

ESTUDO DA FORMAÇÃO ECTÓPICA DE TECIDOS ÓSSEO E HEMATOPOIÉTICO INDUZIDA PELO IMPLANTE DE MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA, EM CAMUNDONGOS

(STUDY OF THE FORMATION OF ECTOPIC BONE AND HEMATOPOETIC TISSUES INDUCED BY THE IMPLANTATION OF DEMINERALIZED BONE MATRIX IN MICES)

(ESTUDIO DE LA FORMACIÓN ECTÓPICA DE TEJIDOS ÓSEO Y HEMATOPOYÉTICO INDUCIDA POR EL IMPLANTE DE MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA EN RATONES)

A. KATAOKA¹, A. E. SANTANA²

RESUMO

No presente trabalho foram utilizados 75 camundongos (25 machos e 50 fêmeas) adultos, sadios, distribuídos em cinco grupos experimentais. Cada grupo foi constituído por 15 animais, sendo 10 fêmeas e cinco machos. Ao longo do protocolo experimental os diferentes grupos experimentais, enumerados de um a cinco, foram sucessivamente avaliados quanto à resposta ao implante intramuscular de matriz óssea desmineralizada aos sete, 14, 21, 28 e 35 dias. Todos os animais receberam implante intramuscular de matriz óssea desmineralizada entre as fibras musculares do músculo semimembranoso, bilateralmente. Os resultados mostraram que o implante intramuscular de matriz óssea desmineralizada induz à formação de placa óssea ectópica, ocorrendo inicialmente uma proliferação fibroblástica (sete dias), seguida pelo aparecimento sucessivo de cartilagem (14 dias), osso (21 dias) e medula óssea (35 dias). Não houve diferença com relação à formação ectópica de tecidos ósseo e hematopoiético, induzida pelo implante de matriz óssea desmineralizada, atribuível ao fator sexo.

PALAVRAS-CHAVE: Tecido ósseo ectópico. Tecido hematopoiético ectópico. Matriz óssea desmineralizada. Camundongos.

SUMMARY

Seventy-five healthy mice (twenty-five males and fifty females) were allotted to five groups with fifteen mice (five males and ten females). During the experimental period the effect of the intramuscular implantation of demineralized bone matrix was assessed at 7, 14, 21, 28, and 35 days. All the animals received the intramuscular implantation of demineralized bone matrix between the semimembranosus muscle fibers, in both sides. The results showed that the intramuscular implantation of demineralized bone matrix in mice induces the formation of an ectopic bone plaque that is characterized by fibroblastic proliferation (seven days), followed by cartilage (14 days), bone (21 days) and bone marrow (35 days). There was no difference with reference to ectopic bone formation and hematopoetic tissues to attribute to sex factor.

KEY-WORDS: Ectopic bone tissue. Ectopic hematopoetic tissue. Demineralized bone matrix. Mice.

¹ Médica Veterinária. Rua José Garcia Fernandes, 301 - Jaú. CEP. 17203-020.

² Professor Adjunto da Unesp - Jaboticabal - SP.

RESUMEN

En el presente trabajo fueron utilizados 75 ratones (25 machos y 50 hembras), adultos, saludables, distribuidos en cinco grupos experimentales. Cada grupo fue constituido por 15 animales, siendo 10 hembras y cinco machos. A lo largo del experimento los diferentes grupos experimentales, enumerados de uno a cinco, fueron sucesivamente evaluados al respecto de la respuesta al implante intramuscular de matriz ósea desmineralizada a los 7, 14, 21, 28 y 35 días. Todos los animales recibieron implante intramuscular de matriz ósea desmineralizada entre las fibras musculares del músculo semimembranoso bilateralmente. Los resultados mostraron que el implante intramuscular de matriz ósea desmineralizada induce la formación de placa ósea ectópica, con proliferación fibroblástica inicial (siete días), seguida por el apareamiento sucesivo de cartílago (14 días), hueso (21 días) y médula ósea (35 días). No hubo diferencia, con relación a la formación ectópica de tejido óseo y hematopoyético inducida por el implante de matriz ósea desmineralizada, atribuible al factor sexo.

PALABRAS-CLAVE: Tejido óseo ectópico. Tejido hematopoyético ectópico. Matriz ósea desmineralizada. Ratones.

INTRODUÇÃO

Na vida extra-uterina, após terem cessado as diferenciações embrionárias, algumas células do tecido conjuntivo ainda permanecem num estado indiferenciado que persiste ao longo da vida. Essas células em dormência têm uma notável capacidade de serem prontamente induzidas à diferenciação por meios experimentais (HUGGINS et al., 1970).

Assim, a indução óssea ectópica pode ocorrer espontaneamente a partir de tecido conjuntivo que não esteja associado com o esqueleto. Essa ossificação ectópica foi descrita em vários locais, tais como na pelve renal, paredes de artérias, olhos, músculos e tendões. Tais observações permitem inferir que muitos tipos de tecido conjuntivo possuem potencialidade osteogênica latente, raramente manifestada.

A indução da osteogênese ectópica experimental foi inicialmente relatada na década de 30, quando Huggins (1930 e 1931) demonstrou que o epitélio de revestimento da pelve renal, do ureter e vesícula urinária são capazes de induzir diretamente a osteogênese em certas áreas do tecido conjuntivo do cão, cobaias e ratos. Desde que o epitélio transplantado sobreviva, ele prolifera formando um cisto contendo um fluido amarronzado, limitado pelo epitélio e encapsulado por fibroblastos que posteriormente sofrem uma transformação osteoblástica, e um novo osso é formado, propiciando, posteriormente, o desenvolvimento no seu interior de medula óssea hematopoeticamente ativa. O epitélio da vesícula seminal de cobaia (HUGGINS, 1969) é igualmente ativo nesta indução.

Huggins e Sammet (1933) demonstraram que o epitélio da vesícula biliar é capaz de estimular a formação de osso na parede abdominal de cobaias e cães após 21 e 41 dias do implante, respectivamente. Inoue et al. (1986) relataram a indução de condrogênese *in vivo* através do implante de dente desmineralizado no músculo, tecido celular subcutâneo, cavidade medular do fêmur e ligamento periodontal em ratos. Após 21 dias do implante,

várias amostras foram colhidas e analisadas em vários tempos, em que se verificou que a indução de cartilagem ocorreu mais rapidamente no músculo, seguido pelo tecido celular subcutâneo e cavidade medular do fêmur, e mais suavemente nos ligamentos periodontais.

Wlodarski e colaboradores em 1974 realizaram o implante intra-escleral em coelhos utilizando matriz óssea desmineralizada autóloga, no intuito de comparar as respostas intra-escleral e intramuscular. Como resultado ao implante intraescleral, os autores não encontraram formação de tecido cartilaginoso ou mesmo indução óssea.

A osteogênese pode-se desenvolver de duas maneiras: quando a formação de osso se dá diretamente no tecido conjuntivo primitivo, é chamada de ossificação intramembranosa, como ocorre quando fragmentos de epitélio de pelve renal, ureter, vesícula urinária (HUGGINS, 1930, HUGGINS, 1931), vesícula biliar (HUGGINS e SAMMET, 1933) e vesícula seminal (HUGGINS, 1969) são implantados em certas áreas do tecido conjuntivo e também quando células amnióticas humanas mantidas em cultura e inoculadas intramuscularmente em camundongos produzem a formação ectópica de osso em aproximadamente 12 dias (ANDERSON et al., 1964, ANDERSON e COULTER, 1967). Por outro lado, quando a formação de tecido ósseo ocorre no interior da cartilagem preexistente é chamada de ossificação endocondral ou intracartilaginosa, como foi demonstrado por vários pesquisadores (VAN DE PUTTE e URIST, 1965, HUGGINS et al., 1970, IDERIHA, 1982, SANTANA, 1988, ZHANG et al., 1997a, ZHANG et al., 1997b), utilizando o implante intramuscular ou subcutâneo de segmentos de osso e/ou dente desmineralizado. Becker et al. (1995) verificaram que ossos humanos desmineralizados, dessecados por congelamento (DFDBA - "deminerallized freeze-dried bone") e obtidos em bancos de ossos comerciais, possuem a capacidade de induzir, embora de maneira clinicamente insignificante, uma pequena quantidade de osso, em camundongos, utilizando-se 25 miligramas de matriz óssea implantada no músculo do quarto traseiro.

Há algumas décadas, o mecanismo da indução óssea era muito controverso. Sabia-se da existência de uma substância indutora da formação óssea, mas as tentativas de isolamento não apresentavam resultados satisfatórios. Já na década de 70, a osteogênese ectópica induzida pelo implante de matriz óssea desmineralizada (MOD) foi associada principalmente à presença de uma matriz de colágeno/proteoglicano e fatores protéicos, como a proteína morfogenética, que pode ser extraída da matriz óssea desmineralizada. Essa proteína denominada de “Bone Morphogenetic Protein” (BMP) atuaria como um substrato indutivo não difusível (URIST e STRATES, 1971). Quando a indução é feita por epitélio osteogênico, é indispensável o contato entre as células epiteliais implantadas e as células mesenquimais locais. Essa constatação sugere a existência de alguma propriedade de membrana comum a estas células epiteliais, que desencadearia a diferenciação celular em osteoblastos (WLODARSKI e OSTROWSKI, 1979).

A BMP foi extraída com sua atividade osteogênica intacta no início dos anos 80. (HANAMURA et al., 1980, URIST et al., 1982).

Após o implante da matriz óssea desmineralizada, a seqüência de transformações morfológicas observadas que leva à formação de tecido ósseo ocorrem da seguinte maneira: numa primeira fase há uma resposta fibroblástica em torno dos fragmentos de matriz óssea implantada, seguida do aparecimento de condroblastos, osteoblastos e, na última fase, medula óssea (REDDI e HUGGINS, 1972, ROSSINHOLI, 1981, IDERIHA, 1982, SANTANA, 1988). Segundo Ideriha (1982), a medula óssea ectópica apresenta-se morfológicamente semelhante à medula óssea esternal, sendo, no entanto, ligeiramente mais gordurosa. Esfregaços da medula óssea ectópica revelam todos os tipos celulares das linhagens eritrocítica, mielocítica e megacariocítica (REDDI e HUGGINS, 1975). Acredita-se que as células da medula óssea ectópica originam-se da medula óssea do hospedeiro (REDDI, 1974), além de conter as CFU (Colony Forming Units) e CFC (Colony Forming Cells) (WLODARSKI e JAKOBISIAK, 1978).

Assim, como foi descrito, o implante de matriz óssea desmineralizada (MOD) induz a formação de medula óssea ectópica que se assemelha morfológica e fisiologicamente à medula autóloga do hospedeiro. Desse modo, a indução ectópica de medula óssea poderia, possivelmente, ter aplicação no tratamento de doenças que envolvam transtornos hematopoiéticos e doenças de imunodeficiência, uma vez que o transplante de medula óssea é um dos tratamentos mais eficientes para a anemia aplástica severa, quando existe doador “alógeno” compatível (GRINER, 1980) e, como muitos doentes não dispõem de doadores nesta condição, torna-se necessário o uso de terapias alternativas. Pelo contrário, no processo de indução ectópica de medula óssea não seria observado

o problema de rejeição, pois poderia ser utilizada a medula óssea autóloga. A indução da osteogênese ectópica também é muito utilizada no intuito de se evitar os problemas de rejeição na realização de enxertos nas áreas de ortodontia e ortopedia.

O presente trabalho teve como objetivo descrever qualitativamente a evolução histológica do fenômeno de osteo-mielogênese ectópica, após o implante de matriz óssea desmineralizada, em camundongos machos e fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente experimento, foram utilizados camundongos machos e fêmeas adultos, pesando aproximadamente 40 a 50g e com 2 meses de idade, obtidos no Biotério Central da FMRP-USP-Ribeirão Preto (SP), os quais foram mantidos em gaiolas contendo 5 e 10 animais/gaiola, respectivamente, perfazendo um total de 75 animais, sendo 25 machos e 50 fêmeas, que foram divididos em 5 grupos correspondentes ao controle (momento zero) e 5 diferentes momentos da resposta osteomielogênica ectópica (7, 14, 21, 28 e 35 dias). Cada grupo era constituído de 15 animais, sendo 5 machos e 10 fêmeas. Todos os animais receberam ração e água “*ad libitum*”.

A matriz óssea desmineralizada (MOD) foi preparada segundo Urist (1973), com modificações (IDERIHA, 1982, SANTANA, 1988). No preparo da referida matriz foram utilizadas diáfises de fêmures retiradas de 200 camundongos, machos e fêmeas, sacrificados por deslocamento cervical. Os ossos foram imediatamente retirados, removidos os tecidos moles e as epífises, e desmineralizados.

Depois de pronta, a matriz óssea desmineralizada foi armazenada em *ependorfs* e mantida sob refrigeração a 4°C, até o momento do implante intramuscular.

Para o implante intramuscular de MOD, os camundongos foram anestesiados com tiopental sódico na dose de 50mg/Kg de peso corpóreo, intraperitonealmente (MASSONE, 1994) e procedida a tricotomia e anti-sepsia da pele que recobre a região lateral superior da coxa. Os animais foram colocados em decúbito lateral, ocasião em que foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,0 cm na pele, a *fascia lata* foi rompida, e 10 mg de matriz óssea foram implantados entre as fibras musculares do músculo semimembranoso, bilateralmente. Para a avaliação da resposta ao implante de MOD, cada grupo de 15 camundongos (5 machos e 10 fêmeas) foi sacrificado em cinco diferentes tempos: 7 - 14 - 21 - 28 - 35 dias após o implante da MOD. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Esterno e placas ósseas ectópicas foram colhidos e fixados em Bouin, durante 24 horas.

A remoção do ácido pícrico foi feita por meio de sucessivas lavagens em álcool 70% acrescidas de algumas

gotas de amônia a 10%. A seguir, o material foi processado histotecnicamente, de acordo com os procedimentos de rotina, no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Animal da FCAV - UNESP - *Campus* de Jaboticabal. O material foi incluído em parafina e obtidos cortes histológicos seriados de 3 micrômetros de espessura e corados com HE (hematoxilina-eosina).

As preparações histológicas das placas ósseas foram analisadas microscopicamente e avaliadas quanto à intensidade de resposta mielopoética, após o implante de matriz óssea desmineralizada. As placas foram avaliadas também de maneira comparativa entre sexos.

As alterações histológicas verificadas nas placas ósseas ectópicas e medula óssea autóloga (esternal) foram analisadas e descritas qualitativamente dentro de cada grupo que corresponde a um momento de sacrifício diferente.

RESULTADOS

O grupo de animais avaliados após 7 dias do implante de matriz óssea desmineralizada (MOD) apresentou no local do implante a presença de restos de matriz óssea implantada, em grande quantidade, cujos fragmentos ósseos se achavam envolvidos por uma intensa reação fibroblástica. Verificou-se, também, início de atividade condrogênica com visíveis condrócitos hipertróficos; em alguns casos, pôde-se observar extensas áreas de condrogênese (Figura 1A). Em apenas dois animais desse grupo foi observada a presença de células polimorfonucleares (PMNs) envolvendo partes da matriz implantada. Nesse grupo, a intensidade e as características da resposta foram semelhantes para machos e fêmeas (avaliados na primeira semana após o implante de MOD). Aos 14 dias do implante da MOD, foi observada a presença de restos da matriz implantada, variando individualmente desde uma grande quantidade até pequenos fragmentos íntegros ou parcialmente destruídos, além de focos de reabsorção da matriz. A atividade condrogênica nesta etapa encontrava-se bem adiantada e era permeada por tecido fibroblástico em grande quantidade, em alguns casos era possível a visualização de início de osteogênese com esboço de trabéculas ósseas e, novamente, a presença de células polimorfonucleares junto com fibroblastos envolvendo partes da matriz implantada (Figura 1B).

Aos 21 dias do implante da MOD, pôde-se observar a presença de restos de matriz implantada, substituição de tecido cartilaginoso por tecido ósseo, presença de osso neoformado sendo visível a presença de osteoblastos e osteócitos, formação de trabéculas, início de vascularização com presença de hemácias soltas e capilares sinusóides raros. Foi observada também, mas raramente, a presença de megacariócitos juntamente com

células mononucleares atestando provavelmente o início de formação de medula óssea na placa ectópica, com capilares sinusóides e células adiposas em pouca quantidade (Figura 1C).

Aos 28 dias, foi possível observar ainda a presença de restos de matriz implantada, tecido ósseo bem formado e trabéculas ósseas, alguns fibroblastos espalhados, presença marcante de inúmeros megacariócitos, vasos sinusóides bem delimitados, gordura presente em quantidade razoável, presença de hemácias e células precursoras leucocitárias e eritrocitárias em vários estádios evolutivos. Neste momento da avaliação, embora de forma discreta, ainda era possível encontrar pequenos focos de cartilagem (Figura 1D).

Aos 35 dias após o implante de MOD, foi observado que todos os animais responderam bem ao implante de matriz, desenvolvendo placa óssea ectópica contendo medula óssea rica em componentes celulares hematopoiéticos e do tecido de sustentação da hematopoiese. Estas placas apresentaram uma grande quantidade de gordura, restos de matriz implantada, osso neoformado e trabéculas ósseas bem definidas, canal medular contendo precursores leucocitários e eritrocitários, presença de capilares sinusóides, megacariócitos bem evidentes e células adiposas em grande quantidade (Figura 2).

A medula óssea ectópica, observada aos 28 e 35 dias, revelou-se semelhante à autóloga (esterno), encerrando igualmente, componentes hematopoiéticos e microambientais. A observação cuidadosa dos cortes histológicos das preparações medulares ectópicas e autóloga colocou em evidência um componente graxo muito mais rico naquela do que nesta. Porém, de outro lado, a quantidade de células precursoras sangüíneas de todas as linhagens estava mais fortemente presente na medula óssea esternal. Este último achado também era verdadeiro para a densidade populacional dos capilares sinusóides intramedulares.

DISCUSSÃO

As avaliações histológicas das placas ósseas ectópicas e medula óssea esternal revelaram que 100% dos animais já aos 28 e, principalmente, aos 35 dias, apresentaram resposta osteiomielogênica positiva, confirmando os resultados previamente descritos (REDDI e HUGGINS, 1972, URIST, 1973, IDERIHA, 1982, SANTANA, 1988).

As áreas de hematopoese na medula óssea ectópica mostraram-se morfológicamente semelhantes à medula óssea esternal, tendo desenvolvido os elementos de sustentação, cartilagem, osso e medula óssea. Estas observações corroboram evidências, já reportadas, de que áreas de hematogênese na medula óssea ectópica se

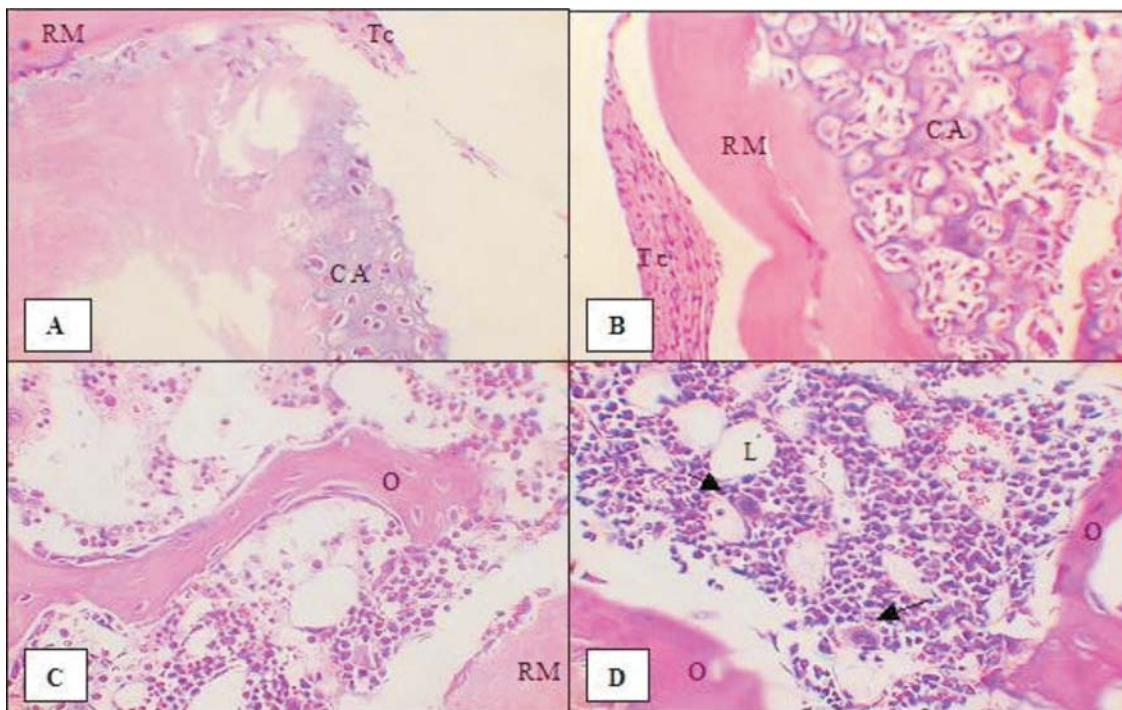


Figura 1 – A. Atividade condrogênica ectópica observada 7 dias após implante de MOD. B. Atividade condrogênica ectópica 14 dias após implante de MOD. C. Atividade osteogênica ectópica 21 dias após o implante de MOD. D. Atividade mielopoietica ectópica aos 28 dias do implante de MOD. Restos de matriz implantada (RM), cartilagem (CA), tecido conjuntivo com predominância de fibroblastos (Tc), tecido ósseo neoformado (O), megacariócitos (→) e lipócitos (L). HE, aumento de 400x.

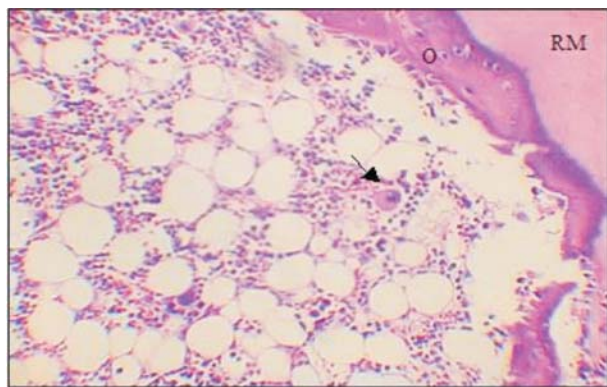


Figura 2 – Atividade mielopoietica ectópica aos 35 dias do implante de MOD em camundongos. Restos de matriz implantada (RM), tecido ósseo neoformado (O) e megacariócitos (→). HE, aumento de 200x.

desenvolvem a partir de precursores indiferenciados, originados na medula óssea esternal. Estes precursores indiferenciados chegariam pela circulação e se desenvolveriam no meio microambiente adequado, estabelecido durante a seqüência de eventos que leva à formação da placa óssea ectópica.

Assim, os resultados obtidos no presente ensaio encontram ressonância na hipótese formulada por Urist (1973), bem como nos achados reportados por Ideriha (1982) e Santana (1988), segundo os quais o desenvolvimento da medula óssea ectópica se faz a partir de *stem cells*, que chegam ao local do implante através da neovascularização.

CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos no presente experimento, conclui-se que o implante intramuscular de matriz óssea desmineralizada induz à formação de placa óssea ectópica, inclusive, com atividade mielopoietica. Camundongos machos e fêmeas responderam de forma semelhante e, positivamente, ao implante intramuscular de matriz óssea desmineralizada.

ARTIGO RECEBIDO: Agosto / 2004

APROVADO: Março / 2005

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, H. C., COULTER, P. R. Bone formation induced in mouse thigh by cultured human cells. **Journal of Cell Biology**, v.33, p.165-77, 1967.
- ANDERSON, H. C., MERKER, P. C., FOGH, J. Formation of tumors containing bone after intramuscular infection of transformed human amnion cells (FL) into cortisone-treated mice. **American Journal of Pathology**, v.44, p.507-12, 1964.
- BECKER, W., URIST, M. R., TUCKER, L. M., BECKER, B. E., OCHSENBEIN, C. Human demineralized freeze-dried bone: inadequate induced bone formation in athymic mice. A preliminary report. **Journal of Periodontology**, v.66, n.9, p.822-8, 1995.
- GRINER, P. F. A survey of the effectiveness of cyclophosphamide in patients with severe aplastic anemia. **American Journal of Hematology**, v.8, p.55-60, 1980.
- HANAMURA, H., HIGUCHI, Y., NAKAGAWA, M., IWATA, H., NOGAMI, H., URIST, M. R. Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix. **Clinical Orthopaedics**, v.148, p.281-90, 1980.
- HUGGINS, C. B. Experimental osteogenesis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.27, p.349-51, 1930.
- HUGGINS, C. B. The formation of bone under the influence of epithelium of the urinary tract. **Archives of Surgery**, v.22, p.377-408, 1931.
- HUGGINS, C. B. Epithelial osteogenesis – a biological chain reaction. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v.113, p.458-62, 1969.
- HUGGINS, C. B., SAMMET, J. F. Function of the gall bladder epithelium as an osteogenic stimulus and the physiological differentiation of connective tissue. **Journal of Experimental Medicine**, v.58, p.393-400, 1933.
- HUGGINS, C. B., WISEMAN, S., REDDI, A. H. Transformation of fibroblasts by allogeneic and xenogeneic transplants of demineralized tooth and bone. **Journal of Experimental Medicine**, v.132, p.1250-8, 1970.
- IDERIHA, N. M. **Formação ectópica de tecidos cartilaginosa, óssea e medula óssea, induzidos por matriz óssea desmineralizada, em camundongos com anemia aplástica**. Ribeirão Preto, SP, 1982. 64p. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- INOUE, T., DEPORTER, D. A., MELCHER, A. H. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. **Journal of Dental Research**, v.65, n.1, p.12-22, 1986.
- MASSONE, F. Técnicas anestésicas de laboratório. In: _____. **Anestesiologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.105-10.
- REDDI, A. H. Bone matrix in the solid state: geometric influence on differentiation of fibroblast. **Advances in Biological Medical Physics**, v.15, p.1-18, 1974.
- REDDI, A. H., HUGGINS, C. B. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. **Proceedings of the National Academy Science**, v.69, p.1601-5, 1972.
- REDDI, A. H., HUGGINS, C. B. Formation of bone marrow in fibroblasts transformation ossicles. **Proceedings of the National Academy Science**, v.72, p.2212-6, 1975.
- ROSSINHOLI, G. M. **Osteogênese metaplástica induzida por pó de osso desmineralizado frente à inibição pela D-Penicilamina**. Ribeirão Preto, SP, 1981. 86p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- SANTANA, A. E. **Benzenismo experimental. Desenvolvimento da medula óssea ectópica**. Ribeirão Preto, SP, 1988. 69p. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- URIST, M. R. A bone morphogenetic system in residues of bone matrix in the mouse. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.91, p.210-20, 1973.
- URIST, M. R., STRATES, B. S. Bone Morphogenetic protein. **Journal Dental Research**, v.50, n.6, p.1392-406, 1971.
- URIST, M. R., LIETZE, A., MIZUTANI, H., TAKAGI, K., TRIFITT, J. T., AMSTUTZ, J., DeLANGE, R., TERMINE, J., FINERMAN, G. A. M. A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. **Clinical Orthopaedics**, v.162, p.219-32, 1982.
- VAN DE PUTTE, K. A., URIST, M. R. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. **Clinical Orthopaedics**, v.43, p.257-70, 1965.
- WLODARSKI, K., JAKOBISIAK, M. Cytological analysis of bone marrow present in the bone nodules induced by human FL cells in mice. **Folia Biologica**, v.24, p.215-8, 1978.

WLODARSKI, K., OSTROWSKI, K. Further investigations on possible correlation between agglutinability and osteoinductive properties of established cell lines. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v.27, p. 113-9, 1979.

WLODARSKI, K., PTASINSKA - UBANSKA, M.; MOSKALEWSKI, S. L., JEDRASIEWICZ, B. Comparison of the efficiency of bone induction by decalcified bone matrix in the mouse and rabbit. **Folia Biologica**, v.22, p.378-83, 1974.

ZHANG, M., POWERS, R. M., WOLFIN BARGER, L. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. **Journal of Periodontology**, v.68, n.11, p.1085-92, 1997a.

ZHANG, M., POWERS, R. M., WOLFIN BARGER, L. A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. **Journal of Periodontology**, v.68, n.11, p.1076-84, 1997b.