

Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs): Efecto de la proteína osteogénica-1 (OP-1/BMP-7) en la condrogénesis y osteogenesis

J. L. PERIS, J. PRAT, R. DEJOZ, M. COMIN, C. ATIENZA, J. S. BARREDA, I. ROGER,
C. REIG y P. VERA

Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV). Valencia Parque Tecnológico. Paterna (Valencia).

Resumen.—En la actualidad, los estudios sobre biología molecular han facilitado el análisis de ciertos factores de transformación del crecimiento tipo β (TGF- β)I, entre los que destaca una familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Las técnicas de ingeniería genética han permitido replicar alguno de estos factores y localizar los genes que codifican dichas proteínas. La proteína osteogénica-1 (OP-1) ha sido caracterizada y sintetizada *in vitro* y muestra un elevado potencial osteogénico y condrogénico tanto *in vivo* como *in vitro*. Se presenta una revisión de los últimos avances en la aplicación experimental de las BMPs, y especialmente de la OP-1, en el área de la Cirugía Ortopédica y la Traumatología.

BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMPs): EFFECT OF THE OSTEOGENIC PROTEIN-1 (OP-1/BMP-7) ON CHONDROGENESIS AND OSTEOGENESIS

Summary.—Nowadays, molecular biology studies have promoted the bone morphogenetic proteins (BMPs) analysis. These multifunctional proteins are structurally related to transforming growth factor-6 (TGF-6). Genetic engineering techniques have allowed to sequence some of these BMPs. It has been characterized the expression and processing of osteogenic protein-1 (OP-1), a bone morphogenetic protein of the TGF-6 family. The OP-1 shows a high osteogenic and chondrogenic potential. The aim of this paper is to review some updated advances of the BMPs experimental applications, particularly OP-1, in relation to Orthopaedic Surgery and Traumatology.

INTRODUCCIÓN

El hueso, entendido como un órgano, constituye una combinación única de numerosos tipos celulares capaces de sintetizar una serie de componentes del tejido conectivo. Esta función es realizada principalmente por los osteoblastos que dan lugar a elementos estructurales de la matriz ósea extracelular, pero ciertas proteínas de síntesis local, tales como los factores de crecimiento, pueden ser secretadas por otras células presentes en la médula (fibroblastos, células hematopoyéticas, células endoteliales, etc.) o bien pueden ser depositadas por el pro-

pio sistema circulatorio. El resultado es un entramado que no solamente confiere una adecuada configuración mecánica que satisface las demandas esqueléticas, sino que también permite una continua remodelación ósea a lo largo de toda la vida (1) (Tabla I).

Tabla I: Componentes orgánicos matriciales sintetizados por células formadoras de hueso (1)

Componentes	Observaciones
Colágeno	Predominantemente colágeno tipo I y trazas de los tipos III, V, XI y XIII.
Proteoglicanos	Condroitín sulfato, biglicano, decorina, hialuronano.
Clicoproteínas	Normalmente sulfatadas y fosforiladas. Fibronectina, trombospondina, osteonectina, fosfatasa alcalina, osteopontina, sialoproteína ósea.
Otras proteínas	Proteína matricial, osteocalcina.

Correspondencia:

JOSE LUIS PERIS
Instituto de Biomecánica de Valencia (IBV)
Valencia Parque Tecnológico
Apdo. de Correos 199
46980 Paterna (Valencia)

Los 2 fenómenos mediante los cuales los injertos óseos facilitan la reparación de defectos esqueléticos se denominan osteoconducción y osteoinducción. La *osteoconducción* tiene lugar cuando el implante se comporta pasivamente actuando como una mera estructura sobre la que se deposita el hueso. La *osteoinducción* es un fenómeno dinámico que se caracteriza por la presencia de factores procedentes del injerto que estimulan activamente la función osteogénica (2).

La puesta a punto de procedimientos de disección química de los componentes matriciales mineralizados (3, 4) y de técnicas microanalíticas junto con la posibilidad de realizar cultivos celulares *in vitro*, han permitido describir bioquímicamente a un elevado número de sustancias endógenas y exógenas a la matriz. La matriz orgánica está formada por un 90% de colágeno y un 10% de diversas sustancias, teniendo en cuenta que el porcentaje de cada componente molecular varía dependiendo de la especie animal, nivel de desarrollo y localización esquelética. En la actualidad se desconoce tanto la composición del complejo supermolecular que inicia la deposición mineral (*unidad de matriz ósea*) (1) como el mecanismo mediante el cual las células óseas regulan este proceso. El hecho de que el colágeno tipo-I, elemento estructural mayoritario de la fase orgánica, esté presente en otros tejidos conectivos, pone de manifiesto la gran importancia que los componentes no colágenos pudieran tener en la fisiología ósea.

El proceso de reparación de fracturas ha sido descrito detalladamente a nivel celular, pero se desconocen importantes aspectos de la dinámica molecular. La necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos básicos que tienen lugar durante la consolidación ósea se ha incrementado durante los últimos años al desarrollarse ciertas innovaciones terapéuticas, como la producción de factores de crecimiento y otras proteínas que regulan los mecanismos metabólicos de división y de diferenciación celular durante la reparación de fracturas y que son sintetizados a partir de ADN recombinante (5). El proceso de reparación de fracturas presenta unas características relevantes: a) los mecanismos de unión difieren entre sí, dependiendo de las condiciones mecánicas a las que es sometido el hueso; b) la consolidación sigue una serie de fases específica para cada uno de los mecanismos, y c) el resultado mecánico de los diferentes mecanismos es muy similar, dando lugar a una total recuperación estructural y funcional (6).

La técnica de ADN recombinante (7-9) ha permitido sintetizar factores de crecimiento que potencialmente podrían estimular la osteogénesis; sin embargo, resulta evidente que este sencillo planteamiento no siempre conduce a una respuesta coherente, ya que un factor de crecimiento que pudiera activar la osteogénesis y condrogénesis en huesos intactos (7, 9) y en casos de graves defectos en huesos largos (8), no tendría necesariamente que estimular la unión de un hueso fracturado (5). Indudablemente es necesario que, en primer lugar, se defina, mediante modernas técnicas de biología molecular, la secuencia de fases que se suceden en procesos de reparación tanto normales como en los casos de pseudoartrosis. A partir de ese conocimiento previo, sería posible analizar y corregir la patología molecular de aquellas fracturas que cursan con problemas de retraso en la consolidación.

La aplicación de la biología molecular podría contestar a una serie de cuestiones básicas, tales como ¿cuáles son los mecanismos de control que coordinan el reclutamiento, localización y función de las distintas poblaciones celulares presentes en el foco de fractura?; ¿cuáles son los mediadores celulares frente a diferentes condiciones de carga?; ¿qué función tienen las señales o indicadores celulares y matriciales en el proceso de mineralización? (5). En la actualidad los esfuerzos se centran en el análisis y síntesis de la superfamilia de factores de transformación del crecimiento tipo Beta (TGF-Beta), entre los que destaca una familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

FACTORES DE TRANSFORMACIÓN DEL CRECIMIENTO TIPO 6

Entre los componentes no estructurales de la matriz ósea, tanto de transformación endógena como exógena (Tabla II), cabe destacar los factores de transformación del crecimiento tipo Beta (TGF-Beta) que constituyen una superfamilia en la que se incluyen las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Los TGF-Beta se sintetizan localmente y son adsorbidos por las células presentes en la matriz, estimulan la proliferación de células osteoprogenitoras, incrementan el porcentaje de colágeno en dicha población (9) e influyen en la maduración celular al elevar los niveles de fosfatasa alcalina que constituye un indicador de la actividad celular. La expresión de los TGF-Beta suele ser posterior a la fase endocondral y se produce simultáneamente a la liberación de colágeno tipo I (10, 11).

Tabla II: Componentes no estructurales matriciales de síntesis local por células osteoblásticas o absorbidos de fuentes exógenas

De síntesis endógena

- Enzimas e inhibidores: fosfatasa alcalina, colagenasas, activador plasminogénico...
- Factores de crecimiento paracrinos y autocrinos: FGF, IGF, TGF-6...
- Proteolípidos.
- Proteínas morfogenéticas óseas.

Absorbidos de fuentes exógenas

- Factores de crecimiento: FGF, IGF, I(,I-iv PDGF...
- Proteínas séricas: albúmina, inmunoglobulinas, transferrina, hemoglobina...

Los pioneros en el campo de los factores osteoinductivos han sido los grupos de investigación liderados por Urist (12) y Reddi (13) que han puesto de manifiesto el hecho de que el tejido óseo constituye una fuente de factores de crecimiento osteoinductivos que muestran efectos sobre la regulación fenotípica y sobre la producción de matriz ósea por parte de fibroblastos, condrocitos y osteoblastos. Recientemente se han identificado diversos productos génicos mediante la clonación de ADN (17-19). Se ha reconocido que los TGF- β son los reguladores clave del desarrollo, inducción y reparación ósea. Inicialmente se aislaron 2 factores inductores de cartílago (CIF-A y CIF-B) que son idénticos a los TGF-IA1 y TGF-fi2 (17-22). Estos factores inducen la condrogénesis y la producción de colágeno tipo II en cultivos de células mesenquimáticas embrionarias musculares. Los efectos de ambos tipos de TGF- β sobre condrocitos maduros parecen ser opuestos a los observados en un principio, ya que se pierde el fenotipo condrocítico y se reduce drásticamente la producción de colágeno tipo II (14). Las experiencias *in vitro* muestran efectos similares, aunque en ciertas células diana las funciones podrían diferir (15). Entre los polipéptidos biológicamente activos incluidos en la superfamilia de TGF- β se encuentran 6 proteínas morfogenéticas (BMP-2 hasta BMP-7) (18, 24-26). Estas BMP inducen la condrogénesis y osteogénesis extraesqueléticamente en un transportador matricial (16), lo que indica la importante función que desempeñan los TGF- β en la regulación del proceso de reparación de fracturas.

Si bien el aislamiento de los TGF- β ha supuesto un gran avance en el estudio de la biología ósea, se ha demostrado que no actúan como inductores óseos, sino que constituyen un mero factor que estimula en gran medida la condrogénesis (17). Los

TGF- β son los principales inductores de producción de colágeno que se conocen tanto en cultivos celulares de fibroblastos como *in vivo* (24), de hecho aumentan la producción de componentes óseos y cartilagosos, tales como colágeno tipos I, II, III, V, VI y X, fibronectina, osteopontina, osteonectina, trombospondina, proteoglicanos y fosfatasa alcalina (24). Los TGF- β también inhiben la proteólisis pericelular: a) reduciendo la producción de metaloproteinasas capaces de digerir macromoléculas extracelulares y b) aumentando la producción de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (24). Además, los TGF- β inhiben la activación de los osteoclastos y la formación de nuevos osteoclastos (18), por lo que el efecto global de las TGF-6 es la acumulación de matriz extracelular y la síntesis de diversos receptores de adhesión celular o integrinas (24). Se desconoce los efectos particulares de cada uno de los miembros de esta superfamilia de factores de crecimiento sobre los tipos celulares presentes en el callo de fractura y en el tejido óseo.

La concentración de TGF- β en el tejido óseo (~ 200 ng/kg. de tejido) es 100 veces superior a la observada en otros tejidos. La expresión de los TGF- β 1 se localiza en los osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, condrocitos y en algunas células matriciales (30-35). En general, estos factores son potentes inhibidores del crecimiento de muchas células; sin embargo, pueden estimular indirectamente la proliferación de fibroblastos y osteoblastos (24).

Los TGF- β se almacenan en forma de complejos inactivos de elevado peso molecular que se disgregan antes de su activación (19, 24). Existen numerosos tipos celulares que presentan receptores a estos factores, por lo que la activación de una forma latente de TGF- β puede ser un elemento muy importante en la regulación de su función. En estudios *in vitro* la activación de un TGF- β se relaciona con la adición de enzimas exógenas y de modificaciones extremas de pH (20). El significado biológico de la forma de almacenamiento de los IGF-6 en el hueso sigue siendo desconocido, pero podría estar relacionado con el equilibrio dinámico de remodelación (Fig. 1). La acción de los osteoclastos degrada la matriz ósea mediante hidrólisis ácida activando la forma latente de los TGF- β , que a su vez activan a los osteoblastos para producir nueva matriz (33). Durante la consolidación de fracturas la matriz libera TGF- β para estimular las diversas fases del desarrollo del callo (21). La elevada producción de TGF β incrementa la síntesis de colágeno tipo I y de osteonectina (22). También se ha observa-

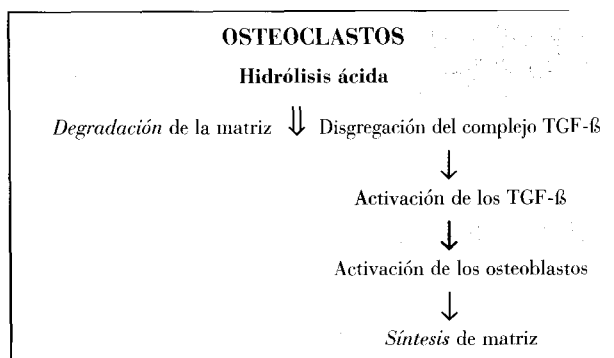


Figura 1. Efecto de los procesos de hidrólisis ácida sobre la remodelación ósea.

do un elevado nivel de TGF-β durante la osificación endocondral de implantes óseos desmineralizados (13). Los niveles de TGF-β están modulados por diferentes hormonas sistémicas, lo que sugiere una clara función global de estos factores en la regulación del metabolismo óseo (23, 36), ya que los factores que estimulan la resorción pueden facilitar la formación mediante la liberación de TGF-β y así acoplar la formación y resorción óseas.

Existen numerosos aspectos que requieren un estudio más detallado, ya que la mayor parte de los miembros de la familia genética de los TGF-β se expresan en zonas diversas, mientras que los tejidos óseos y cartilagosos se localizan en lugares específicos. Los efectos de estos factores sobre los condrocitos son un tanto confusos y se necesita una mayor experimentación que aclare su función sobre el tejido cartilaginoso. Este aspecto es de especial relevancia en aquellos estudios *in vivo* en los que se determine la influencia de factores concretos en la regulación genética y fenotípica de los componentes matriciales durante el proceso de reparación de fracturas.

PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS (BMPs)

Este grupo de proteínas que pertenecen a la familia de los TGF-β está directamente relacionado con los fenómenos de condrogénesis y osteogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. En la actualidad son numerosos los inconvenientes que se han tenido que resolver y entre ellos destacan los relacionados con las fuentes de síntesis (osteosarcomas, matriz ósea desmineralizada, hueso bovino, ADN recombinante) y con los necesarios transportadores (colágeno puro, proteínas no colágenas, polímeros biodegradables, cerámica ósea).

Fuentes de síntesis

Antes del desarrollo de técnicas de ingeniería genética, la purificación de estas BMPs se realizaba a partir de diversas fuentes: osteosarcoma humano, osteosarcoma de Dunn (múridos), matriz ósea desmineralizada y hueso bovino (41-45). En los últimos años los avances en el campo de la biología molecular han permitido obtener estas proteínas a partir de técnicas de ADN recombinante.

La inducción de la osteogénesis mediante la implantación de tejido procedente de *osteosarcomas* y sus extractos ha sido puesta de manifiesto en numerosas experiencias (46-64), en otros casos se ha observado este potencial osteoinductivo en condrosarcomas (24), osteoclastomas (49) y en sarcomas de Ewing (25). Los resultados de estos estudios sugieren que este tejido podría contener una o más proteínas morfogenéticas idénticas, o al menos similares, a las presentes en la matriz ósea y la dentina.

Las células del osteosarcoma de Dunn con trazas fenotípicas de osteoblastos producen factores similares a las BMPs con capacidad osteoinductora (26, 27, 47, 53). Takaoka et al. (28) purificaron por primera vez la BMP-4 (BMP-2B) partiendo de células del osteosarcoma de Dunn, examinando su secuencia polipeptídica y estudiando alguna de sus características bioquímicas.

En 1965, Urist (29) demostró cómo la implantación de *matriz ósea desmineralizada* (DBM) inducía la formación ósea endocondral mediante la diferenciación de células mesenquimáticas en condrocitos y osteocitos. A partir de este primer trabajo se han realizado numerosas investigaciones con el fin de determinar el proceso de diferenciación inducido por la DBM (42). En este proceso se observan 2 picos de acumulación de ácido hialurónico, el primero de ellos asociado a la migración de las células mesenquimáticas y el segundo relacionado con la agregación de condroblastos (30).

El material osteogénico obtenido a partir de *ADN recombinante* presenta 2 importantes ventajas (31): a) la proteína que se obtiene es mucho más pura que los extractos, ya que éstos suelen presentar una mezcla indeterminada de BMPs; b) la tecnología recombinante permite obtener un volumen suficiente de material osteoinductivo capaz de reparar defectos óseos de grandes dimensiones. Se han identificado 7 BMPs distintas en humanos a partir de la expresión de proteínas recombinantes

después de una secuenciación de fragmentos peptídicos procedentes de la matriz ósea (19, 25-27, 32), alguna de las cuales presentan un peso molecular similar a las descritas previamente por el grupo de investigadores dirigido por Urist (74-76).

Partiendo de la información contenida en secuencias parciales de una proteína con capacidad osteoinductora purificada a partir del osteosarcoma de Dunn, se mapeó la librería genética del sarcoma para clonar un gen complementario de la proteína. Se amplificó el ADN clonado y se insertó en células del ovario de hámster chino (CHO) para su posterior expresión (33). La secuencia de nucleótidos que se obtuvo es homóloga a la BMP-4 humana (25) y a la de los fetos de rata.

Transportadores

Uno de los problemas que presenta la utilización experimental y clínica de las BMPs es la necesidad de disponer de un transportador adecuado para las proteínas. Mientras Urist et al. (42, 45, 74, 75, 78, 79) asocian las BMPs a proteínas no colágenas (NCP), Takoaka et al. (69, 77) han empleado como transportador el *colágeno puro*, que presenta una clara ventaja frente a los tradicionales transportadores de matriz ósea descalcificada que contienen numerosas sustancias no identificadas (19, 27, 41, 80, 81). Miyamoto et al. (82) han utilizado como transportador de las BMPs obtenidas a partir de osteosarcoma de rata un polímero biodegradable de *ácido poliláctico-polietilén glicol* (PLA-PEG) (Fig. 2). Previamente, Miyamoto et al. (83) determinaron que un homopolímero de ácido poliláctico (PLA) no constituía un adecuado transportador, ya que producía reacciones frente a cuerpo extraño e inflamación crónica y su absorción y sustitución por hueso nuevo era demasiado lenta.

Katoh et al. (43) utilizan como transportador *hueso sinterizado* o cerámica ósea (84) que actúa como un material poroso con una estructura similar al hueso trabecular y a la hidroxiapatita comercial, pero con importantes diferencias relativas al contenido en magnesio, sílice y nitrógeno. El

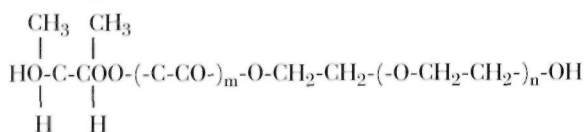


Figura 2. Fórmula estructural del copolímero de ácido poliláctico-polietilén glicol (PLA-PEG) (83).

trabajo de García de Lucas et al. (113) pone de manifiesto que la BMP bovina combinada con *hidroxiapatita* en ratas presentan una respuesta osteoinductiva en el tratamiento de defectos diafisarios.

Efectos

Los efectos de las BMPs han sido estudiados de manera aislada y todavía no existe un cuerpo de conocimiento que permita establecer un criterio de acción global, aunque se está llevando a cabo un importante esfuerzo en este campo. Los efectos se pueden agrupar atendiendo a los resultados obtenidos en 4 tipos de estudios: a) osteogénesis *in vivo*; b) condrogénesis *in vitro*; c) genéticos (85), y d) odontológicos (44).

Los estudios sobre la *condrogénesis in vitro* han puesto de manifiesto que los extractos en bruto de BMPs y de factores osteogénicos dan lugar a resultados contradictorios, ya que sus componentes podrían tener efectos cruzados, aunque queda patente que son los encargados de regular la síntesis de glicosaminoglicanos necesarios en la condrogénesis. Sin embargo, su presencia no es suficiente para llevar a cabo la formación de la matriz hialina normal con abundantes proteoglicanos a pesar de la presencia de ácido hialurónico. En cambio, las BMPs aisladas por el Laboratorio de Investigación Osea de la Universidad de UCLA son capaces de promover la síntesis suficiente de proteoglicanos, provocando la producción limitada de matriz hialina y transformando el tejido muscular en cartílago. El extracto de factor osteogénico (TGF- β 1 y TGF- β 2) del grupo Industrial Celtrix Pharmaceuticals estimula la producción de pequeñas cantidades de proteoglicanos que no son suficientes para la formación de matriz cartilaginosa. Estos resultados indican que no existe un único iniciador de la condrogénesis y es posible que diversas proteínas de la familia de BMPs regulen una o más rutas de expresión del fenotipo condrogénico (28). Otras experiencias han demostrado que las BMPs inducen la diferenciación de células mesenquimáticas en condrocitos *in vitro* (86) y que la condrogénesis es inducida *in vitro* por BMPs de origen matricial (42, 86-88) y por BMPs procedentes de osteosarcoma humano (78).

En los estudios sobre la *osteogénesis in vivo* destaca el trabajo realizado por Lindholm et al. (45) en el que se pone de manifiesto que las BMPs asociadas a un transportador de proteínas no coláge-

nas son implantadas en defectos del hueso nasal y del hueso frontal de minicerdos. Estos defectos son de tamaño superior al tamaño crítico de reparación en huesos craneales y su reparación es más rápida en el hueso frontal que en el nasal, pero en los 2 casos la reparación es incompleta, ya que los implantes se resorben antes de que responda la población celular y ello puede ser debido a que es necesario un buen contacto con la duramadre que proporcione las necesarias células mesenquimáticas. Entre otros estudios sobre la osteogenesis *in vivo* cabe destacar los relacionados con la inducción de la formación de hueso *in vivo* (15, 41, 51), el tratamiento de pseudoartrosis y defectos óseos (89-91) y la inducción de la formación ósea heterotópica y ortotópica no tumoral mediante la diferenciación perivascular de las células mesenquimáticas a células osteoprogenitoras (78).

La familia de proteínas morfogenéticas óseas está formada por:

— *BMP-2*. Se ha empleado en tratar grandes defectos diafisarios de fémur en corderos (72). Anteriormente se observó que la BMP-2 recombinante inducía la formación ósea en localizaciones subcutáneas en ratas (27).

— *BMP-3*. El gen se ha mapeado en el cromosoma 4 y se solapa con el gen que codifica la información de la dentinogenesis imperfecta tipo II que se caracteriza por la formación anormal de dentina (92).

La osteogenina es idéntica a la BMP-3 (81).

— *BMP-4* (BMP-2B). Takaoka et al. (69) purificaron la BMP-4 partiendo de un osteosarcoma murino de Dunn, empleando como transportador el colágeno.

Tabas et al. (92) han establecido la asignación cromosómica del gen que codifica la BMP-4, localizándolo en el cromosoma 14, el mismo en el que se localiza la información genética que da lugar al síndrome Holt-Oram que cursa con osteocondromatosis (93).

— *BMP-5*. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 6 (94) y se conoce únicamente a nivel de secuenciación de ADN.

— *BMP-6*. El gen que lo codifica se localiza en el cromosoma 6 (94).

— *BMP-7*. Es idéntica a la proteína osteogénica-1 (OP-1) (26).

PROTEINA OSTEOGENICA-1 (OP-1)

La proteína osteogénica-1 (OP-1), también conocida como proteína morfogenética-7 (BMP-7), pertenece a la superfamilia de los TGF- β , y actúa, al igual que las proteínas de la subfamilia de BMPs, como un regulador del desarrollo animal estimulando en particular la diferenciación de células mesenquimáticas en células condrogénicas y osteoprogenitoras.

Inicialmente se purificó a partir de hueso bovino y las técnicas de caracterización bioquímica han permitido distinguir 2 subunidades, una de ellas con un peso molecular de 18 kDa que es equivalente a la proteína codificada por el gen de la OP-1 y la otra de 16 kDa similar a la proteína codificada por el gen de la BMP-2A (95). Griffith et al. (96) han obtenido los primeros datos cristalográficos y de difracción de rayos X de la OP-1 y de 2 derivados de elevado peso molecular.

Gracias a sofisticadas técnicas de secuenciación de ADN se ha aislado el gen que codifica la OP-1 y el análisis secuencial indica que este gen está relacionado con el de la proteína vegetal en *Xenopus* (Vg-1); se ha descrito la estructura del ADN complementario clonado y la secuencia nucleotídica que lo caracteriza (26). En muridos se ha conseguido aislar el gen de la OP-1 que codifica una OP-1 homóloga en humanos y los resultados sugieren que los riñones podrían ser la zona principal de síntesis de esta proteína a pesar de encontrarse alejada de su punto de acción (97). El gen que la codifica en el genoma humano se localiza en el cromosoma 20 (94).

En *Xenopus* la distribución del ARN_m de la OP-1 se limita al ovario y a los embriones, mientras que los ARN_m de las BMP-2 y 4 se distribuyen en tejidos adultos, detectándose en pulmón, corazón y riñón (98). En embriones de pollo se ha observado que la expresión de la OP-1 en la fisis se limita a la zona hipertrófica, sin que aparezca en la zona de reserva ni en la proliferativa (99).

El hecho de que la proteína sea capaz de activar selectivamente genes de las células mesenquimáticas pluripotentes regulando su diferenciación posterior, evidencia que es necesario analizar aquellos receptores celulares que se unen a esta proteína y que permiten el inicio de la fase de activación. Las proteínas de la familia de TGF- β manifiestan sus efectos cuando se unen a receptores tipos I y II de la kinasa de serina/treonina. La OP-1 se une a receptores tipo 1 de la activina (ActR-I) y a recepto-

res tipo IA (BMPR-IA) e IB (BMPR-IB) de las BMP en presencia de receptores tipo II (ActR-IIA) y IIB (ActB-TIB) de la activina. Ciertos efectos de la activina, tales como la inducción a la secreción de la hormona estimulante de los folículos, no se manifiestan en presencia de la OP-1 (100). Se ha identificado un receptor tipo II (BMPR-II) que se une a las BMP-2 y BMP-7 junto con otros receptores tipo I, siendo necesaria la cooperación de estos 2 receptores para conseguir una adecuada unión y transducción de la señal (101). Los receptores de la activina similares a los de la kinasa-f (ALK-3 y ALK-6) son receptores tipo I de la OP-1 y de la BMP-4 y sus transcripciones se han detectado en condensaciones precartilaginosas, masas premusculares, vasos sanguíneos, sistema nervioso central, ojos y orejas en desarrollo (102, 103). Sin embargo, la ALK-2 es un receptor tipo I de la activina y de la OP-1, pero no de la BMP-4 (102).

La proteína osteogénica-1 muestra *efectos específicos* en diversos campos de aplicación, tales como la diferenciación condroblástica y osteoblástica, procesos oncológicos, desarrollo del sistema nervioso central, odontología y embriogénesis (104) e interviene en la síntesis de otras proteínas como la osteopontina (OPM) que constituye una de las proteínas de la matriz ósea. La expresión del ARN_m de la osteopontina está regulada por 3 tipos de factores: a) factores de crecimiento y de diferenciación (factores de crecimiento plaquetario —PDGF—, EGF, TGF- β y OP-1; b) tensiones mecánicas que favorecen la formación ósea, y c) hormonas osteotrópicas, como el ácido retinoico y la vitamina D₃ que facilitan la resorción y remodelación ósea. Las células preosteoblásticas sintetizan una OPM de 55 kDa que se correlaciona con la formación de una matriz «cementante» previa a la deposición ósea, mientras que los osteoblastos sintetizan una OPM de 44 kDa que se asocia rápidamente con la hidroxapatita regulando el crecimiento del cristal y proporcionando un sustrato para la adhesión de los osteoclastos (105).

La OP-1 participa en la regulación de la molécula de adhesión de las células neurales cuya función es de especial importancia en el desarrollo y regeneración del *sistema nervioso central* (106, 107) y además presenta un efecto de protección neurológica en casos de hipoxias e isquemias cerebrales en ratas (108).

En el campo de la *odontología* se ha observado que induce la formación de dentina en monos y en perros (109, 110) al inducir la formación de hueso

nuevo en los anclajes dentales a las 3 semanas, tanto en presencia como en ausencia de implantes de titanio, siendo esta la primera demostración de una inducción terapéutica de formación ósea en aposición inmediata a implantes metálicos. Además, realiza una importante función en los procesos de regeneración periodontal (111).

La *oncología* podría beneficiarse del estudio de la OP-1, ya que las células pluripotentes del carcinoma embrionario humano se diferencian como respuesta a esta proteína, pudiendo modular la diferenciación inducida por el ácido retinoico. Al igual que otros miembros de la superfamilia de TGF- β , la OP-1 muestra una función inductiva en las primeras etapas embrionarias y posiblemente podría tener un valor terapéutico en el tratamiento de algunos tumores germinales (112).

Si bien la funcionalidad de la proteína osteogénica-1 abarca un amplio rango de aplicaciones, es en el área de la *Cirugía Ortopédica y de la Traumatología* donde se están obteniendo los primeros resultados relevantes. La revisión bibliográfica realizada indica que son numerosos los efectos que la OP-1 ofrece en este campo y entre los que cabe destacar los que se citan a continuación.

Los TGF- β -1 y el ácido retinoico no inician ni impulsan la diferenciación condrocítica; sin embargo, la OP-1 estimula el crecimiento y la maduración de los condrocitos sin llegar a la fase hipertrófica en cultivos celulares y sin requerir la adición de hormona tiroidea ni de insulina, agentes que facilitan la diferenciación condrocítica *in vitro* (114, 115).

Inhibe la proliferación celular y estimula la expresión de marcadores característicos del fenotipo de osteoblastos en las células del osteosarcoma de rata (116), induciendo la osificación endocondral *in vivo* y estimulando el crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos en cultivos celulares (116, 117).

En cultivos celulares, la OP-1 y los TGF- β favorecen la proliferación celular y la síntesis de colágeno, pero sólo la OP-1 es efectiva en la estimulación de los marcadores del fenotipo osteoblástico (117).

Estimula la formación de células multinucleadas en cultivos celulares de médula ósea de rata, aumentando la capacidad de la vitamina D₃ para inducir la formación de células osteoclasticas y la resorción ósea. Estos estudios demuestran que la OP-1 junto con la vitamina D₃ podrían tener una importante función en la remodelación ósea no

sólo incrementando la tasa de crecimiento osteoblástico y su diferenciación, sino también en el reclutamiento de los osteoclastos (118).

Regula los componentes del sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) y se sugiere que su efecto mitogénico/diferenciador sobre las células óseas podría estar mediado parcialmente mediante: a) el aumento de secreción de estos factores de crecimiento y b) la regulación del equilibrio estimulador-equilibrador de las proteínas de unión de los IGF tanto a nivel de ARN_m como a nivel de degradación, pero sin intervenir en la regulación del receptor del IGF (119).

Estimula la proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos *in vitro* (120). Induce la diferenciación condroblástica y osteoblástica de células osteoprogenitoras procedentes de los huesos craneales de rata recién nacida (121) y sus efectos pueden estar mediados en parte por receptores específicos de BMPs (122).

Induce la formación de hueso nuevo cuando se implanta con un adecuado transportador en zonas subcutáneas en ratas y puede consolidar totalmente grandes defectos diafisarios en animales de experimentación. Al igual que los TGF- β -1 es un potente agente químico de atracción de neutrófilos, monocitos y fibroblastos, pero no estimula la mitogénesis fibroblástica, la síntesis de matriz (colágeno y ácido hialurónico) ni la producción de un inhibidor tisular como la metaloproteinasa; es decir, comparte las propiedades quimotácticas de los TGF- β pero no sus propiedades fibrogénicas (123).

Induce la formación de hueso nuevo *in vivo*, estimula la inducción de la fosfatasa alcalina, la producción de AMPC intracelular mediado por la PTH y la síntesis de osteocalcina, consiguiendo, a largo plazo, que los osteoblastos aumentan su tasa de mineralización (117).

Aunque parece probada su capacidad osteogénica en los procesos de consolidación de fractu-

ras (111), es necesaria la realización de estudios en los que se cuide de manera especial el diseño experimental con el fin de obtener resultados más precisos.

Existen estudios en los que se analiza el efecto que la OP-1 recombinante humana presenta sobre el tejido cartilaginoso y la formación ósea en cultivos de huesos metatarsianos de embriones de ratón, comparando dichos efectos con los presentados por los TGF- β -1 humano y TGF- β -1 y 2 porcino. En estos trabajos se observa que la OP-1 estimula el crecimiento cartilaginoso; este efecto es parcialmente debido a la diferenciación de células pericondrales en condrocitos, dando lugar a un incremento en el crecimiento por aposición. Por el contrario, los TGF- β -1 y 2 inhiben el crecimiento del cartílago. En los centros de osificación, la OP-1 y los TGF- β inhiben la hipertrofia cartilaginosa, el crecimiento del collar óseo y la mineralización de la matriz, poniendo de manifiesto que ambos tipos de factores presentan efectos opuestos sobre el crecimiento cartilaginoso, pero mostrando efectos similares en los procesos osteogénicos y actuando como reguladores autocrinos y paracrinos del desarrollo óseo embrionario (124).

Los estudios con la OP-1 se encuentran todavía en una etapa preclínica, por lo que existen numerosos aspectos por definir cómo es el caso de la dosificación, aunque algunos autores han observado que la proliferación celular y la síntesis de colágeno son dosisdependientes, triplicando el nivel de respuesta con una dosis de 40 ng/ml. (117).

En líneas generales, los resultados iniciales con la OP-1 parecen ser altamente satisfactorios e indican que su potencialidad en el ámbito clínico es patente, pero para ello será necesario realizar numerosas experiencias previas que permitan acotar su campo de aplicación y dar a conocer nuevas vías de síntesis, diversos transportadores, zonas de inserción y otros muchos aspectos todavía no dilucidados.

Bibliografía

1. Robey PG, Bianco P, Termine JD. The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation. En Coe FL, Fa vus MJ, eds. Disorders of bone and mineral metabolism. Nueva York. Raven Press, 1992; 241-63.
2. Friedlaender GE. Current concepts review. Bone grafts. The basis science rationale for clinical applications. J Bone Joint Surg 1987; 69A: 786-90.
3. Termine JD, Belcourt AB, Christner PJ, Conn KM, Nysten MI. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. J Biol Chem 1980; 255: 9760-72.
4. Termine JD, Belcourt AB, Conn KM Kleinman HK. Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. J Biol Chem 1981; 256: 10403-8.

5. Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 1993; 289: 292-312.
6. Aro HT, Chao EYS. Bone-healing patterns affected by loading, fracture fragment stability, fracture type, and fracture site compression. *Clin Orthop* 1993; 293: 8-17.
7. Aspenberg P, Albrektsson T, Thorngren KG. Local application of growth-factor IGF-I to healing bone. Experiments with a titanium chamber in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1989; 60: 607-10.
8. Jingushi S, Bolander ME. Modulation of rat femoral fracture healing by *in vivo* injections of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- β . ORS 37th Annual Meeting, 1991; 4-7. Anaheim, California.
9. Jingushi S, Heydemann A, Kana SK, Macey LR, Bolander ME. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *J Orthop Res* 1990; 8: 364-71.
10. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor- β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 1990; 110: 2195-207.
11. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wang EA, Wozney JM et al. Recombinant BMP-2a bone induction in a rat orthotopic model. ORS 37th Annual Meeting, 1991; 4-7. Anaheim, California.
12. Centrella M, Massague J, Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor- β stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvaria. *Endocrinology* 1986; 119: 2306-12.
13. Carrington JL, Roberts AB, Flanders KC, Roche NS, Reddi AH. Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor- β during endochondral bone development. *J Cell Biol* 1988; 107: 1969-75.
14. Bortell R, Barone LM, Tassinary MS, Lian KB, Stein GS. Gene expression during endochondral bone development: Evidence for coordinate expression of transforming growth factor- β and collagen type I. *J Cell Biochem* 1990; 44: 81-91.
15. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 1983; 220: 680-6.
16. Sampath TH, Muthukumaran N, Reddi AH. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7109-13.
17. Seyedin SM, Thompson AY, Bentz H, Rosen DM, McPherson JM, Conti A et al. Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1986; 261: 5693-5.
18. Seyedin SM, Segarini PR, Rosen DM, Thompson AY, Bentz H, Graycar J. Cartilage-inducing factor-fi is a unique protein structurally and functionally related to transforming growth factor-fi. *J Biol Chem* 1987; 262: 1946-9.
19. Wozney JM, Rosen Y, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528-34.
20. Seyedin SM, Thomas TC, Thompson AY, Rosen DM, Piez KA. Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 2267-71.
21. Ogawa Y, Seyedin SM. Purification of transforming growth factor β 1 and β 2 from bovine bone and cell culture assays. *Methods Enzymol* 1991; 198: 317-27.
22. Miura Y, Fitzsimmons JS, Commisso CN, Gallay SH, O'Driscoll SW. Enhancement of periosteal chondrogenesis *in vitro*. *Clin Orthop* 1994; 301: 271-80.
23. Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY, Seyedin SM. Transforming growth factor- β modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes *in vitro*. *J Cell Physiol* 1988; 134: 337-46.
24. Massagué J. The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
25. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen Y, Wang EA et al. Identification of transforming growth factor fi family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9843-7.
26. Özkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *EMBO J* 1990; 9: 2085-93.
27. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2220-4.
28. Nathanson MA. *In vitro* proteoglycan synthesis in response to extracts of demineralized bone. *Clin Orthop* 1994; 299: 263-81.
29. Pfeilschifter J, Seyedin SM, Mundy GR. Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. *J Clin Invest* 1988; 82: 680-5.
30. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor fi is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J Biol Chem* 1987; 262: 2869-74.
31. Ellingsworth LR, Brennan JE, Fok K, Rosen DM, Bentz H, Piez KA et al. Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor-A and transforming growth factor fi. *J Biol Chem* 1986; 261: 12362-7.
32. Heine UI, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HYP, Thompson NL et al. Role of transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 1987; 105: 2861-76.
33. Robey PG, Young MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddy AH et al. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor type fi (TGF- β) *in vitro*. *J Cell Biol* 1987; 105: 457-63.
34. Sandberg M, Autio-Harminen H, Vuorio E. Localization of the expression of types I, III, and IV collagen. TCF-B1 an c-fos genes in developing human clavicular bones. *Dev Biol* 1988; 130: 324-34.
35. Sandberg M, Vuorio T, Hirvonen H, Alkalo K, Vuorio E. Enhanced expression of TGF- β and c-fos mRNAs in the growth plates of developing human long bones. *Development* 1988; 102: 461-70.
36. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Skeletal tissue and transforming growth factor B. *FASEB J* 1988; 2: 3066-73.
37. Lyons RM, Keski-Oja J, Moses II. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblasts-conditioned medium. *J Cell Biol* 1988; 106: 1659-65.
38. Joyce ME, Kingushi S, Bolander ME. Transforming growth factor- β in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 1990; 21: 199-209.
39. Sandberg M, Tasken K, Oyen O, Hansson V, Jahnsen T. Molecular cloning cDNA and deduced amino acid sequence for a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from human testis. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149: 939-45.
40. Pfeilschifter J, Mundy GR. Modulation of type 6 transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2024-8.

41. Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9484-8.
42. Katoh R, Urist MR. Surface adhesion and attachment factors in bone morphogenetic protein-induced chondrogenesis *in vitro*. *Clin Orthop* 1993; 295: 295-304.
43. Katoh T, Sato K, Kawamura M, Iwata H, Miura T. Osteogenesis in sintered bone combined with bovine bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1993; 287: 266-75.
44. Lianjia Y, Yuhao G, White FH. Bovine bone morphogenetic protein-induced dentinogenesis. *Clin Orthop* 1993; 295: 305-12.
45. Lindholm TC, Lindholm TS, Marttinen A, Urist MR. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP/NCP)-induced repair of skull trephine defects in pigs. *Clin Orthop* 1994; 301: 263-70.
46. Amitani K, Nakata Y. Studies on a factor responsible for new bone formation from osteosarcoma in mice. *Calcil Tissue Res* 1975; 17: 139-50.
47. Amitani K, Nakata Y, Stevens J. Bone induction by liophilized osteosarcoma in mice. *Calcif Tissue Res* 1974; 16: 305-13.
48. Amitani K, Ono K, Sakamoto Y, Nakata Y. A bone inducing factor from osteosarcoma. *Prac Symp Chem Physiol Pathol (Tokyo)* 1973; 13: 149.
49. Bauer FC, Urist MR. The reaction of gian cell tumors of bone to transplantation into athymic nude mice including observations osteoinduction in the host bed. *Clin Orthop* 1981; 159: 257-64.
50. Friedman B, Kingsbury GH, Vessely JC, Hanaoka H. Ultrastructural investigation of bone induction by an osteosarcoma, using difussion chambers. *Clin Orthop* 1968; 59: 39-57.
51. Hanamura II, Higuchi Y, Nakagawa M, Iwata H, Nogami II, Urist MR. Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix. *Clin Orthop* 1980; 148: 281-90.
52. Hanamura H, Urist MR. Osteogenesis in transplants of mouse osteosarcoma. *Min Tissue Commun* 1977; 3: 16.
53. Heiple KG, Hendon CH, Chase SW, Wattleworht A. Osteogenic induction by osteosarcoma and normal bone in mice. *J Bone Joint Surg* 1968; 50A: 311-25.
54. Takaoka K, Ono K, Amitani K, Kishimoto R, Nakata Y. Solubilization and concentration of a bone-inducing substance from a murine osteosarcoma. *Clin Orthop* 1980; 148: 247-80.
55. Takaoka K, Yoshikawa H, Shimizu N, Ono K, Amitani K, Nakata Y et al. Purification of a bone-inducing substance from a murine osteosarcoma. *Biomed Res* 1981; 2: 466.
56. Urist MR. Bone morphodifferentiation and tumorigenesis. *Perpect Biol Med* 1979; 22: S89-S113.
57. Urist MR, Felser JM. The bone morphogenetic property of Dunn osteogenic sarcoma cells. *Clin Bes* 1977; 25: 130-8.
58. Urist MR, Grant TT, Lindholm 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* 1979; 61A: 1207-16.
59. Urist MR, Nakata N, Felser JM, Nogami H, Hanamura H, Miki T et al. An osteosarcoma cell and matrix retained morphogen for normal bone formation. *Clin Orthop* 1977; 124: 251-66.
60. Yoshikawa H, Hashimoto J, Masuhara K, Takaoka K, Ono K. Inhibition by tumor necrosis factor of induction of ectopic bone formation by osteosarcoma derived bone inducing substance. *Bone* 1988; 9: 391-6.
61. Yoshikawa II, Takaoka K, Masuhara K, Ono K, Sakamoto Y. Prognostic significance of bone morphogenetic activity in osteosarcoma tissue. *Cancer* 1988; 61: 569-73.
62. Yoshikawa H, Masuhara K, Takaoka K, Ono K, Tanaka II, Seino Y. Abnormal bone formation induced by implantation os osteosarcoma derived bone inducing substance in the X-linked hypophosphatemic mouse. *Bone* 1985; 6: 235-9.
63. Yoshikawa H, Takaoka K, Hamada H, Ono K. Clinical significance of bone morphogenetic activity in osteosarcoma. *Cancer* 1985; 56: 1682-7.
64. Yoshikawa H, Takaoka K, Shimizu N, Ono K. Acid solutions enhance bone inducing activity of a murine osteosarcoma. *Bone* 1986; 7: 125-8.
65. Hirano H, Urist MR. Characteristics of the newly derived human chondrosarcoma cell line OSHU-1: Observations and osteoinduction. *J. Natl Cancer Inst* 1980; 65: 299-309.
66. Bauer FG, Mirra JM, Urist MR. Bone induction by Ewing's sarcoma transplantation into athymic nude mice. *Arch Pathol Lab Med* 1981; 105: 322-4.
67. Aminati K, Nakata Y. Establishment and alkaline phosphatase activity of clonal cell lines of murine osteosarcomas. A preliminary study. *Clin Orthop* 1975; 113: 164-7.
68. Dunn TB, Andervont HB. Histology of some neoplasms and non-neoplastic lesions found in wild mice maintained under laboratory conditions. *J Natl Cancer Inst* 1963; 31: 873-7.
69. Takaoka K, Yoshikawa H, Hashimoto J, Miyamoto S, Masuhara K, Nakahara H, Matsui M, Ono K. Purification and characterization of a bone-inducing protein from a murine osteosarcoma (Dunn type). *Clin Orthop* 1993; 292: 329-36.
70. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-5.
71. Iwata H, Urist MR. Hyaluronic acid production and removal during bone morphogenesis in implants of bone matrix in rats. *Clin Orthop* 1973; 90:236-45.
72. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Henning GE, Hipp J et al. Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1993; 293: 317-26.
73. Urist MR, Masiarz FR, Barr PJ, Kiefer M, Bathurst I, Finerman GAM. Recombinant bone morphogenetic protein by yeast expression system. *OBS 36th Annual Meeting*, 1990; 5-8. New Orleans, Louisiana.
74. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A et al. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 371-5.
75. Urist MR, Lietze A, Mizutani J, Takagi K, Triffitt JT, Amstutz J et al. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. *Clin Orthop* 1982; 162: 219-32.
76. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Bes* 1971; 50 (suppl. 6): 1392-406.
77. Takaoka K, Yoshikawa H, Hasimoto J, Masuhara K, Miyamoto S, Suzuki S et al. Gene cloning and expression of a bone morphogenetic protein derived from a murine osteosarcoma. *Clin Orthop* 1993; 294: 344-52.
78. Kübler N, Urist MR. Cell differentiation in response to partially purified osteosarcoma-derived bone morphogenetic protein *in vivo* and *in vitro*. *Clin Orthop* 1993; 292: 321-28.

79. **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* 1993; 286: 262-70.
80. **Bentz H, Chang R, Thompson AY, Glaser CB, Rosen DM.** Amino acid sequence of bovine osteoinductive factor T *Biol Chem* 1990; 265: 5024-9.
81. **Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB et al.** Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 1989; 264: 13377-80.
82. **Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa II, Hashimoto J, Suzuki S et al.** Evaluation of polylactic acid homopolymers carriers for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1993; 278: 274-80.
83. **Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa H, Hashimoto J, Suzuki S et al.** Polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer. A new biodegradable synthetic carrier for bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1993; 294: 333-43.
84. **Ueno Y, Shima Y, Ueyoshi A, Harada M, Sakata H, Maeda T et al.** An experimental study of sintered bone implants. *Bessatu Seikeigeka* 1985; 8: 85-8.
85. **Sakano S, Murata Y, Miura T, Iwata H, Sato K, Matsui T, Seo H.** Collagen and alkaline phosphatase gene expression during bone morphogenetic protein (BMP)-induced cartilage and bone differentiation. *Clin Orthop* 1993; 292: 337-44.
86. **Sato K, Urist MR.** Bone morphogenetic protein-induced cartilage development in tissue culture. *Clin Orthop* 1984; 183: 180-7.
87. **Kawamura M, Urist MR.** Growth factors, mitogens, cytokines, and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture. *Dev Biol* 1988; 130: 435-42.
88. **Takahashi S, Urist MR.** Differentiation of cartilage on three substrata under the influence of an aggregate of morphogenetic protein and other bone tissue noncollagenous proteins (BMP/NCP). *Clin Orthop* 1986; 207: 227-38.
89. **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* 1986; 11A: 417-9.
90. **Johnson EE, Urist MR, Finerman GAM.** Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunion: A preliminary report. *Clin Orthop* 1988; 230: 257-65.
91. **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* 1990; 250: 234-40.
92. **Tabas JA, Hahn GH, Cohen RB, Seanez HN, Modi WS, Wozney JM et al.** Chromosomal assignment of the human gene for bone morphogenetic protein 4. *Clin Orthop* 1993; 293: 310-6.
93. **Buhler EM, Buhler UK, Beutler C, Fessler R.** A final word on the tricho-rhinophalangeal syndromes. *Clin Genet* 1993; 31: 273-8.
94. **Hahn (J V), Cohen RB, Wozney JM, Levitz CL, Shore EM, Zasloff MA, Kaplan FS.** A bone morphogenetic protein subfamily: Chromosomal localization of human genes for BMP5, BMP6, and BMP7. *Genomics* 1992; 14: 759-62.
95. **Sampath TK, Goughlin JE, Whetstone RM, Banach D, Corbett C, Ridge RJ et al.** Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 1990; 265: 13198-205.
96. **Griffith DL, Oppermann H, Rueger DC, Sampath TK, Tueker RF, Carlsson WD.** Crystallization and preliminary crystallographic data of recombinant human osteogenic protein-1. *J Mol Biol* 1994; 244: 657-8.
97. **Ozkaynak E, Schneglsberg FN, Oppermann H.** Murine osteogenic protein (OP-1): High levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 116-23.
98. **Suzuki A, Nishimatsu S, Murakami K, Ueno N.** Differential expression of *Xenopus* BMPs in early embryos and tissues. *Zool J Linn Soc* 1993; 10: 175-8.
99. **Houston B, Thorp BH, Burt DW.** Molecular cloning and expression of bone morphogenetic protein-7 in the chick epiphyseal growth plate. *J Mol Endocrinol* 1994; 13: 289-301.
100. **Yamashita H, ten-Dijke P, Huybroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC et al.** Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 1995; 130: 217-26.
101. **Liu F, Ventura F, Doddy J, Massague J.** Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): Extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 3479-86.
102. **Ten-Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL et al.** Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 1994; 269: 16985-8.
103. **Dewulf N, Verschuere K, Lonnoy O, Moren A, Grimsby S, Vande-Spiegel K et al.** Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* 1995; 136: 2652-63.
104. **Vukicevic S, Latin V, Chen P, Batorsky R, Reddi AH, Sampath TK.** Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: High affinity binding to basement membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 693-700.
105. **Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R Jr, Li IW et al.** Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann NY Acad Sci* 1995; 760: 223-41.
106. **Perides G, Safran RM, Rueger DC, Gharness ME.** Induction of the neural cell adhesion molecule and neuronal aggregation by osteogenic protein-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10326-30.
107. **Perides G, Hu G, Rueder DC, Charness ME.** Osteogenic protein-1 regulates L1 and neural cell adhesion molecule gene expression in neural cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 25197-205.
108. **Perides G, Jensen FE, Edgecomb P, Rueger DC, Charness ME.** Neuroprotective effect of human osteogenic protein-1 in a rat model of cerebral hypoxia/ischemia. *Neurosci Lett* 1995; 187: 21-4.
109. **Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M.** Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1993; 38: 571-6.
110. **Rutherford RB, Spangberg L, Tucker M, Rueger D, Charette M.** The time-course of the induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1994; 39: 833-8.
111. **Reddi AH, Cunningham NS.** Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *J Bone Miner Res* 1993; 8: S499-S502.

112. **Andrews PW, Damjanov I, Berends J, Kumpf S, Zappavigna V, Mavilio F et al.** Inhibition of proliferation and induction of differentiation of pluripotent human embryonal carcinoma cells by osteogenic protein-1 (or bone morphogenetic protein-?). *Lab Invest* 1994; 71: 243-51.
113. **García de Lucas F, De Pedro JA, López A, San Román J, Cuadrado MA, Pérez-Caballer AJ et al.** Osteorregeneración inducida por biomateriales y BMP en defectos diafisarios. *Rev Ortop Traumatol* 1995; 39: 443-56.
114. **Chen P, Vukicevic S, Sampath TK, Luyten FP.** Bovine articular chondrocytes do not undergo hypertrophy when cultured in the presence of serum and osteogenic protein-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 1253-9.
115. **Chen P, Vukiccvic S, Sampath TK, Luyten FP.** Osteogenic protein-1 promotes growth and maturation of chick sternal chondrocytes in serum-free cultures. *J Cell Sci* 1995; 108: 105-14.
116. **Maliakal JC, Asahina I, Hauschka PV, Sampath TK.** Osteogenic protein-1 (BMP-7) inhibits cell proliferation and stimulates the expression of markers characteristic of osteoblast phenotype in rat osteosarcoma (17/2.8) cells. *Growth Factors* 1994; 11: 227-34.
117. **Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF et al.** Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation *in vivo* with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. *J Biol Chem* 1992; 267: 20352-62.
118. **Hentunen TA, Lakkakorpi PT, Tuukkanen J, Lehenkari PP, Sampath TK, Vaananen HK.** Effects of recombinant human osteogenic protein-1 on the differentiation of osteoclast-like cells and bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 433-43.
119. **Knutsen R, Honda Y, Strong DD, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S.** Regulation of insulin-like growth factor system components by osteogenic protein-1 in human bone cells. *Endocrinology* 1995; 136: 857-65.
120. **Knutsen R, Wergedal JE, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S.** Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 1352-8.
121. **Asahina I, Sampath TK, Nishimura I, Hauschka PV.** Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. *J Cell Biol* 1993; 123: 921-33.
122. **Malpe R, Baylink DJ, Sampath TK, Mohan S.** Evidence that human bone cells in culture contain binding sites for osteogenic protein-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 201: 1140-7.
123. **Poslethwaite AE, Raghov R, Stricklin G, Ballou L, Sampath TK.** Osteogenic protein-1, a bone morphogenetic protein member of the TGF-beta superfamily, shares chemotactic but no fibronogenic properties with TGF-beta. *J Cell Physiol* 1994; 161:562-70.
124. **Dieudonne SC, Semeins CM, Goei SW, Vukicevic S, Nulend JK, Sampath TK et al.** Opposite effects of osteogenic protein and transforming growth factor beta on chondrogenesis in cultured long bone rudiments. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 771-80.