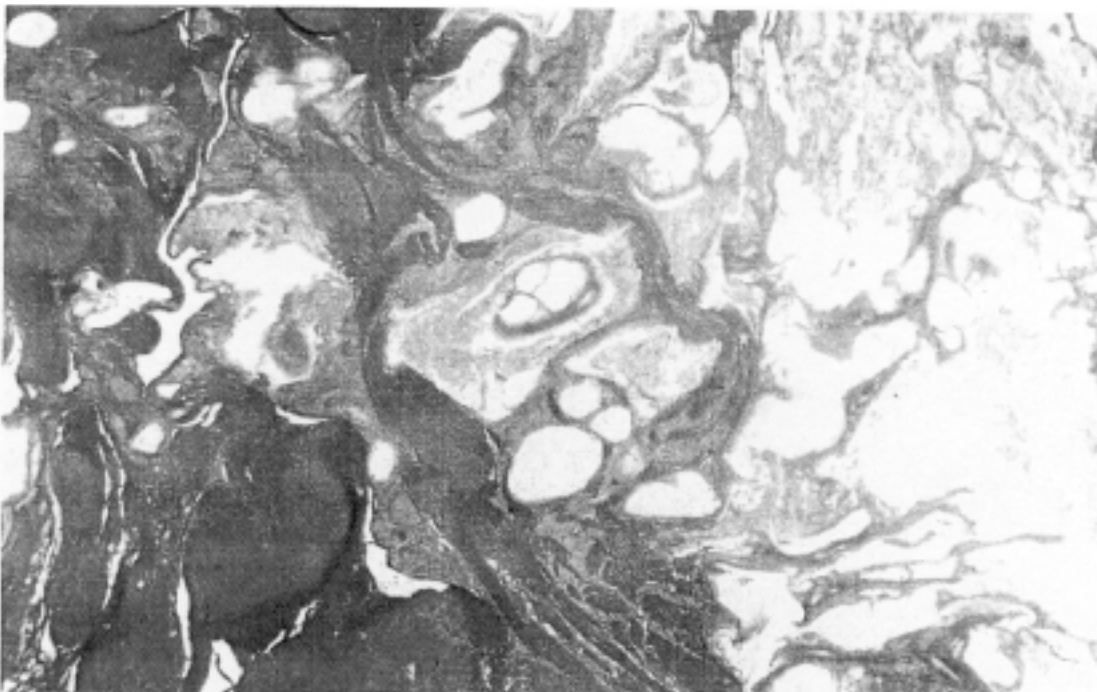


Fig. 27.-Grupo "composite"-BMP a las 12 semanas. Trabéculas y tejido conectivo. H-EX10.

III.d.- INCIDENCIA DE INDUCCION OSEA

Cuando se llevó a cabo el análisis de comprobación de la eficacia de la BMP en ratón se encontró, mediante estudios radiológicos e histológicos, que el porcentaje de implantes que provocaron inducción ósea fue completa o nula, es decir no hubo situaciones intermedias.

La inducción ósea apareció entre un 60-80% y fue mayor a medida que aumenta el período postimplante, Tabla IV.

Cuando se estudió el Grupo Control no se encontró inducción ósea en ninguno de los especímenes estudiados. Por otro lado se presentaron 5 casos de infección (16.6%); 1 caso (3.3%), tuvo un fallo de técnica y en 24 de los 30 especímenes estudiados (80%) se describió un fracaso de causa desconocida, Tabla VII.

TABLA VII
Evaluación de la inducción ósea en el Grupo Control

Periodo Postimpl.	N° Implan.	Inducc. Osea Positi.	Fracasos		
			Infec.	Fallo Tecn.	Descon.
2 sem.	10	0	(2) 20%	0	(8) 80%
6 sem.	10	0	(2) 20%	0	(8) 80%
12 sem.	10	0	(1) 10%	(1)10%	(8) 80%
Total	30	0	(5) 16.6%	(1)3.3%	(24) 80%

En el Grupo BMP aislada apareció hueso en 18 de los 30 especímenes estudiados, lo que representa un 60% de los casos. Dos de las muestras presentaron infección, 6.6% y en un 6.6% también de los casos se describieron fallos técnicos. Estos consistieron en movilización del alambre en "omega" con osteolisis en los extremos del hueso y salida del mismo en un caso. Por último en 8 de las muestras, 26.6%, aparecieron fracasos de causa desconocida, Tabla VIII.

TABLA VIII
Evaluación de la inducción ósea en el Grupo BMP

Periodo Postimpl.	N° Implan.	Inducc. Osea Positiva	Fracasos		
			Infección	Fallo Técn.	Descon.
2 sem.	10	(6) 60%	(1) 10%	(1) 10%	(2) 20%
6 sem.	10	(6) 60%	(1) 10%	(1) 10%	(2) 20%
12 sem.	10	(6) 60%	0	0	(4) 40%
Total	30	(18) 60%	(2)6.6%	(2)6.6%	(8)26.6%

En el grupo de estudio donde el implante consistió en únicamente hidroxiapatita, poliácido láctico y polimetacrilato de metilo aparecieron tractos conjuntivos con vasos que disocian los diferentes biomateriales sin presentar en ningún caso trabéculas calcificadas. En un espécimen aparecieron signos histológicos de infección, 3.3%; dos casos se atribuyeron a fallos de técnica, 6.6% y en un 90% de los especímenes el fracaso no se pudo atribuir a causa conocida, Tabla IX.y Fig. 23

TABLA IX
Evaluación inducción ósea en el Grupo "composite"

Periodo Postimpl.	N° Implan.	Inducc. Osea Positiva	Fracasos		
			Infecc.	Fallo Tecn.	Descon.
2 sem.	10	0	(1)10%	0	(9)90%
6 sem.	10	0	0	(1)10%	(9)90%
12 sem.	10	0	0	(1)10%	(9)90%
Total	30	0	(1)3.3%	(2)6.6%	(27)90%

Por último en el grupo de estudio donde se implantó el cilindro con BMP apareció en 22 de los 30 animales estudiados, 73.3%, una estructura trabecular calcificada que disocia el biomaterial con depósitos de calcio unidos a un material PAS positivo que indica la presencia de mucopolisacáridos. Esta estructura trabecular es idéntica al hueso trabecular, Figs 26 y 27. Aparecen ciertas zonas del cilindro sin reabsorber y entre las trabéculas calcificadas aparece tejido conjuntivo con gran proliferación vascular. Sólo en 1 caso se pudo apreciar infección y en otro caso fallo de técnica. En un 20% de los animales estudiados apareció un fracaso de causa desconocida, Tabla X.

La cantidad de BMP aportada al cilindro osciló entre 13mg y 45mg y el peso global del cilindro osciló entre 90mg y 152mg. Analizados individualmente los resultados histológicos y radiológicos de los diferentes especímenes no aparecieron diferencias en relación con la cantidad de BMP, el peso del cilindro y la proporción de la BMP en el cilindro. Si existió un mayor índice de respuesta en el grupo de las 12 semanas, 90% de respuesta positiva.

TABLA X
Evaluación inducción ósea en el Grupo "composite"-BMP

Periodo Postimpl.	N° Implan.	Inducc. Osea Positiva	Fracasos		
			Infección	Fallo Tecn.	Descon.
2 sem.	10	(6)60%	(1)10%	0	(3)30%
6 sem.	10	(7)70%	0	(1)10%	(2)20%
12 sem.	10	(9)90%	0	0	(1)10%
Total	30	(22)73.3%	(1)3.3%	(1)3.3%	(6)20%

IV. DISCUSSION

IV.- DISCUSION

El aislamiento de la BMP según el método tradicional descrito por Urist^{235,254,259}, que es el que se ha seguido en el presente estudio supone un método costoso en tiempo y esfuerzo. Hay que recordar que de 14Kg de hueso cortical bovino se han obtenido tan sólo 1825mg de BMP. El aislamiento a partir de hueso bovino de un año de edad directamente obliga a pasos de laboratorio de una duración aproximada a 15 días. Todo esto influye en la variabilidad de la respuesta osteoinductiva.

Para solventar estos problemas autores como Wang^{274,275}, Wozney²⁷⁹, Celeste²⁸, Takaoka²¹⁸ y Luyten¹³⁸ han dedicado sus esfuerzos a purificar y caracterizar la secuencia de polipéptidos de la BMP con capacidad osteoinductiva. En la actualidad, se han llegado a aislar 7 péptidos diferentes de BMP humanas, sobre hibridaciones con sondas de DNA, BMP-1, BMP-2(BMP-2A), BMP-3, BMP-4 (BMP-2B), BMP-5, BMP-6 y BMP-7. Seis de estas BMP_S (BMP_S 2-7) se han identificado como miembros de la familia TGF-beta. Esto ha hecho aumentar la eficacia osteoinductiva significativamente en un porcentaje mayor de muestras. Recientemente se ha podido saber que los pesos moleculares de algunos de estos péptidos estaban dentro del mismo rango que la BMP descrita por Urist y col.^{243,259}.

En el momento actual, Takaoka y col, en 1993²¹⁷, han purificado y caracterizado una fracción proteica de osteosarcoma murino (tipo Dunn) capaz de inducir cartílago y hueso. El implante intramuscular de tan sólo 20ng de la proteína purificada junto con 2mg de colágeno cutáneo puro como portador inducen hueso ectópico en ratones al cabo de dos semanas. El peso molecular de la proteína purificada fue de 32 kD tras electroforesis en gel de poliacrilamida. Esta proteína, pudo dividirse en dos subunidades con la misma secuencia parcial de aminoácidos que era idéntica a la hBMP-2B (BMP-4) que forma parte de la familia del TGF-beta. El mismo autor²¹⁸ utilizando esta secuencia de aminoácidos codificó una sonda de DNA complementario (cDNA) que fué ampliada y transferida a células de ovario de hamster chinos. Estas células fueron capaces de

producir una proteína que implantada junto con colágeno puro como portador indujo osículos ectópicos en ratones a las dos semanas. La secuencia de nucleótidos del cDNA y la secuencia de aminoácidos a la que daba lugar fueron homólogos a la hBMP-4 (hBMP-2B).

Con los métodos que están a nuestro alcance actualmente no se ha podido realizar una purificación de la proteína morfogenética ósea. En el presente trabajo, una vez evaluada la función de la BMP en ratón se han alcanzado porcentajes de inducción que oscilan entre un 60 y un 80%, dependiendo del tiempo de implante en el ratón, Tabla IV. En el modelo experimental realizado en ratas la respuesta fue de un 60% en el Grupo BMP y de un 73.3% en el Grupo "composite" con BMP, Tabla V.

El animal elegido en este trabajo fue la rata porque ofrece las ventajas de su bajo coste, el conocimiento de sus reacciones osteorregeneradoras³⁵ y la fácil reproductibilidad del experimento. Por otro lado presenta el inconveniente de la disparidad de extrapolación de resultados a vertebrados superiores.

La creación de un modelo experimental válido que se adaptara a los requerimientos necesarios en la hipótesis de trabajo de esta Tesis ha pasado por varios estudios que acabaron en fracasos, fundamentalmente debido a que la creación de una estructura porosa y a la vez suficientemente resistente es difícil de conseguir. Numerosas pruebas utilizando cilindros de hidroxiapatita finalizaron con una rotura de éste cuando se alcanzaba la porosidad necesaria para el crecimiento óseo.

En el presente estudio se ha utilizado un "composite" formado con hidroxiapatita, polimetacrilato de metilo y poliácido láctico. La motivación es lograr un "andamio" sobre el cual las propiedades osteoinductivas de la BMP incrementen su eficacia. Para lograr esta premisa se precisa que el biomaterial se adapte a la forma del defecto creado (cilindro de 15mmX5mm), forma cilíndrica. Además debe ofrecer una porosidad por la cual se permita el crecimiento del nuevo tejido y mantener una resistencia mecánica suficiente. Con este fin se han

combinado la propiedad osteoconductora de la hidroxiapatita⁹⁶, la adhesiva del polimetacrilato de metilo y la biodegradación del poliácido láctico de bajo peso molecular^{209,210}. Al ser reabsorbido este último quedan vacíos los poros del cilindro y se permite el crecimiento óseo.

La creación de un defecto diafisario de 15mmX5mm ha demostrado ser de suficiente dimensión como para evitar la regeneración espontánea como así lo demuestran los resultados obtenidos en el Grupo Control, Tabla V. La colocación del "composite" en el defecto óseo ha mostrado su capacidad para mantenerse intacto a pesar de la carga inmediata del animal sin ningún soporte externo aunque no se haya observado ninguna respuesta osteoinductiva, Tabla V.

La técnica de estabilización con alambre en "omega" tan sólo fracasó en 6 animales, 5%, Tabla VI. Este fracaso se debió en todos los casos a una osteolisis alrededor de los extremos del alambre que produjo una fractura femoral y angulación del hueso. El hecho de que en ningún animal del Grupo Control apareciera hueso regenerado en el defecto demuestra que se consiguió la oclusión del canal medular y la conservación de la longitud del defecto. La utilización de la fibrina biológica en los extremos del cilindro ayudó a mantenerlo en posición. En todos los casos el animal pudo deambular con independencia de forma inmediata a la intervención.

Nueve ratas del experimento presentaron infección del implante lo que supuso su fracaso osteoinductivo, Tabla VI.

La BMP, implantada en ratas con defectos femorales de 15mm, en cápsula de gelatina, ha ofrecido un índice de osteoinducción de un 60%, TablaV. Esta inducción ósea, con una cantidad de 25mg, no dependió del tiempo de implante, cumpliendo con la ley del "todo o nada" que caracteriza a esta proteína²⁴³. En la presente Tesis se han apreciado condrocitos y osteoblastos que fueron madurando hasta formar hueso al cabo de 6 semanas. En las dos primeras semanas se evidenció tejido

cartilaginoso que mediante osificación endocondral acabó formando hueso, Fig. 20.

En los últimos años, la "vehiculización" de la BMP ha sido objeto permanente de estudio. Se busca un portador que sea capaz de no alterar sus propiedades físico-químicas y a la vez que su degradación permita la liberación secuencial de la proteína^{86,149,157,217,218,250}.

La unión de la proteína al portador presenta grandes inconvenientes. En el medio en que se ha desarrollado el presente trabajo, la fase final de fabricación de la hidroxiapatita conlleva el paso por un horno que alcanza 1000°C. Obviamente esto es incompatible con la viabilidad de la BMP. Por otro lado si se utiliza poliácido láctico de bajo peso molecular es posible mediante disolución y posterior desecación una unión relativamente íntima entre la BMP y el portador.

La hidroxiapatita ha sido utilizada como vehículo portador de sustancias osteoinductoras por Kawamura y cols.¹¹⁰ e Iyoda⁹⁶.

Miyamoto y col. en 1992¹⁴⁹ empleando acetona como disolvente del poliácido láctico han sido capaces de utilizar este biomaterial como portador de la BMP. Este grupo de trabajo evaluó varios homopolímeros de poliácido láctico (PLA) con diferentes pesos moleculares como portadores de la BMP. Compuestos de 4mg de BMP semipurificada e hidrosoluble y 100mg de uno de los homopolímeros fueron implantados en los músculos dorsales de ratones. PLA-105000/BMP, PLA-21000/BMP, PLA-3300/BMP y PLA-160/BMP fracasaron en la inducción de osteogénesis; PLA-105000, PLA-2100 y PLA-3300 produjeron reacciones inflamatorias de cuerpo extraño y/o crónicas, y PLA-160 necrosis tisular. PLA-650/BMP indujo formación de cartílago en una semana y de hueso con médula hematopoyética en tres semanas, siendo reabsorbidos completamente y reemplazados por hueso.

Posteriormente, Miyamoto y col. en 1993¹⁵⁰ han utilizado el polímero biodegradable compuesto por poliácido láctico (PLA) y

polietilén-glicol (PLE) como portadores de BMP. Compuestos de BMP semipurificada de osteosarcoma murino y el copolímero PLA-PLE consistente en un PLA de peso molecular 650d y un PLE de peso molecular 200 d (PLA-PLE 650-200) fueron implantados bajo la fascia de la musculatura dorsal de conejos. Tres semanas después de la implantación, los compuestos PLA-PLE 650-200/BMP fueron completamente reabsorbidos y reemplazados por hueso y médula hematopoyética. Estos compuestos indujeron el doble de hueso que las muestras de BMP y un homopolímero de PLA de 650 d (PLA-650/BMP), de lo que se deduce que el polímero PLA-PLE 650-200 es el portador más efectivo para la BMP. Compuestos de PLA-PLE 650-200/BMP mezclados con polvo de hidroxiapatita (HAP) también indujeron formación ósea ectópica. Debido a que el PLA-PLE 650-200/BMP es viscoso y semilíquido y el PLA-PLE 650-200/BMP/HAP es pastoso y plástico, el primero puede ser usado como material inyectable osteoinductivo y el último como un molde plástico.

En el presente trabajo se han utilizado hidroxiapatita y poliácido láctico con peso molecular de 3600d en forma cilíndrica con unas dimensiones de 15 x 5 mm como portadores de la BMP. Para la unión de la proteína al "composite" se ha utilizado una técnica similar a la de Miyamoto¹⁴⁹ pero con agua destilada en vez de acetona consiguiendo una unión íntima entre la BMP y el portador. La respuesta obtenida en el Grupo "composite" con BMP fué positiva entre un 60%-90%, TablaV, a pesar de que el peso molecular era mayor que el del poliácido láctico utilizado por el grupo de Miyamoto y col.¹⁵⁰ (PLA/650) en 1993 y muy cercano al PLA/3300 utilizado por el mismo grupo de trabajo¹⁴⁹ en 1992 con el que no obtuvieron respuesta osteoinductiva.

Heckman y col. en 1991⁷⁴ han utilizado BMP en el tratamiento de pseudoartrosis en perros. Para ello realizaron un defecto segmentario en la parte media de la diáfisis del radio de los animales que se fijó con placas y se rellenó con BMP canina, BMP bovina, hueso bovino desmineralizado con guanidina, poliácido láctico y combinaciones de éstos. Todas las muestras fueron examinadas a los tres meses de la implantación. El hueso bovino desmineralizado con guanidina, solo o en

combinación con 15mg de BMP canina, no produjo la consolidación de la pseudoartrosis. El poliacido láctico aislado, produjo una pequeña cantidad de hueso. Cuando se combinó con 15mg de BMP canina, la cantidad de hueso se incrementó significativamente llegando a producirse la consolidación de la pseudoartrosis. Por el contrario, cuando el poliacido láctico se combinó con BMP bovina, no se apreció la consolidación ósea demostrando la especificidad de especie de la BMP y el uso del poliacido láctico como portador de la BMP.

Nuestros resultados coinciden con los de Heckman y col.⁷⁴ y Miyamoto y col^{149,150} al considerar el poliacido láctico como un buen portador de la BMP. No hemos observado, al contrario que Heckman⁷⁴ que el poliacido láctico (Grupo "composite" sin BMP) haya inducido tejido óseo, Tabla V.

Yasko y col.²⁸³, en 1992 preconizan un modelo experimental en ratas creando un defecto de sólo 5mm de longitud y estabiliza el fémur con placas atornilladas. Tal defecto es insuficiente y está en desacuerdo con las premisas del presente trabajo. La discrepancia también se centra en la importancia de anular la salida de células de la médula ósea que permitan una regeneración espontánea desde el huesped. Yasko justifica el modelo experimental basándose en que la longitud del defecto es el doble del diámetro de la diáfisis y que para evitar la participación celular de la médula ósea es suficiente con lavar la cavidad medular con suero salino.

Estos autores²⁸³ han comprobado la actividad osteoinductiva de la proteína mediante implantes subcutáneos observando que producía osificación endocondral. Posteriormente han creado defectos segmentarios de 5mm en el fémur de 45 ratas, fijados mediante placas, que se rellenaron con rhBMP-2 liofilizada (1,4 o 11 μ g). Esta fracción se ha aplicado junto con un extracto de matriz ósea alogénica desmineralizado mediante guanidina, utilizado como portador de BMP. Una cápsula de gelatina fué utilizada como material contenedor. Ambas dosis de rhBMP-2 indujeron formación de hueso endocondral en los defectos óseos. La

implantación de 11 μ g produjo mayor cantidad de hueso, resultando en una consolidación radiográfica e histológica del defecto entre las 3 y las 9 semanas. Las ratas que recibieron una dosis de 1,4 μ g no mostraron unión ósea. La formación de cartílago precedió al hueso en todas las muestras. En las ratas que recibieron una dosis baja de BMP aparecieron islotes de cartílago y de hueso dispersos a través del defecto en la cuarta semana pero no hubo continuidad ósea entre los fragmentos femorales. En el grupo que recibió altas dosis de BMP, cartílago, cartílago calcificado y osteoide aparecieron en el defecto a las dos semanas. La formación de médula ósea se produjo en la cuarta semana, tiempo en el que se comenzaba a observar una unión ósea entre los fragmentos llegando a producirse la consolidación en la novena semana.

Los resultados obtenidos en el Grupo BMP de este trabajo coinciden con los de Yaskop y col²⁸³ al demostrar la presencia de osificación endocondral al cabo de 6 semanas. En el Grupo "composite" con BMP se ha intentado relacionar la respuesta osteoinductiva de la BMP con la dosis y con el tiempo de evolución, evaluando cantidades de BMP entre 13 y 45mg a las 2, 6 y 12 semanas. Ha aparecido una mayor respuesta trabecular calcificada a las 12 semanas (90%) que a las 2 semanas (60%), Tabla X. Sin embargo, cuando aparecen dichas trabéculas no existen diferencias histológicas en el tiempo ni una relación proporcional a la cantidad de BMP. Las cantidades empleadas de BMP han sido mucho más altas que las del grupo de trabajo de Yasko²⁸³ y la consolidación tan sólo se pudo apreciar en dos ratas. La explicación a esta diferencia sustancial estriba por un lado en la purificación de la BMP utilizada por Yasko y por otro en el defecto de mucho menor dimensión (5mm) en el modelo experimental de este grupo.

Gerhart y col. en 1993⁵⁸ han utilizado BMP recombinada humana en el tratamiento de defectos óseos experimentales en ovejas. Un defecto de 2,5cm mediodiafisario realizado en el fémur derecho de ovejas fue estabilizado con placas y se observó el efecto de matriz ósea alogénica inactiva (Grupo II), BMP recombinada humana (rhBMP-2) mezclada con matriz ósea alogénica inactiva (Grupo III) e injerto óseo autólogo (Grupo

IV). Todos los animales tratados con rhBMP-2 y autoinjerto mostraron unión ósea. La formación de hueso en el grupo de la rhBMP-2 apareció a las cuatro semanas para ir aumentando en las semanas siguientes hasta llegar a una consolidación completa al cabo de tres meses. La resistencia ósea, comparada con el fémur contralateral, fue superior en el grupo de rhBMP-2 que en el grupo del autoinjerto. No se encontraron anticuerpos anti-BMP en el suero de las ovejas del grupo III. El nuevo hueso inducido por la rhBMP-2 estaba delimitado por osteoblastos, que ofrecían un aspecto aplanado y elongado (probablemente inactivos) la mayoría de las veces, mientras que otras aparecían redondos y abultados (activos). Cartilago sin organización específica se observó, particularmente en el área entre el hueso nuevo y el viejo.

Este grupo de trabajo⁵⁸ pone de manifiesto, al igual que Yasko y col.²⁸³ y Takaoka y col.²¹⁸ que de los diferentes péptidos con capacidad inductora de tejido óseo aislados por Wozney y col.²⁷⁹, la rhBMP-2 es la que mayor capacidad osteoinductiva posee.

Cuando se ha evaluado el Grupo "composite" sin BMP ha aparecido una respuesta fibrovascular de la que parten tractos conjuntivos con vasos que disocian en mayor o menor grado los diferentes biomateriales. No aparecen focos de calcificación, Fig. 23. El contenido celular es bajo y llama la atención la gran respuesta del tejido conjuntivo que tiene un aspecto cicatricial. Analizados individualmente los especímenes, radiológica e histológicamente, no pudo apreciarse en ninguno de ellos la aparición de trabéculas óseas, Tabla V.

Basándonos en estos resultados cabe pensar que el poliácido láctico utilizado no posee capacidad osteoinductiva como observaron Heckman y col.⁷⁴ que describen la formación de una pequeña cantidad de hueso con la implantación aislada de poliácido láctico a los tres meses en una pseudoartrosis de la diáfisis radial de perro.

Por otro lado la hidroxiapatita no ha mostrado capacidad osteoconductora fuera de un ambiente óseo cuando no se asocia una

sustancia osteoinductiva como ha ocurrido en el Grupo "composite" sin BMP.

Piecuch en 1982¹⁶⁷ demuestra que la implantación extraesquelética de hidroxiapatita porosa únicamente da lugar a la formación de un tejido fibrovascular sin formación ósea. Lo que indica que la hidroxiapatita, por sí sola, no actúa como un sustrato inductor de hueso.

Por otro lado Ripamonti¹⁷⁶, encuentra con la utilización de hidroxiapatita porosa sólo en implantes intramusculares realizados en monos la formación de hueso sin fase endocondral.

En el Grupo "composite" con BMP, llama la atención la gran respuesta de trabéculas calcificadas que asemejan el hueso esponjoso, Figs. 24,25,26 y 27. Estas imágenes histológicas constan de abundante contenido en calcio y matriz ósea con abundantes mucopolisacáridos, bien en sustancia o fibras, por su positividad con la tinción de PAS. Se presenta una intensa proliferación del tejido conjuntivo rico en vasos, fibras y células entre las trabéculas calcificadas. Estas estructuras neoformadas lo han hecho dentro de los poros, que se han formado al fragmentarse el poliácido láctico^{209,210}. Este biomaterial ha comenzado su proceso de reabsorción por una fase de hidrólisis produciendo una fragmentación al cabo de dos semanas sin llegar a reabsorberse a las 12 semanas. La cristalinidad y el peso molecular (3600d) son los causantes del mayor tiempo de reabsorción^{209,210} si lo comparamos con el poliácido láctico de 650d utilizado por Miyamoto y col¹⁵⁰ que se reabsorbe en 3 semanas.

La inducción ósea ha sido positiva en este grupo, oscilando entre un 60% a las 2 semanas y un 90% a las 12 semanas, Tabla X. Veinte y dos de los 30 especímenes (73.3%) presentaron inducción ósea positiva.

Tan sólo en dos ratas se observó una unión macroscópica y radiológica del cilindro a los extremos óseos del huesped, si bien no se pudo demostrar una continuidad ósea en el análisis histológico.

En el espesor de las trabéculas aparecen unas depresiones vacías de contenido que pudieran corresponder a lagunas osteocitarias. Ante este fenómeno se puede especular con diferentes teorías. Una de ellas es la posible falta del mensaje de transformación celular. Otra, es la alteración mecánica-bioquímica de formación del hueso por parte de la hidroxiapatita inerte. Por último, se puede pensar en fenómenos derivados de la biodegradación del poliácido láctico que produzcan un ambiente citotóxico próximo.

Probablemente la mejora de este biomodelo en estudios posteriores pase por una modificación parcial de la estabilización mecánica que permita un contacto directo entre el biomaterial y el hueso, conservando la premisas del presente estudio; una mejora en la unión de la BMP a su portador que facilite su función; utilización de una BMP purificada con alta capacidad osteoinductiva (rhBMP-2) y por último evaluación de la osteoinducción en un animal de talla mayor de este biomodelo.

V. CONCLUSIONES

V.- CONCLUSIONES

1.- La fabricación del cilindro compuesto de hidroxiapatita, poliácido láctico y polimetacrilato de metilo de 15X5mm, se ha mostrado como una técnica sencilla y que cumple los objetivos de soporte estructural del defecto y su porosidad no altera la resistencia del mismo.

2.- La inclusión de la BMP en el cilindro se ha conseguido con un método simple y reproducible sin alterar aparentemente los caracteres organolépticos de la misma permitiendo su adhesión por disolución y desecación al vacío con el poliácido láctico de 3.600d de peso molecular, que posteriormente se va a degradar.

3.- La presencia del cilindro en el defecto óseo ha contribuido a la estabilidad biomecánica, mantenimiento del defecto y taponamiento de los canales medulares del modelo experimental.

4.- En un 60% de los casos del Grupo con BMP en cápsulas de gelatina se apreció crecimiento óseo inducido en forma de osículos dispersos en el defecto e independientemente del tiempo transcurrido.

5.- En el Grupo "composite" sin BMP no se observó la aparición de inducción en ninguno de los períodos estudiados aunque si tractos conjuntivos con vasos sanguíneos a través de los poros del cilindro. Esto supone una degradación del poliácido láctico al cabo de dos semanas.

6.- En el Grupo "composite" con BMP aparecieron trabéculas calcificadas idénticas al hueso esponjoso entre un 60% a las 2 semanas y un 90% a las 12 semanas que crecieron a través de los poros del cilindro.

7.- En el Grupo con BMP únicamente aparecieron imágenes radiológicas de densidad calcio distribuidas en el defecto. En el Grupo "composite" sin BMP el cilindro mostró imágenes radiolúcidas traduciendo la porosidad del mismo. Mientras que en el Grupo "Composite" con BMP apareció un cilindro radiopaco.

8.- Tan sólo en dos muestras del Grupo "composite" con BMP se observó una continuidad macroscópica y radiológica entre el cilindro y el hueso del huésped. Este fenómeno no se comprobó histológicamente.

VI. BIBLIOGRAFIA

VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Amitani K, Nakata Y: Studies on a factor responsible for new bone formation from osteosarcoma in mice. *Calcif Tissue Res* 17:139, 1975.
- 2.- Anderson HC: Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 41:59, 1969.
- 3.- Annersten: Uber die osteogenese bei der fralaturheilunh. *Chirug.*, 1941.
- 4.- Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eagleson CC, Hattori A, Owen M: Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop* 151:294, 1980.
- 5.- Aspenberg P, Lohmander LS, Thorngren KG: Failure of bone induction by bone matrix in adult monkeys. *J Bone Joint Surg* 70-B:625, 1988.
- 6.-Barth A: Histologische Untersuchungen uber Knochenimplantationen. *Beitr Pathol Anat* 17:65, 1895.
- 7.- Bauer FCH, Urist MR: Human osteosarcoma-derived soluble bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 154:291, 1981.
- 8.- Bessho K, Tagawa T, Murata M: Analysis of Bone Morphogenetic Protein (BMP) derived from human and bovine matrix. *Clin Orthop* 268: 226, 1991.
- 9.- Beresford JN, Gallagher JA, Gowen M, Couch M, Poser J, Wood DD, Russel RGG: The effects of monocyte-conditioned medium and interleukin-1 on the synthesis of collagenous proteins by mouse and human bone cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 801:58, 1984.

- 10.- **Beresford JN:** Osteogenic stem cells and stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop* 240:270, 1989.
- 11.- **Bier A:** Osteoplastische nekrotomie nebst bemerkungen uber die and der kieler chirurgischen klinick ausgerfuhrten methoden der nekrotomie. *Arch Klin Chir* 43:121, 1892.
- 12.- **Bier A:** Aussprache. *Chir Kingr* 1924 (z. O. 27-72).
- 13.- **Bonewald LF, Mundy GR:** Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop* 250:261, 1990.
- 14.- **Bonucci E, Matrajt H, Tun-Chot S, Hioco D:** Bone structure in osteomalacia with special reference to ultrastructure. *J Bone Joint Surg* 51-B:511, 1969.
- 15.- **Bonucci E:** The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clin Orthop* 78:108, 1971.
- 16.- **Bos GD, Goldberg VM, Zika JM, Heiple KG, Powell AE:** Immune response of rats to frozen bone grafts. *J Bone Joint Surg* 65-A:239, 1983.
- 17.- **Boskey AL:** Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin Orthop* 281:244, 1992.
- 18.- **Bostman OM:** Absorbable implants for the fixation of fractures. *J Bone Joint Surg* 73-A:148, 1991.
- 19.- **Bostman O, Paivarinta U, Partio E, Vasenius J, Manninen M, Rokkanen P:** Degradation and tissue replacement of an absorbable polyglycolide screw in the fixation of rabbit femoral osteotomies. *J Bone Joint Surg* 74-A:1021, 1992.

- 20.- Boyan BD, Schwartz Z, Swain LD, Khare AG, Heckman JD, Ramirez V, Peters P, Carnes DL: Initial effects of partially purified bone morphogenetic protein on the expression of glycosaminoglycan, collagen and alkaline phosphatase in nonunions cell cultures. *Clin Orthop* 278:286, 1992.
- 21.- Brighton CT: Principles of fracture healing. Part I. The biology of fracture repair. *Instr Course Lect* 32:60, 1984.
- 22.- Bucholz RW, Carlton A, Holmes R: Interporous hidroxyapatite as a bone graft substitute in tibias plateu fractures. *Clin Orthop* 240:53, 1989.
- 23.- Buring K, Urist MR: Effects of ionizing radiation on the bone induction principle in the matrix of bone implants. *Clin Orthop* 55:225, 1967.
- 24.- Canalis E: Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clin Orthop* 193:246, 1985.
- 25.- Canalis E, Centrella M, Urist MR: Effect of partially purified bone mophogenetic protein on DNA synthesis and cell replication calvarial and fibroblasts cultures. *Clin Orthop* 196:289, 1985.
- 26.- Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J: Bone formation by osteoblast-like cells in the three-dimensional cell culture. *Calcif Tissue Int* 46:46, 1990.
- 27.- Casteleyn PP, Handelberg F, Haentjens P: Biodegradable rods versus kirschner wire fixation of wrist fractures. A randomised trial. *J Bone Joint Surg* 74-B:858, 1992.
- 28.- Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick R, Rosen V, Wang EA, Wozney JM: Identification of transforming growth factor beta family members present in bone inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Ac Sci (USA)* 87:9843, 1990.

- 29.- Centrella M, Canalis E: Local regulators of skeletal growth: A perspective. *Endocr Rev* 6:544, 1985.
- 30.- Centrella M, McCarthy Tl, Canalis E.- Transforming growth factor-beta and remodeling bone. *J Bone Joint Surg* 73-A:1418, 1991.
- 31.- Chalmers J, Sissons HS: An experimental comparison of bone grafting materials in the dog. *J Bone and Joint Surg* 41-B:209. 1959.
- 32.- Conover MA, Urist MR: Dentin matrix bone morphogenetic protein. En: *The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissues*. A. Veis (Ed.) Elsevier-North Holland, New York, 1982, 597-606.
- 33.- Coulson RA: Relationship between fluid flow and O₂ demands in tissues in vivo and in vitro. *Perspect Biol Med* 27:124, 1983.
- 34.- Craven P, Urist MR: Osteogenesis by radioisotoped labelled cell populations in implants of bone matrix under the influence of ionizing irradiation. *Clin Orthop* 76:231, 1971.
- 35.- Cuadrado Cenxual MA: Inducción y regeneración ósea bajo la influencia de la proteína morfogenética ósea (BMP). *Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid*. 1991.
- 36.- Dallemagne MJ, Fabry C: Structure of bone salts. En *Bone structure and metabolism*. CIBA Symposium 14, Churchill, 1956.
- 37.- Deaver JB: Secondary bone implantation by a modification of Senn's method. *Med News* 55:714, 1889.
- 38.- Doisy EA: Sex hormones porter. *Lectures delivered at the University of Kansas*. 1936.

- 39.- Doppelt SM, Tomford WW, Lucas AB, Mankin HJ: Operational and financial aspects of a hospital bone bank. *J Bone Joint Surg* 63-A:1472, 1981.
- 40.- Dziewiatrowski DC: The role of sulfated protein-polysaccharides in calcification. *Clin Orthop* 35:199, 1964.
- 41.- De Groot K, Greesink R, Klein CPAT, Saerekian P: Plasma sprayed coatings of hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 21:1375, 1987.
- 42.- De La Piedra C, Tournal V, Rapado A: Osteocalcina. Bioquímica, fisiología, niveles normales y en diferentes patologías. *Rev Clin Esp* 181:213, 1987.
- 43.- Ekelund A, Nilsson OS: Effects of Cyclosporin A on experimental new bone formation in rats. *Clin Orthop* 284:288, 1992.
- 44.- Elias JA, Gustiolo K, Baeder W, Freundlich B: Synergistic stimulation of fibroblasts prostaglandin production by recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* 138:3812, 1987.
- 45.- Engh CA, Bobyn JD, Glassman AH: Porous-coated hip replacement. The factors governing bone ingrowth, stress shielding and clinical results. *J Bone Joint Surg* 69-B:45, 1987.
- 46.- Engstrom A: Structure of bone. *Clin Orthop* 17:34, 1960.
- 47.- Engstrom C, Jennings J, Bayling LM: Effect of bone matrix-derived growth factors on skull and tibia in the growing rat. *J Oral Pathol* 17:334, 1988.
- 48.- Firschein HE, Urist MR: The induction of alkaline phosphatase by extraskeletal implants of bone matrix. *Calc Tiss Res* 7:108, 1971.

- 49.- Firschein HE, Urist MR: The induction of alkaline phosphatase by extraskeletal implants of bone matrix. *Clin Orthop* 84:263, 1972.
- 50.- Fleisch H, Russel RGG, Bisaz S, Bonjour JP: The effect of pyrophosphate and diphosphonates on calcium metabolism. En: Hard tissues growth, repair and remineralization, 348, *Exc Med* 1973.
- 51.- Francis MD, Briner WW, Gray JA: Chemical agents in the control of calcification processes in biological systems. En: Hard tissues growth, repair and remineralization, 57, *Exc Med* 1973.
- 52.- Friedenstein AJ: Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 47:327, 1976.
- 53.- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov U: Bone marrow osteogenic stem cells: "in vitro" cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tis Kinet* 20:263, 1987.
- 54.- Friedlaender GE: Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop* 174:58, 1983.
- 55.- Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW: Studies on the antigenicity of bone. *J Bone Joint Surg* 66-A:107, 1984.
- 56.- Friedlaender GE: Current concepts review. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg* 69-A:786, 1987.
- 57.- Frost HM: Dynamics of bone remodeling. En: Frost edit. *Bone Biodynamics*. 315-333. Little Brown. Boston. 1964.
- 58.- Gerhart TN, Kirker-Head CA, Vet MA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E: Healing segmental femoral defects in sheeps using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 293:317, 1993.

- 59.- Glimcher MJ, Krane SM: The organization and structure of bone. En: Gould y Ramachandran edit. *A treatise on collagen II*, Academic Press, London, 1968.
- 60.- Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB: Fate of mineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif Tis Int* 33:71, 1981.
- 61.- Glowacki J, Jaban LB, Murray JE, Folkman JE, Mulliken JB: Application of the biological principle of induced osteogenesis for cranio-facial defects. *Lancet* 1:959, 1981.
- 62.- Goldberg VM, Powell AE, Shaffer JW, Zika JM, Bos GD, Heiple KG: Bone grafting role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3:389, 1985.
- 63.- Goldhaber P: Osteogenic induction across Millipore filler in vivo. *Science* 2065, 1961.
- 64.- Goldring SR, Roelke MS, Petrison KK, Evins AE, Krane SM: Mechanism by which monocyte-macrophage products regulate response of connective tissue (bone and synovial) cells to hormones. *Bone Min Res* 2:239, 1987.
- 65.- Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI: The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed "in vivo" in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop* 262:298, 1991.
- 66.- Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, Mcguire MKB, Ruseel GG: An interleukin-1 factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 306:378, 1983.
- 67.- Gundberg CM, Lian JB, Gallop PM: Measurements of gamma-carboxyglutamate and circulating osteocalcin in normal children and adults. *Clin Chim Acta* 128:1, 1983.

- 68.- Guterman IA, Boman TE, Wang GJ, Balian G: Bone induction in intramuscular implants by demineralized bone matrix: Sequential changes of collagen synthesis. *Col Rel Res* 8:419, 1988.
- 69.- Ham AW: Hueso. En: *Tratado de histología*, Arthur W. Ham (Eds.), Madrid, España, Editorial Interamericana, 1975.
- 70.- Hanamura H, Higuchi Y, Nakagawa M, Iwata H, Nogami H, Urist MR: Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix. *Clin Orthop* 148:281, 1980.
- 71.- Hanamura H, Higuchi Y, Nakagawa M, Iwata H, Urist MR: Solubilization and purification of bone morphogenetic protein (BMP) from Dunn osteosarcoma. *Clin Orthop* 153:242, 1980.
- 72.- Hanamura H, Higuchi Y, Nakagawa M, Iwata H, Nogami H, Urist MR: Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix. *Clin Orthop* 148:281, 1982.
- 73.- Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrate MD, Doleman SE, Klasbrun M: Growth factors in bone matrix. *J Biol Chem* 261:2665, 1986.
- 74.- Heckman JD, Boyan BD, Aufdemorte TB, Abbot JT: The use of bone morphogenetic protein in the treatment of non-union in canine model. *J Bone Joint Surg* 73-A:750, 1991.
- 75.- Hejna WF, Ray RD: Comparative study of bone implants. *Surg Forum* 14:448, 1963.
- 76.- Herring GM: The organic matrix of bone. En: Bourne edit. *The biochemistry and physiology of bone I*, London Academic Press, 1972.

- 77.- Higashi S, Yanamuro T, Nakamura T, Ikada Y, Hyon SH, Hamshidi K: Polymer-hydroxyapatite for biodegradable bone fillers. *Biomaterials* 7:183, 1986.
- 78.- Higuchi Y, Hanamura H, Iwata H, Kajino G, Nakagawa M, Nogami H: Chondro-osteogenesis of Dunn osteosarcoma intracellular localization of bone morphogenetic protein (BMP). *Bone Metabolism* 13:270, 1980.
- 79.- Hohling HJ, Ashton BA, Koster HD: Quantitative electron microscopic in investigations of mineral nucleation in collagen. *Cell Tis Res* 148:11, 1974.
- 80.- Hollinger JO: Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA). *J Biomed Mat Res* 17:71, 1983.
- 81.- Holmes R, Mooney V, Bucholz R, Tencer A: A coralline hydroxyapatite bone graft substitute: Preliminary report. *Clin Orthop* 157:259, 1984.
- 82.- Holmes RE, Hagler HK: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in mandibular contour augmentation: A histometric study. *J Oral Max Surg* 45:421, 1987.
- 83.- Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: A histometric study. *J Orthop Res* 5:114, 1987.
- 84.- Holmes RE, Hagler HK: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in maxillary augmentation: A histometric study. *J Cranio-Max-Fac Surg* 16:199, 1988.

- 85.- Hoogendoorn HA, Renooij W, Akkermans LMA, Visser W, Wittebol P: Long-term study of large ceramic implants (porous hydroxyapatite) in dog femora. *Clin Orthop* 187:281, 1984.
- 86.- Horisaka Y, Okamoto Y, Matsumoto N, Yoshimura Y, Kawada J, Yamashita K, Takagi T: Subperiosteal implantation of bone morphogenetic protein adsorbed to hydroxyapatite. *Clin Orthop* 268:303, 1991.
- 87.- Horowitz MC, Friedlaender GE: Immunologic aspects of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 2:227, 1987.
- 88.- Huggins CB: The formation of bone under the influence of epithelium of the urinary tract. *Arch Surg* 22:377, 1931.
- 89.- Huggins CB, Urist MR: Dentin matrix transformation: Rapid induction of alkaline phosphatase and cartilage. *Science* 167:896, 1970.
- 90.- Hulth AA, Johnell O, Henricson A: The implantation of demineralized fracture matrix yields more new formation than does intact matrix. *Clin Orthop* 234:235, 1988.
- 91.- Hulth A: Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop* 249:265, 1989.
- 92.- Ilizarov Ga: Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop* 239:8, 1990.
- 93.- Irving JT, Wuthier RE: Histochemistry and biochemistry of calcification with special reference of the role of lipids. *Clin Orthop* 56:237, 1968.
- 94.- Iwata H, Urist MR: Protein polysaccharide of bone morphogenetic matrix. *Clin Orthop* 87:257, 1972.

- 95.- Iwata H, Hanamura H, Kaneko M, Yasuhara N, Terashima Y, Kajubi G, Ida K, Mabuchi Y, Nakagawa M: Chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogeneic (AAA) bone matrix gelatin for repair of defects from excision of benign bone tumors. *Clin Orthop* 154:150, 1984.
- 96.- Iyoda K, Miura T, Nogami H: Repair of bone defects with cultures chondrocytes bound to hydroxyapatite. *Clin Orthop* 288:287, 1993.
- 97.- James R, Bradshaw RA: Polypeptide growth factors. *Ann Rev Biochem* 53:259, 1984.
- 98.- Jarcho M: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 157:259, 1981.
- 99.- Jergesen HE, Chua J, Kao RT, Kaban LB: Age effects on bone induction by demineralized bone powder. *Clin Orthop* 268:253, 1991.
- 100.- Jirarattanaphochai K, Kiat TS, Chua D, Chin SI: The effect of methylprednisolone on porcine bone morphogenetic protein in fracture healing. An experimental allograft model in rabbits. *Clin Orthop* 292:366, 1993.
- 101.- Johnson EE, Urist MR, Finerman GAM: Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 236:249, 1988.
- 102.- Johnson EE, Urist MR, Finerman GAM: Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report. *Clin Orthop* 230:257, 1988.

- 103.- Johnson EE, Urist MR, Schmalzried TP, Chotivichit A, Huang HK, Finerman GAM: Autogeneic cancellous bone grafts in extensive segmental ulnar defects in dogs: Effects of xenogeneic bovine bone morphogenetic protein without and with interposition of soft tissues and interruption of blood supply. *Clin Orthop* 243:254, 1989.
- 104.- Johnson EE, Urist MR, Finerman GAM: Repair of segmental defects of the tibia with cancellous bone grafts augmented with human bone morphogenetic protein: A preliminary report. *Clin Orthop* 236:249, 1990.
- 105.- Johnson EE, Urist MR, Finerman GAM: Distal metaphyseal tibial nonunion. Deformity and bone loss treated by open reduction, internal fixation, and human bone morphogenetic protein (hBMP). *Clin Orthop* 250:234, 1990.
- 106.- Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME: Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 1:199, 1990.
- 107.- Kataoka H, Urist MR: Transplant of bone marrow and muscle-derived connective tissue cultures in diffusion chambers for bioassay of bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 286:262, 1993.
- 108.- Kawai T, Urist MR: Bovine tooth-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 68:1069, 1989.
- 109.- Kawai T, Miki A, Ohno Y, Umemura M, Kataoka H, Kurita S, Koie M, Jinde T, Hasegawa J, Urist MR: Osteoinductive activity of composites of bone morphogenetic protein and pure titanium. *Clin Orthop* 290:296, 1993.
- 110.- Kawamura M, Iwata H, Sato K, Miura T: Chondroosteogenic response to crude bone matrix proteins bound to hydroxiapatite. *Clin Orthop* 217:281, 1987.

- 111.- Kawamura M, Urist MR: Induction of callus formation by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin Orthop* 197:240, 1988.
- 112.- Kawamura M, Urist MR: Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 235:302, 1988.
- 113.- Kawamura M, Urist MR: Induction of callus formation by implants of bone morphogenetic protein and associated bone matrix noncollagenous proteins. *Clin Orthop* 236:240, 1988.
- 114.- Kawamura M, Urist MR: Growth factors, mitogens, cytokines and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture. *Dev Biol* 130:435, 1988.
- 115.- Keith A: *Menders of The Maimed*. Oxford. Oxford Press. 1919.
- 116.- Kent JN, Kay FJ, Jarcho M: Hydroxiapatite blocks and particles as bone grafts substitutes in orthognathic and reconstructive surgery. *J Oral Max Surg* 44:597, 1986.
- 117.- Kitsugi T, Yamamuro Y, Kokubo T: Bonding behavior of a glass-ceramics containing apatite and wollastonite in segmental replacement of the rabbit tibia under load-bearing conditions. *J Bone Joint Surg* 71-A:264, 1989.
- 118.- Kohler P, Kreicbergs A: Incorporation of autocalved autogeneic bone supplemented with allogenic demineralized bone matrix: An experimental study in the rabbit. *Clin Orthop* 218:247, 1987.
- 119.- Kotani S, Yamamuro T, Nakamura T, Kitsugi T, Fujita Y, Kawanabe K, Kokubo T: Enhacemente of bone bonding to bioactive ceramics by demineralized bone powder. *Clin Orthop* 278:226, 1992.

- 120.- Kubler N, Urist MR: Cell differentiation in response to partially purified osteosarcoma derived bone morphogenetic protein "in vivo" and "in vitro". *Clin Orthop* 292:321, 1993.
- 121.- Kuboki Y, Takita H, Homori T, Mizuno M, Furu-Uchi E, Taniguchi K: Separation of bone matrix proteins by calcium-induced precipitation. *Calcif Tis Int* 44: 269, 1989.
- 122.- Kuemmel H: Ueber Knochenimplantation. *Menchen Med Schr* 37:746, 1891.
- 123.- Landesman R, Reddi H: Chemotaxis of muscle derived mesenchymal cells to bone inductive proteins of rat. *Calcif Tis* 39:259, 1986.
- 124.- Leriche R, Policard A: Some fundamental principles in the pathology of bone. *Surg Gynecol Obstet* September 56-87, 1926.
- 125.- Leriche R, Policard A: The Normal and Pathological Physiology of Bone: Its Problems. St. Louis, C.V. Mosby Co., 1928.
- 126.- Levander G: Induction Phenomena In Tissue Regeneration. Baltimore. Williams and Wilkins Co. 1964.
- 127.- Lianjia Y, Yan J: Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. *Clin Orthop* 257:249, 1990.
- 128.- Lindholm TS, Urist MR: A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow and bone matrix. *Clin Orthop* 150:288, 1980.
- 129.- Lindholm TS, Nilsson OS, Lindholm TC: Extraskelatal and intraskelatal new bone formation induced by demineralized bone matrix combined with bone marrow cells. *Clin Orthop* 171:251, 1982.

130. Lindhom TC, Lindhom TS, Alitalo I, Urist MR: Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) induced repair of skull trephine defects in sheep. *Clin Orthop* 227:265, 1988.
- 131.- López-Durán Stern L: Potenciales bioeléctricos en el callo de fractura y su correlación histológica (estudio experimental). *Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid*, 1978.
- 132.- López-Durán Stern L: Banco de huesos. *N Arch Fac Med* 33:115, 1987.
- 133.- López-Durán Stern L: Experimental production of heterotopic bone (F. Martín Lagos and M. Zarapico Romero). *Clin Orthop* 283:4, 1992.
- 134.- Lovell TP, Dawson EG, Nilsson OS, Urist MR: Augmentation of spinal fusion with bone morphogenetic protein in dogs. *Clin Orthop* 243:266, 1989.
- 135.- Lucas PA, Price PA, Caplan AI: Chemotactic response of mesenchymal cells, fibroblasts and osteoblast-like cells to bone gla protein. *Bone* 9:319, 1988.
- 136.- Lucas PA, Syftestad GT, Goldberg VM, Caplan AJ: Ectopic induction of cartilage and bone by water-soluble proteins from bovine bone using a collagenous delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* 23:39, 1989.
- 137.- Luria EA, Owen ME, Friedenstein AJ, Morris JF, Kuznetsow SA: Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell Tis Res* 248:449, 1987.
- 138.- Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumdrum N, Hammonds RG, Nevins WB, Wood WI, Reddi AG: Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 264:13377, 1989.

- 139.- Mackie W: Clinical observations on the healing of aseptic bone cavities by Senn's method of implantation of antiseptic decalcified bone. *Med News* 57:202, 1890.
- 140.- Mahypr, Urist MR: Experimental heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein and recombinant human interleukin-1B. *Clin Orthop* 237:236, 1988.
- 141.- Malone JD, Teitelbaum SL, Griffin GI, Kahn AJ: Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *J Cell Biol* 92:227, 1982.
- 142.- Manabe S, Shima I, Yamanichi: Cytokinetic analysis of osteogenic cells in the healing process after fracture. *Acta Orthop Scand* 46:161, 1975.
- 143.- Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W: Clinical experience with allograft implantation: The first ten years. *Clin Orthop* 174:69, 1983.
- 144.- Martín-Lagos F, Zarapico M: Obtención experimental de hueso metaplásico. *Trabajos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas VI*: 173, 1946.
- 145.- Martín-Lagos F, Zarapico M: Obtención experimental de hueso heterotópico. *Rev Esp Cir Traum Ortop* 4:150:161, 1946.
- 146.- Maurer RC, Dillin L: Multistaged surgical management of posttraumatic segmental tibial bone loss. *Clin Orthop* 216:162, 1987.
- 147.- Mickulicz J Von (1890): Citado por Schmitt A 1893.
- 148.- Miller Ag: A case of bone grafting with decalcified bone chips. Remarks. *Lancet* II: 618, 1890.

- 149.- Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa H, Hashimoto J, Suzuki S, Ono K: Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 278:274, 1992.
- 150.- Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa H, Hashimoto J, Suzuki S, Ono K: Polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer. A new biodegradable synthetic carrier for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 294:333, 1993.
- 151.- Miyamoto S, Takaoka K, Ono K: Bone induction in monkeys by bone morphogenetic protein. A trans-filter technique. *J Bone Joint Surg* 75-B:107, 1993.
- 152.- Mizutani H, Urist MR: The nature of bone morphogenetic protein (BMP) fractions derived from bovine bone matrix gelatin. *Clin Orthop* 171:213, 1982.
- 153.- Müller-Glauser W, Humbel M, Glatt M, Strauli P, Winterhalter KH, Bruckner P: On the role of type IX collagen in the extracellular matrix of cartilage: Type IX collagen is localized in the intersections of collagen fibrils. *J Cell Biol* 102:1931, 1986.
- 154.- Muthukumaran N, Reddi AH: Bone matrix-induced local bone induction. *Clin Orthop* 200:159, 1985.
- 155.- Muthukumaran N, Ma S, Reddi AH: Dose-response of and theshold for optimal bone induction by collagenous bone matrix and osteogenin-enriched fraction. *Collagen Rel Res* 8:433, 1988.
- 156.- Nakagawa M, Urist MR: Chondrogenesis in tissue cultures of muscle under the influence of a diffusible component of bone matrix. *Proc Soc Exp Biol Med* 154:568, 1977.

- 157.- Nakahara H, Takaoka K, Koekuzo M, Sugamoto K, Tsuda T, Ono K: Periosteal bone formation elicited by partially purified bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 239:299, 1989.
- 158.- Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI: Culture-expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics "in vivo". *Clin Orthop* 276:291, 1992.
- 159.- Nelson JF, Stanford HG, Cutright DE: Evaluation and comparisons of biodegradable substances as osteogenic agents. *Oral Surg* 43:836, 1977.
- 160.- Nilsson O, Urist MR, Dawson EG, Schmalzried TP, Finerman GAM: Bone repair induced by bone morphogenetic protein ulnar defects in dogs. *J Bone Joint Surg* 68-B:635, 1986.
- 161.- Nogami H, Urist Mr: Substrata prepared from bone matrix for chondrogenesis in tissue culture. *J Cell Biol* 62:510, 1974.
- 162.- Nolan PC, Nicholas RM, Mulholland BJ, Mollan RAB, Wilson DJ: Culture of human osteoblasts on demineralised human bone. Possible means of graft enhancement. *J Bone Joint Surg* 74-B:284, 1992.
- 163.- Oikarinen J: Experimental fusion with decalcified bone matrix and deep-frozen allogeneic bone in rabbits. *Clin Orthop* 162:210, 1982.
- 164.- Owen ME: Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. *Bone Min Res* 3:1, 1985.
- 165.- Owen ME, Friedenstein AJ: Stromal stem cells: marrow derived osteogenic precursors. En: *Cell and Molecular Biology of Vertebrate hard Tissues..* Ciba Foundation Symposium 136: 42, 1988.
- 166.- Peltier LF, Bickel EY, Lillo R, Thein MS: The use of plaster of paris do fill defects in bone. *Ann Surg* 146:61, 1957.

- 167.- **Piecuch JF**: Extraeskeletal implantation of a porous hydroxiapatite ceramics. *J Dent Res* 61:1458, 1982.
- 168.- **Pihlajamaki H, Bostman O, Hirvensalo E, Tormala P, Rokkanen P**: Absorbable pins of self-reinforced poly-L-lactic acid por fixation of fractures and osteotomies. *J Bone Joint Surg* 74-B:853, 1992.
- 169.- **Pizauro JM, Curti C, Ciancaglini P, Leone FA**: Kinetic properties of triton X-100 solubilized bone matrix induced alkaline phosphatase. *Cell Mol Biol* 34:553-562, 1988.
- 170.- **Price P, Urist MR, Otawara Y**: Matrix GLA protein. A new Beta-carboxyglutamic acid-containig protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 117:765, 1983.
- 171.- **Pritchard JJ**: General histology of bone. En: Bourne edit. *The biochemistry and physiology of bone. 1*, Academic Press, London 1972 I.
- 172.- **Ragni PC, Lindholm TS, Lindholm TC**: Vertebral fusion dynamics in the thoracic and lumbar spine induced by allogeneic demineralized bone matrix combined with autogenous bone marrow. *Ital J Orthop Traumatol* 13:241, 1987.
- 173.- **Ragni PC, Lindholm TS**: Bone formation ans static changes in the thoracic spine and uni or bilateral experimental spondylodesis with demineralized bone matrix. *Ital J Orthop Traumatol* 15:237, 1989.
- 174.- **Ray RD, Holloway JA**: Bone implants. *J Bone Joint Surg* 39-A: 1119, 1957.
- 175.- **Reddi AH**: Regulation of bone differentiation by local and systemic factors. *Bone Min Res* 3:27, 1985.

- 176.- Ripamonti U: The morphogenesis of bone in replicas of porous hydroxyapatite obtained from conversion of calcium carbonate exoskeletons of coral. *J Bone Joint Surg* 73-A:692, 1991.
- 177.- Ripamonti U: Bone induction in nonhuman primates: an experimental study on the baboon. *Clin Orthop* 269:284, 1991.
- 178.- Ripamonti U: Calvarial regeneration in primates with autolyzed antigen-extracted allogenic bone. *Clin Orthop* 282:293, 1992.
- 179.- Rivero DP, Fox J, Skipor AK, Urban RM, Galante JO: Calcium phosphate-coated porous titanium implants of enhanced skeletal fixation. *J Biomed Mater Res* 21:191, 1988.
180. Robey PG, Young MF, Flanders Kc y col.: Osteoblasts synthesize and respond to transforming grow factor beta "in vitro". *J Cell Biol* 105:457, 1987.
- 181.- Robinson RA: An electron microscopio study of bone. *J Bone Joint Surg* 34-A:389, 1952.
- 182.- Robinson RA, Elliot SR: The water content of bone I. *J Bone Joint Surg* 39-A:167, 1957.
- 183.- Rodrigo RR, Schnaser AM, Reynolds HM, Biggart JM III, Leathers MV, Chism SE, Thorson E, Grotz T, Yang QM: Inhibition of the immune response to experimental fresh osteoarticular allografts. *Clin Orthop* 243:235, 1989.
- 184.- Rouiller C: Collagen fibers of connective tissue. En Bourne edit. *Biochemistry and phisiology of bone* 107. Academic Press, London. 1956.
- 185.- Rous P: Viruses and tumor causation. An appraisal of present knowledge. *Nature* 207:457, 1965.

- 186.- Roushalanti E, Vahery A: Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma. *J Exp Med* 141:497, 1975.
- 187.- Sakano S, Murata Y, Miura T, Iwata H, Sato K, Matsui N, Seo H: Collagen and alkaline phosphatase gene expression during bone morphogenetic protein (BMP)-induced cartilage and bone differentiation. *Clin Orthop* 292:337, 1993.
- 188.- Sampath TK, Reddi AH: Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine and rat extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 80:6591, 1983.
- 189.-Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH: Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 84:7109, 1987.
- 190.- Sato K, Urist MR: Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin Orthop* 197:301, 1985.
- 191.- Sato K, Urist MR: Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture. *Clin Orthop* 183:180, 1984.
- 192.- Sato T, Kawamura M, Sato K, Iwata H, Miura T: Bone morphogenesis of rabbit bone morphogenetic protein-bound hydroxyapatite-fibrin composite. *Clin Orthop* 263:254, 1991.
- 193.- Schlag G, Redl H: Fibrin sealant in orthopaedic surgery. *Clin Orthop* 227:269, 1987.
- 194.- Schmitt A: Ueber Osteoplastik in Klinischer und Experimenteller. *Beziehung Arch Klin Chir* 45:401, 1893.
- 195.- Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop* 205,299, 1986.

- 196.- Schmitz JP, Hollinger JO: A preliminary study of the osteogenic potential of a biodegradable alloplastic-osteoinductive alloimplant. *Clin Orthop* 237:245, 1988.
- 197.- Schwarz N, Schlag G, Thurnher M: Fresh autogeneic, frozen allogeneic, and decalcified allogeneic bone grafts in dogs. *J Bone Joint Surg* 73-B:787, 1991.
- 198.- Scott BL: Thymidine H3 electron microscope radioautography of osteogenic cells in the fetal rat. *J Cell Biol* 35:115, 1967.
- 199.- Segal S, Siegal T, Altaraz H, Level A, Nevo Z, Nebel L, Katzenelson A, Feldman M: Fetal bone grafts do not elicit allograft rejection because of protecting anti-Ia alloantibodies. *Transplantation* 28:88, 1979.
- 200.- Senn N: On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. *Am J Med Sci (New series)* 98:219, 1889.
- 201.- Sharrard WJW, Collins DH: the fate of human decalcified bone grafts. *Proc Royal Soc Med* 54:1101. 1961.
- 202.- Sharawy M: Bone induction in primates by demineralized bone matrix. *J Oral Max Surg* 48 (5): 547, 1990.
- 203.- Silbermann M, Reddi AB, Hand AR, Leapman R, Von Der Mark K, Franzen A: Chondroid bone arises from mesenchimal stem cells in organ culture of mandibular condyles. *J Craniofacial Gen Dev Biol* 7:59, 1987.
- 204.- Solomon L: Bone grafts. *J Bone Joint Surg* 73-B:706, 1991.
- 205.- Sporn MD, Todard GJ: Autocrine secretion of cells. *N Engl J Med* 303:878, 1980.

- 206.- **Stevenson S:** The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg* 69-A:573, 1987.
- 207.- **Stevenson S, Dannuci GA, Sharkey NA, Pool RR:** The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue-antigenmatched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg* 71-A:1297, 1989.
- 208.- **Syftestad GT, Triffitt JT, Urist MR, Caplan AI:** An osteo-inductive bone matrix extract stimulates the in vitro conversion of mesenchyme into chondrocytes. *Calcif Tis Int* 36:625, 1984.
- 209.- **San Román J:** Polímeros biodegradables de interés en cirugía. Síntesis, propiedades y mecanismos biodegradativos. *Rev Plást Mod* 413:689, 1990.
- 210.- **San Román J, Guillén García P:** Biomateriales poliméricos compuestos para aplicaciones quirúrgicas: Composites para cirugía ortopédica y remodelación ósea. *Rev Plást Mod* 438:674, 1992.
- 211.- **Tabas JA, Altherr MR, Mcpherson JD, Wozney JM, Kaplan FS, Zasloff M, Wasmuth JJ, Emanuel BS:** Chromosomal localization of human genes for BMP1, BMP2A and BMP3. *Genomics* 9:283, 1991.
- 212.- **Takagi K, Urist MR:** The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 196:100, 1982.
- 213.- **Takagi KM, Urist MR:** The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Orthop* 171:224, 1982.
- 214.- **Takaoka K, Ono K, Amitani K, Kishimoto R, Nakata Y:** Solubilization and concentration of a bone-inducing substance from a murine osteosarcoma. *Clin Orthop* 148:274, 1980.

- 215.- Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K: Purification on a bone-inducing substance (osteogenic factor) from a murine osteosarcoma. *Biomed Res* 2:466, 1981.
- 216.- Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K: Ectopic bone induction on and in porous hydroxiapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 234:250, 1988.
- 217.- Takaoka K, Yoshikawa H, Hashimoto J, Miyamoto S, Masuhara K, Nakahara H, Matsui N, Ono K: Purification and characterization of a bone-inducing protein from a murine osteosarcoma (Dunn type). *Clin Orthop* 292:329, 1993.
- 218.- Takaoka K, Yoshikawa H, Hashimoto J, Masuhara K, Miyamoto S, Suzuki S, Ono K, Matsui M, Oikawa S, Tsuruoka N, Tawaragi Y, Inuzuka C, Katayama T, Sugiyama M, Tsugimoto M, Nakanishi T, Nakazatio H: Gene cloning and expression of a bone morphogenetic protein derived from murine osteosarcoma. *Clin Orthop* 294:344, 1993.
- 219.- Termine J, Kleinmman H, Whitson W, Conn K, MCGarvey M, Martin G: Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26:99, 1981.
- 220.- Thompson J, Urist MR: Influence of cortisone and calcitonin on bone morphogenesis. *Clin Orthop* 71:253, 1970.
- 221.- Thompson AY, Piez KA, Seyedin SM: Chondrogenesis in agarose gel culture. *Experim Cell Res* 157:483, 1985.
- 222.- Tiedeman JJ, Huurman WW, Connolly JF, Strates BS: Healing of a large nonossifying fibroma after grafting with bone matrix and marrow. A case report. *Clin Orthop* 265:302, 1991.

- 223.- Tomford WW, Doppelt SH, Mankin HJ, Friedlaender GE: 1983 bone banks procedures. *Clin Orthop* 174:15, 1983.
- 224.- Triffitt JT: Initiation and enhancement of bone formation. A review. *Acta Orthop Scand* 58:673, 1987.
- 225.- Triffitt JT: The special proteins of bone tissue. *Clin Sci* 72:399, 1987.
- 226.- Uchida A, Nades S, McCartney E, Ching W: Bone ingrowth into three different ceramics implanted into tibia of rats and rabbits. *J Orthop Res* 3:65, 1985.
- 227.- Uchida A, Nade SML, McCartney ER, Ching W: The use of ceramics for bone replacement. A comparative study of three different porous ceramics. *J Bone Joint Surg* 66-B:269, 1984.
- 228.- Uretzky G, Appelbaum J, Sela J: Inhibition of the inductive activity of demineralized bone matrix by different percutaneous implants. *Biomaterials* 9:195, 1988.
- 229.- Urist MR, Mclean FC: Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J Bone Joint Surg* 34-A:443, 1952.
- 230.- Urist MR: Physiologic basis of bone graft surgery. *Clin Orthop* 1:207, 1953.
- 231.- Urist MR: Recent advances in physiology of calcification. *J Bone Joint Surg* 46-A:889, 1964.
- 232.- Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 150:893, 1965.
- 233.- Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM: The bone induction principle. *Clin Orthop* 53:243, 1967.

- 234.- Urist MR: Surface-decalcified allogenic bone (SDAB) implants. A preliminary report of 10 cases and 25 comparable operations with undecalcified lyophilized bone implants. *Clin Orthop* 56:37, 1968.
- 235.- Urist MR, Dowell TA, Hay PH, Strates BS: Inductive substrates for bone formation. *Clin Orthop* 59:59, 1968.
- 236.- Urist MR: Mesenchymal cell reactions to inductive substrates for new bone formation. En: *Repair & Regeneration*. Ed. JE Dunphy. McGraw Hill Inc. 1969.
- 237.- Urist MR, Hay PH, Dubuc F, Buring K: Osteogenetic competence. *Clin Orthop* 64:194, 1969.
- 238.- Urist MR: A morphogenetic matrix for differentiation of bone tissue. *Calc Tis Res* 4:98, 1970.
- 239.- Urist MR: The substratum for bone morphogenesis. *Develop Biol Supp* 4:125, 1970.
- 240.- Urist MR, Jurist JM, Dubuc FL, Strates BS: Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. *Clin Orthop* 68:279, 1970.
- 241.- Urist MR, Strates BS: Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Including observations on acetone-fixed intra and extracellular proteins. *Clin Orthop* 71:271, 1970.
- 242.- Urist MR: Bone histogenesis and morphogenesis in implants of demineralized enamel and dentin. *J Oral Surg* 29:88, 1971.
- 243.- Urist MR, Strates BS: Mechanisms of growth and development bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50:1392, 1971.

- 244.- Urist MR, Iwata H, Strates BS: Bone morphogenetic protein and proteinase in the guinea pig. *Clin Orthop* 85:275, 1972.
- 245.- Urist MR: Osteoinduction in undermineralized bone implants modified by chemical inhibitors of endogenous matrix enzymes. *Clin Orthop* 87:132, 1972.
- 246.- Urist MR, Mikulsi A, Boyd SD: A chemosterelized antigen-extracted bone morphogenetic alloimplant for bone banks. *Arch Surg* 110:416, 1975.
- 247.- Urist MR, Mikulski A, Contreas CN: Reversible extinction of the morphogen in bone matrix by reduction and oxidation of disulfide bonds. *Calcif Tissue Res* 19:731, 1975.
- 248.- Urist MR, Mikuski A, Nakagawa M, Yen K: A bone matrix calcification initiator noncollagenous protein. *Am J Physiol* 232:C115-C127, 1977.
- 249.- Urist MR, Terashima Y, Nakagawa M, Stamos, C: Cartilage tissue differentiation from mesenchymal cells derived from mature muscle in tissue culture. *In Vitro* 14:697-706, 1978.
- 250.- Urist MR, Mikulski AJ, Lietze A: Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 76:1828, 1979.
- 251.- Urist MR: Bone morphodifferentiation and tumorigenesis. *Perspect Biol Med* 22:S89, 1979.
- 252.- Urist MR, Grant TT, Lindhaolm TS, Mirra JM, Hirano H, Finerman GAM: Induction of new bone formation in the host bed by human bone-tumor transplants in athymic nude mice. *J Bone Joint Surg* 61-A:1297, 1979.

- 253.- Urist MR: New bone formation induced in post fetal life by bone morphogenetic protein. En: Becker RO (Eds): *Mechanisms of Growth Control*. Springfield, Charles C. Thomas, 1981.
- 254.- Urist MR, Conover MA, Lietze A, Triffitt JT, Delange R: Partial purification and characterization of bone morphogenetic protein. En: Cohn D, Talmage R and Matthews JL (Eds.): *Hormonal Control of Calcium Metabolism*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1981.
- 255.- Urist MR, Dawson E: Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed allogeneic (AAA) bone. *Clin Orthop* 154:97, 1981.
- 256.- 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 (hBMP). *Pro Soc Exp Biol Med* 173:194, 1983.
- 257.- Urist MR, DeLange R, Finerman GAM: Bone cell differentiation and growth factors: Induced activity of chondro-osteogenetic DNA. *Science* 220:680, 1983.
- 258.- Urist MR, Lietze A, Dawson E: Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 187:277, 1984.
- 259.- Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl Wm, Buyske J, Lietze A, Temps P, Hunkapiller M, DeLange RJ: Purification of bovine bone morphogenetic protein in hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 81:371, 1984.
- 260.- Urist MR, Hudack R, Huo YK, Rasmussen J, Hirota W, Lietze A: Bone morphogenetic protein (BMP) and anti-BMP immunoassay in patients with osteoporosis. En: Butler W.T., *Second Conference Bone Chemistry and Biology*. New York: Alan Liss, 1985.

- 261.- Urist MR, Nilsson OS, Hudak R, Huo YK, Rasmussen J, Hirota W, Lietze A: Immunologic evidence of a bone morphogenetic protein in the milieu intérieur. *Ann Biol Clin* 43:755, 1985.
- 262.- Urist MR, Kovacs S, Yates KA: Regeneration of an enchondroma defect under the influence of an implant of human bone morphogenetic protein. *J Hand Surg* 11-A:417, 1986.
- 263.- Urist MR, Huo YK, Chang JJ, Hudak RT, Rasmussen JK, Hirota W, Lietze A, Brownell AG, Finerman GAM, DeLange RJ: Hydroxyapatite affinity, electroelution and radioimmunoassay for identification of human and bovine bone morphogenetic proteins and polypeptides. *Development and Diseases of Cartilage and Bone Matrix* 149-176, 1987.
- 264.- Urist MR, Chang JJ, Lietze A, Huo YK, Brownell AG, DeLange RJ: Preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide fragments. En: *Methods in Enzymology*, D Barnes and DA Sirbaska (Eds.), New York, N.Y. Academy Press, Vol. 146, 1987.
- 265.- Urist MR, Nilsson O, Rasmussen J, Hirota W, Lovell T, Schmalzreid T, Finerman GAM: Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs. *Clin Orthop* 214:295, 1987.
- 266.- Urist MR, Chang JJ, Lietze A, Huo YK, Brownell AG, DeLange RJ: Methods of preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide fragments. *Methods Enzymol* 146:294, 1987.
- 267.- Urist MR: Bone morphogenetic protein induced bone formation in experimental animals and patients with large defects. En: Evered D. and Harnett S. (Eds.): *Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues*, Symposium n° 136, London: Ciba Foundation, 1988.
- 268.- Urist MR: Bone morphogenetic protein induced bone formation and the bone-bone marrow consortium. *Bone Transplantation* 19:186, 1989.

- 269.- Urist MR, Caplan AI: Bioactive factors in bone. *Connect Tissue Res* 23:103, 1989.
- 270.- Urist MR, Masiarz FR, Barr PJ, Kiefer M, Bathurst I, Finerman GAM: Recombinant bone morphogenetic protein by yeast expression system. *36th Annual Meeting of the ORS*, New Orleans, Louisiana, Feb. 5-8, 1990.
- 271.- Vaughan J: Osteogenesis and haematopoiesis. *Lancet* 18:133, 1981.
- 272.- Vaughan L, Mendler M, Humber S, Bruckner P, Winterhalter KH, Irwin MI, Mayne R: D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J Cell Biol* 106:991, 1988.
- 273.- Veis A: Bones and teeth. En: Piez KA, Reddi AH (Eds.). *Extracellular matrix biochemistry*. Paris. Elsevier, 1984.
- 274.- Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewich RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM: Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 85:9484, 1988.
- 275.- Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, Lapan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM: Recombinant human bone morphogenetic protein induce bone formation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 87:2220, 1990.
- 276.- Weinger JM, Holtrop ME: An ultrastructural study of bone cells. *Calc Tissue Res* 14:15, 1974.
277. Weinstock M, Leblond CP: Synthesis, migration and release of precursor collagen by odontoblasts as visualized by radioautography after H³ proline administration. *J Cell Biol* 60:92, 1974.

- 278.- Wittbjer J: bone matrix and bone formation. An experimental study of demineralized bone reimplanted in bone defects. Thesis. University of Lund, Malmoe, Sweden, 1983.
- 279.- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang E: Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242:1528, 1988.
- 280.- Xiaobo H, Lunlong Y, Chuanzin L, Shucheng W, Yankun C: Experimental and clinical investigation of human insoluble bone matrix gelatin. A report of 24 cases. *Clin Orthop* 293:360, 1993.
- 281.- Yamazaki Y: Experimental study on porous apatite as artificial bone-experiment on implantation in the mandible. *J Stomatol Soc* 51:372, 1984.
- 282.- Yamazaki Y, Oida S, Akimoto Y, Shioda S: Response of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of bone morphogenetic protein and plaster of Paris. *Clin Orthop* 234:240-249, 1988.
- 283.- Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg* 74-A:659, 1992.
- 284.- Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard A-M, Robey PG: Structure, expression and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop* 281:275, 1992.