

# Las proteínas óseas morfogenéticas. Ciencias básicas y aplicaciones en cirugía ortopédica

Raúl Álvarez San Martín\*

## RESUMEN

Las proteínas óseas morfogenéticas son un conjunto de citocinas con efectos pleiotrópicos que pertenecen a la super familia del factor de crecimiento transformante beta. Sus implicaciones en ortopedia se hicieron importantes a partir de las investigaciones de Marshall Urist, al descubrir su capacidad de osteoinducción. El desarrollo posterior de su clonación permitió su investigación sobre la regeneración y reparación de lesiones óseas. Este documento revisa brevemente los conceptos fundamentales sobre su síntesis fisiológica, estructura molecular, clasificación, propiedades bioquímicas y efectos sobre el sistema musculoesquelético. También trata los principios de la tecnología involucrada en su producción industrial como insumos de salud empleados en la cirugía de reconstrucción biológica en ortopedia.

**Palabras clave:** Matriz, desmineralizada, hueso, proteína, morfogenética, factor, crecimiento, osteoinducción.

**Nivel de evidencia:** V

*Bone morphogenetic proteins.  
Basic science and surgical orthopedic applications*

## ABSTRACT

*Bone morphogenetic proteins are a group of cytokines with pleiotropic effects that belong to the transforming growth factor-beta superfamily. Their implications in orthopedic surgery became important because of their osteoinductive properties noted first by Marshall Urist, and later, with the development of cloned proteins and their potential clinical applications in bone healing. This document will review in brief the basic concepts about their physiologic synthesis, molecular structure, classification, biochemical properties and effects on the musculoskeletal system, but also, the technology involved in their industrial production as health goods applied as biologic reconstruction devices in orthopedic surgery.*

**Key words:** Demineralized, bone, matrix, morphogenetic, protein, growth, factor, osteoinduction.

**Level of evidence:** V

## Abreviaturas:

DBM = Matriz ósea desmineralizada (siglas del inglés *demineralized bone matrix*).

BMP = Proteínas morfogenéticas óseas (siglas del inglés *bone morphogenetic proteins*).

TGF- $\beta$  = Factor de crecimiento transformante beta (siglas del inglés *transforming growth factor beta*).

Proteínas Smad (acrónimo del gen SMA [del inglés *small*: pequeño] del nematodo *Caenorhabditis elegans* y del gen Mad [del inglés *mothers against decapentaplegic*: madres contra el decapentaplégico] de la mosca *Drosophila*).

FDA = Administración de Alimentos y Medicinas (siglas del inglés *Food and Drug Administration*).

GDF = Factores de crecimiento y diferenciación (siglas del inglés *growth differentiation factors*).

GDNF = Factores neurotróficos derivados de la glía (siglas del inglés *glial derived neurotrophic factors*).

PCP = Proteinasa-C de procolágeno (siglas del inglés *procollagen C proteinase*).

rhBMP-2 = Proteína ósea morfogénica humana recombinante tipo 2 (siglas del inglés *recombinant human bone morphogenetic protein 2*).

CHO = Células de ovario de hámster chino (siglas del inglés *Chinese hamster ovary cells*).

\* Especialista en Ortopedia. Centro Médico ABC.

Recibido para publicación: 01/03/2018. Aceptado: 15/08/2018.

Correspondencia: Dr. Raúl Álvarez San Martín

Centro Médico ABC, Campus Observatorio.  
Sur 136 Núm. 116, Consultorio 111,  
Torre Donald Mackenzie, Col. Las Américas,  
Del. Álvaro Obregón, 01120, CDMX.  
Teléfono: 5230-8000  
E-mail: alvarez\_sanmartin@yahoo.com.mx

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:  
<http://www.medigraphic.com/analesmedicos>

## INTRODUCCIÓN

Si es necesario, la regeneración y cicatrización óseas son facilitadas a través de una intervención quirúrgica, ya sea por el aporte de elementos osteogénicos (ejemplo: células), o bien, a través de un andamio biológico (matriz osteoconductiva), e incluso por una sustancia que produzca una señal bioquímica osteoinductiva, o las tres. La matriz ósea desmineralizada provee dos de estos factores críticos para la producción ósea a través de su capacidad osteoconductiva (al ser andamio de expansión tisular) y osteoinductiva (al ser diferenciador de células madre mesenquimales en osteoblastos).

La capacidad de osteoinducción yace en los procesos de reparación ósea que ocurren de manera parecida durante el desarrollo óseo embrionario, donde los progenitores osteogénicos activan una cascada bioquímica que semeja la osificación endocondral.<sup>1</sup> Esto se logra a través de los factores de crecimiento óseo llamados proteínas óseas morfogenéticas (BMP, por sus siglas en inglés), un subgrupo peptídico asociado entre sí perteneciente a la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés). El término «osteoinducción» fue introducido en 1965 por el Dr. Marshall Urist después de descubrir la formación ósea ortotópica en tejido blando al implantar cilindros de hueso descalcificado. El experimento se conoce como «prueba de osteoinducción *in vivo*» o «modelo heterotópico en ratón» (o prueba de implantación en isquiotibiales de ratón, del inglés: *mouse hamstrings implant test*).<sup>2</sup> Es usado como parámetro de actividad biológica de la matriz ósea desmineralizada y le sirvió a Urist en 1965 para definirla como la porción orgánica del hueso que contiene las proteínas óseas morfogenéticas necesarias para la inducción ósea.<sup>2</sup> El modelo implica implantar a ratones atípicos 25 mg de matriz ósea desmineralizada en un músculo de la pata trasera. Luego, el animal es sometido a la ausencia de cargas por un periodo de 28 días, para después ser sacrificado, tomar radiografías y realizar cortes histológicos teñidos con tricrómico de Goldner, que finalmente son observados y evaluados bajo el microscopio.<sup>3</sup> Este modelo es un método estandarizado, reproducible y utilizado como predictor del desempeño y comportamiento clínico de la matriz ósea desmineralizada; sin embargo, tiene limitantes debido a que las laminillas son evaluadas por métodos histomorfométricos escalares que pueden tener gran variabilidad interobservador (por ejemplo: el sistema de Edwards para la osteo-

inducción y respuesta inflamatoria o la clasificación de Katz para la producción de hueso maduro).<sup>4,5</sup>

## MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA

Es un aloinjerto proveniente de hueso procesado al cual se le remueven células, lípidos, tejido conectivo y componentes minerales a través de procesos de lavado con antibióticos, descalcificación ácida, pulverización, liofilización, radioesterilización gamma de nivel farmacéutico y adición de un transportador sintético en las fases finales de su elaboración para obtener mejores capacidades físicas de manipulación y reconstitución. La matriz ósea desmineralizada es un compuesto heterogéneo cuyo contenido varía dependiendo del fabricante. Contiene colágenas tipo I, con algunas tipo IV y X, proteínas no relacionadas al colágeno, factores de crecimiento, fosfato de calcio mineral (1-6%) y detritos celulares. En Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicinas (FDA, por sus siglas en inglés) la cataloga como «hueso alogénico desmineralizado liofilizado».<sup>6,7</sup> Su rango de osteoinducción se relaciona con el tamaño de las partículas generadas (420-840  $\mu\text{m}$ ) durante su procesamiento.<sup>3,8</sup>

## LA SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA

Este grupo de moléculas contiene miembros relacionados a diversas funciones (citocinas pleiotrópicas) durante la embriogénesis y la homeostasis del adulto. Presentan similitudes estructurales entre sus miembros y comparten entre 25 y 40% de las secuencias de aminoácidos que las caracterizan. Los ligandos se sintetizan como moléculas precursoras inactivas que se activan por escisión proteolítica. Luego, se dimerizan o no, se secretan y se unen así a receptores (serina-treonina) membranales que activan, a su vez, una cadena de segundos mensajeros citoplásmicos a partir de la fosforilación de factores proteínicos llamados Smad (nombre derivado del acrónimo del gen *Sma* de *Caenorhabditis elegans* y del gen *Mad* de *Drosophila*) para, finalmente, traslocarse al núcleo celular y activar o reprimir la transcripción de los genes diana. Su efecto pleiotrópico se debe a diversos puntos de regulación en el ligando, el receptor, la proteína Smad activada y el factor de transcripción.<sup>9</sup>

En mamíferos, la superfamilia del TGF- $\beta$  contiene varias subfamilias: factor de crecimiento transformante beta tipos B1, B2, B3, activinas, inhibi-

nas, proteínas morfogenéticas óseas, factores de crecimiento y diferenciación (GDF, por sus siglas en inglés), factores neurotróficos derivados de la glía (GDNF, por sus siglas en inglés), las proteínas de crecimiento y diferenciación nodal (factores nodal), los factores de determinación derecha-izquierda (factores Lefty), así como la hormona antimülleriana.<sup>10</sup>

### PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS

Fueron identificadas por producir la formación ectópica de hueso y cartílago; su estudio posterior indicó que están involucradas en la regulación de otros procesos fisiológicos (por ejemplo: desarrollo, crecimiento, diferenciación, apoptosis, quimiotaxis, morfogénesis y formación de patrones). Su propiedad de

osteoinducción obedece a la respuesta tisular ante implantes que contengan cantidades mínimas (en nanogramos) de BMP.<sup>11</sup> Dentro del grupo de las BMP, una excepción sobre la capacidad de osteoinducción es la proteína ósea morfogenética tipo 1 (BMP-1, por sus siglas en inglés), que en realidad funciona como una metaloproteinasa (proteinasa-C de procolágena o *procollagen C proteinase* [PCP, por sus siglas en inglés]) que escinde propéptidos en el extremo carboxílico terminal (-COOH) de las procolágenas I, II y III (*Cuadro I*).<sup>12</sup>

Descubrimiento. Los experimentos de Marshall Urist permitieron por primera vez observar la formación heterotópica de hueso, las características de la matriz ósea (acelular y desvitalizada) y sospechar la existencia de algún factor estimulante del creci-

**Cuadro I.** Proteínas morfogenéticas óseas humanas.

* BMP (sinónimo)	Subfamilia TGF- $\beta$	Función**
BMP-1	Metaloproteinasa	Metaloproteinasa (procolágena I, II y III), inductor de condrogénesis, escinde la cordina (antagonista de BMP), implicada en la formación de patrones durante la embriogénesis
BMP-2 (BMP-2a)	BMP/GDF	Regeneración y reparación ósea, morfogénesis cardíaca
BMP-3 (osteogenina)	Activinas/inhibinas	Regulación negativa de la morfogénesis ósea
BMP-3b (GDF-10)	Activinas/inhibinas	Morfogénesis ósea y diferenciación celular
BMP-4 (BMP-2b, DVR-4)	BMP/GDF	Regeneración y reparación esquelética
BMP-5	BMP/GDF	Desarrollo de extremidades (morfogénesis ósea/cartilaginosa y conexión de tejidos blandos)
BMP-6 (Vgr-1, DVR-6)	BMP/GDF	Hipertrofia cartilaginosa y morfogénesis ósea
BMP-7 (proteína osteogénica -1)	BMP/GDF	Regeneración, reparación esquelética y homeostasis del calcio
BMP-8a (proteína osteogénica -2)	BMP/GDF	Morfogénesis ósea
BMP-8b	BMP/GDF	Morfogénesis ósea, espermatogénesis
BMP-9 (GDF-2)	BMP/GDF	Morfogénesis ósea, inhibidor de angiogénesis
BMP-10	BMP/GDF	Morfogénesis cardíaca
BMP-11 (GDF-11)	Activinas/inhibinas	Patrón de tejido mesodérmico y esquelético
BMP-12 (GDF-7/proteína morfogenética derivada de cartílago -3)	BMP/GDF	Desarrollo tendinoso, ligamentario y de la corteza motora (sistema nervioso central)
BMP-13 (GDF-6/proteína morfogenética derivada de cartílago -2)	BMP/GDF	Morfogénesis esquelética y articular
BMP-14 (GDF-5/proteína morfogenética derivada de cartílago -1)	BMP/GDF	Condrogénesis y osteogénesis
BMP-15 (GDF-9b)	BMP/GDF	Desarrollo folicular y maduración de ovocitos
BMP-16 (nodal)	BMP/GDF	Desarrollo de tejido mesodérmico y patrón axial
BMP-17 (Lefty-1, Lefty B)	Activinas/inhibinas	Determina el eje derecha-izquierda y regula Lefty-2 y nodal
BMP-18 (Lefty-2, Lefty A)	Activinas/inhibinas	Determina la asimetría de órganos derecha-izquierda
GDF-1 (DORV, DTGA-3)	BMP/GDF	Diferenciación celular embrionaria
GDF-3 (KFS-3, MCOP-7)	BMP/GDF	Diferenciación celular embrionaria
GDF-8 (MSTN, miostatina)	Activinas/inhibinas	Inhibidor del crecimiento muscular
GDF-9	BMP/GDF	Foliculogénesis y transición de fases del ciclo celular: G0/G1 a S y G2/M
GDF-15 (MIC-1, PLAB, PDF, NAG-1)	Miembro distante	Foliculogénesis

\* Proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor de diferenciación del crecimiento (GDF), relacionado al sistema Vg decapentaplégico de *Drosophila* (DVR), relacionado con el producto del gen Vg-1 de *Xenopus laevis* (Vgr-1), proteína morfogenética derivada de cartílago (CDMP): ventrículo derecho con doble salida (DORV), transposición dextrógira de grandes arterias (DTGA), síndrome Klippe-Feil (KFS), microftalmia (MCOP), miostatina (MSTN), citocina inhibidora de macrófagos (MIC), proteína morfogenética ósea placentaria (PLAB), factor derivado de la próstata (PDF), gen activado por antiinflamatorios no esteroideos (NAG), G1 (primera fase, intervalo 1, growth o gap 1), G2 (segunda fase, intervalo 2, growth o gap 2), G0 (fase cero), S (síntesis), M (mitosis). \*\* No se incluyen algunas funciones sobre otros sistemas.

miento óseo, fenómeno que en 1969 se conoció como «competencia osteogénica». Urist mencionó que la osteoinducción estaba asociada con factores relacionados con las fibras de colágena,<sup>1,2,13,14</sup> dándoles el nombre de «proteínas óseas morfogenéticas» en 1971.<sup>15</sup>

Hasta entonces, la actividad biológica de las BMP había sido identificada, pero no aún su naturaleza. Así, en los años 70, se determinó el papel funcional de la matriz ósea desmineralizada purificada sobre la osteogénesis ectópica, concluyendo que portaba morfógenos.<sup>16,17</sup> Por tanto, la osteoinducción se define como el fenómeno por el que las células indiferenciadas pluripotenciales, a través de un estímulo biológico, se diferencian hacia la línea celular formadora de hueso (preosteoblastos), donde las BMP también inducen a las células perivasculares tipo mesenquimales para su cambio desde una vía de desarrollo fibroprogenitora a otra osteoprogenitora.<sup>11,18,19</sup> Reddi<sup>16</sup> pudo observar las capacidades de las BMP para la diferenciación osteoblástica (desarrollo de cartílago y hueso) a partir de fibroblastos. En años sucesivos, el descubrimiento, aislamiento, purificación, caracterización y clonación de las BMP<sup>20-26</sup> permitieron disponer de factores de crecimiento osteoinductivos como morfógenos óseos recombinantes para aplicaciones clínicas.<sup>12,27</sup>

## FUNCIONES

Todas las BMP son importantes en diversas funciones celulares (proliferación, diferenciación, migración y apoptosis), así como también en la morfogénesis, organogénesis, reparación tisular y homeostasis de metabolitos (hierro, calcio y glucosa).<sup>18,19</sup> Regulan la masa muscular<sup>28</sup> y están involucradas en algunas alteraciones de expresión en las neoplasias (benignas y malignas) y metástasis.<sup>29-31</sup> Existen algunos grupos celulares que las producen, como las células osteoprogenitoras, osteoclastos, osteoblastos y condrocitos, pero también las plaquetas.<sup>32,33</sup> Las BMP inducen la diferenciación de células mesenquimales a la línea osteoblástica para mantener la integridad esquelética durante el desarrollo embrionario y los procesos de reparación en tejidos adultos (ejemplo: reparación de fracturas), como son la condrogénesis y la osificación endocondral/intramembranosa.<sup>33-35</sup> Intervienen también en fenómenos de homeostasis ósea (ejemplo: la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos)<sup>36</sup> y en efectos fisiológicos sobre la masa mineral ante estímulos mecánicos y osteoporosis.<sup>37,38</sup>

## SÍNTESIS

Las BMP son sintetizadas dentro de la célula como precursores proteínicos largos e inactivos (prepropéptidos), constituidos por aproximadamente 400 a 500 aminoácidos y tres zonas importantes, un péptido de señal hidrófobo amino-terminal (N-terminal) que dirige a la proteína en la vía de su secreción, un prodominio indispensable para el plegamiento apropiado y un péptido carboxilo-terminal (C-terminal) maduro, que constituye al monómero de proteína ósea morfogenética.<sup>39</sup> También contienen sitios para la unión de carbohidratos con el grupo amino de la asparagina (N-glicosilación) o con el grupo hidroxilo de la serina/treonina (O-glicosilación), lo cual puede incrementar su estabilidad, vida media y paridad con sus respectivos receptores.<sup>40</sup>

Los polipéptidos recién compuestos son transferidos al retículo endoplásmico, donde ocurre la dimerización (prerrequisito para la osteoinducción). Ahí forman heterodímeros (unión de dos monómeros distintos de la subfamilia) u homodímeros (unión de dos monómeros iguales de la subfamilia), para luego seguir hacia el aparato de Golgi, donde la proteína carboxilo-terminal madura es proteolíticamente escindida por endoproteasas de serina en los prodominios, en la secuencia de aminoácidos predeterminada como -Arg-X-X-Arg-.<sup>41,42</sup> Una vez escindido el dímero, los prodominios pueden ser almacenados y el ligando secretado en su forma activa, o bien, permanecer asociados (complejos prodominio-ligando) para ser secretados por la célula y activados a nivel extracelular (*Figura 1*).<sup>43</sup>

## ESTRUCTURA

La proteína activa, mucho más pequeña, ya sea en forma de homodímeros (ejemplo: BMP2/BMP2) o heterodímeros (ejemplo: BMP2/BMP5, BMP2/BMP6, BMP4/BMP7, etcétera), está constituida por alrededor de 50 a 100 aminoácidos, siendo en algunos casos los heterodímeros mucho más potentes que los homodímeros.<sup>44,45</sup> La característica común de los productos activos es que contienen siete residuos de cisteína, de los cuales seis forman una secuencia conservada en los miembros de la superfamilia del TGF-beta. Estos aminoácidos forman tres enlaces intramoleculares de disulfuro conocidos como «nodo de cisteína». Los enlaces disulfuro se disponen en dos pares de puentes disulfuro que forman un anillo a través del cual un tercer puente disulfuro se encuentra roscado. Salvo algunos monómeros activos

que carecen de la séptima cisteína, esta última constituye la unión de dimerización con otro monómero, formando un enlace covalente intermolecular de disulfuro llamado «puente de cisteína» (que constituye la molécula activa).<sup>46</sup>

Para uniformar el estudio de la estructura proteínica molecular cuaternaria (compuesta por hojas beta y hélices alfa) de los monómeros de las BMP, se aludió a la forma y silueta de una mano (de dos o tres dedos), considerando como su centro molecular (la palma) al nodo de cisteína.<sup>47</sup> A partir del nodo emanan cuatro cadenas antiparalelas beta, que forman dos estructuras alargadas llamadas «proyecciones en dedos» (*finger epitopes*). En cambio, la hélice alfa, localizada en la parte opuesta al enlace de cisteína, es perpendicular al eje formado por las cadenas beta (dedos), por lo que la cadena alfa es denominada «muñeca» (*wrist epitope*). Finalmente, por el plegamiento proteínico, dentro de cada epítopo dedo existen zonas cóncavas y convexas, que son denominadas «nudillo» (*nuckle epitope*) (*Figura 2*). Estos sitios o epítulos (muñeca, nudillos y dedos) constituyen zonas específicas funcionales de unión a sus receptores.<sup>48</sup> A las BMP su estructura química les confiere una resistencia y estabilidad intrínsecas que otras proteínas globulares no tienen; esto

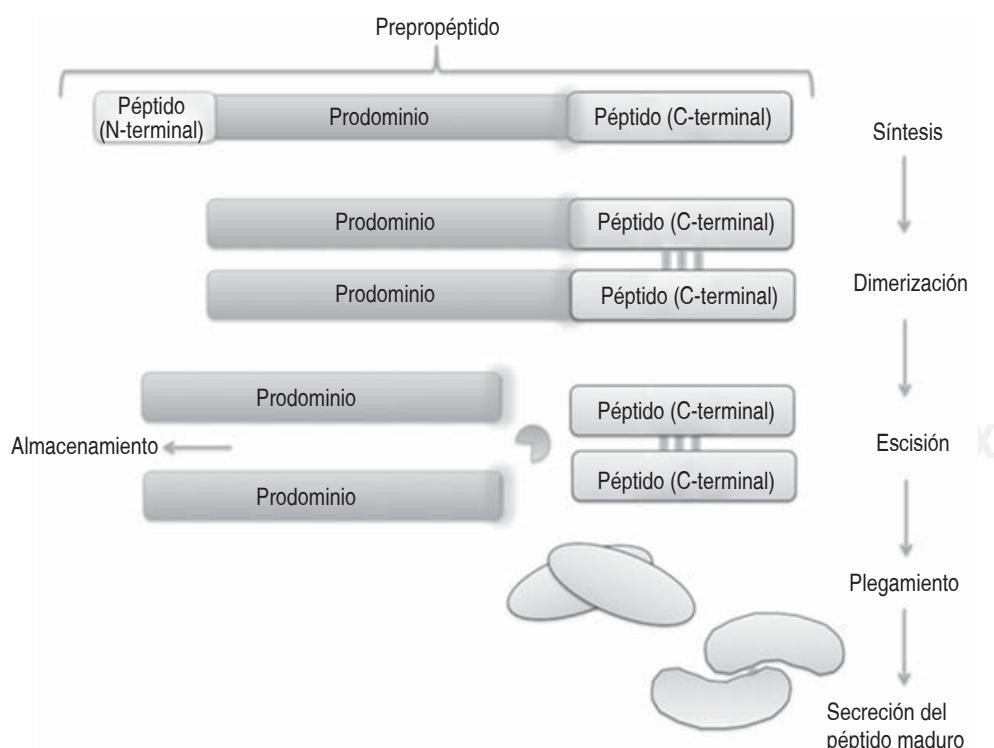
es evidente por su integridad ante la desmineralización ósea con ácido clorhídrico, el uso de agentes caotrópicos (urea), la ultracongelación (-70 °C) de aloinjertos y la liofilización (con vida media de años).<sup>49</sup>

## CLASIFICACIÓN

Se realiza de acuerdo con el parecido estructural entre proteínas, determinada por la secuencia de aminoácidos. Así, hay varios grupos: a) BMP 2/4 (80% de homología), b) BMP 3/3b, c) BMP 5/6/7/8/8b (78% de homología), d) BMP 9/10 (65% de homología), e) BMP 12/13/14, f) BMP-11 y GDF-8, y g) BMP-15 y GDF-9 (*Cuadro I*).<sup>50</sup>

## SEÑALIZACIÓN

La transducción de señal de las BMP tiene diversos puntos de regulación e interacción en la matriz extracelular, la membrana celular, el citoplasma y el núcleo (*Figura 3*).<sup>48</sup> La señalización inicia al unirse a los receptores transmembranales tipo I o tipo II.<sup>51</sup> Para las BMP en los mamíferos se han identificado alrededor de siete receptores tipo I y cinco receptores tipo II, en contraste con la gran cantidad de



ligandos existentes (aproximadamente 25 BMP). Esto refleja una gran variabilidad de unión/afinidad entre ligandos y receptores, que resulta importante para las respuestas pleiotrópicas de las BMP.<sup>52</sup> Estas uniones dependen en gran medida de la afinidad marcada por el tipo de proteína de la superfamilia del TGF- $\beta$  del que se trate (por ejemplo: mayor entre el tipo I y BMP),<sup>53</sup> haciéndolo, además, a través de otras determinantes, como la concentración efectiva del ligando,<sup>52</sup> el acoplamiento con el receptor (por ejemplo, interacción de ectodomios o epítopos),<sup>54</sup> las interacciones de interfaz de unión y modificaciones moleculares de residuos (por ejemplo, por glicosilación),<sup>55</sup> las afinidades moleculares,<sup>56</sup> la acción de los correceptores (por ejemplo, tipo III)<sup>57</sup> e incluso las interacciones moleculares con elementos de la matriz extracelular.<sup>58</sup>

Otros sitios de regulación de señal son a nivel citoplasmático directamente en la cascada de fosforilación de proteínas Smad reguladas por receptores (R-Smad), inhibidoras (I-Smad) y partícipes comunes (Co-Smad) y su degradación por ubiquitina, así como la coactivación y correpresión a nivel nuclear después de la traslocación de complejos Smad por tres mecanismos: 1) reclutamiento de coactivadores y correpresores de unión al ADN, 2) unión directa al ADN, o bien, 3) interacción con proteínas de unión al ADN.<sup>48,51,58,59</sup>

## DE LA INVESTIGACIÓN A LA CLÍNICA

La tecnología recombinante. Aunque los tejidos nativos contienen BMP de forma organizada local (concentradas en la superficie o el centro de las fibras de colágena de la matriz extracelular o en la interfaz entre células y matriz extracelular), la dimensión de la concentración de dichas proteínas almacenadas en los tejidos se encuentra en el rango de uno a 100 nanogramos por gramo de tejido.<sup>60</sup> Por tanto, el cuerpo humano completo no posee más allá de unos pocos microgramos de BMP en su totalidad. Ante esta limitante, una solución mejor a la extracción de aloinjertos óseos procesados es la tecnología recombinante para su producción masiva y depósito en medios transportadores. Por ejemplo, la proteína ósea morfogenética humana recombinante tipo 2 (rhBMP-2, por sus siglas en inglés) es una proteína creada a partir de la expresión genética en clonas de líneas celulares de mamíferos de alta producción proteínica (por ejemplo, células de ovario de hámster chino).<sup>61</sup> Esta tecnología amerita que el ADN que contiene la secuencia que codifica para la BMP-2 sea colocado en un sistema vector (un plásmido) que cuente con secuencias promotoras, un marcador selectivo y sea transferido a la línea celular. Utilizando el marcador selectivo, la secuencia de la BMP-2 es amplificada hasta obtener varias copias del gen re-

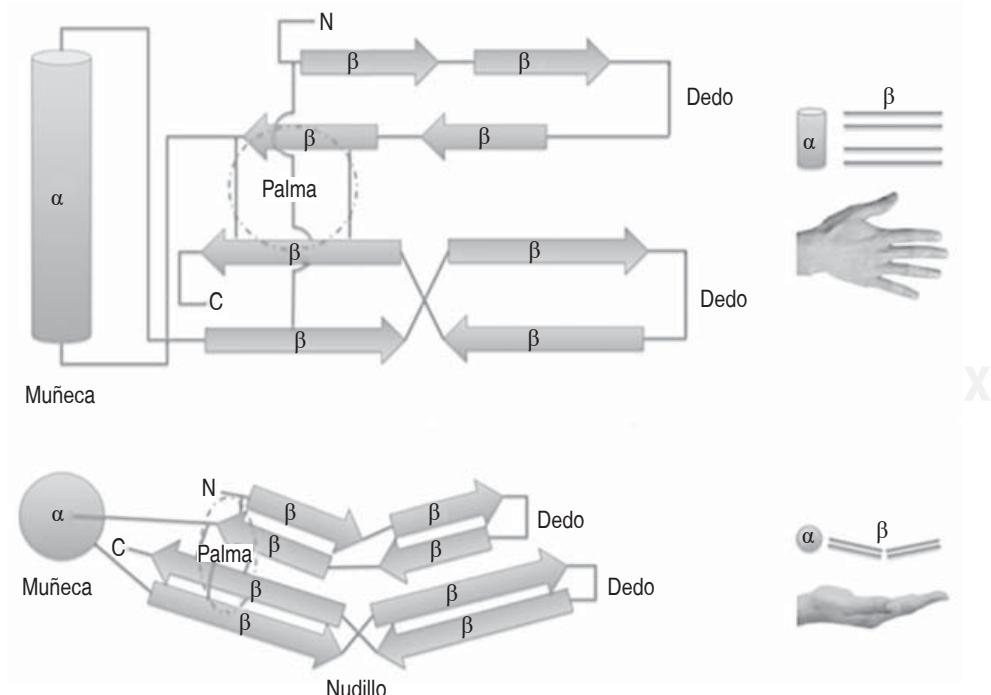


Figura 2.

Representación de la estructura cuaternaria general de un monómero de proteína morfogenética ósea. N: extremo amino-terminal, C: extremo carboxilo terminal,  $\alpha$ : hélice alfa,  $\beta$ : láminas beta y línea discontinua que muestra la zona del nodo de cisteína.

combinante para que residan en un cromosoma de la célula.<sup>62-64</sup> Después de la caracterización proteínica, la línea celular se expande y congela en un banco de células. Durante la producción, una alícuota de la línea celular es descongelada y crecida en un medio de cultivo selectivo (por ejemplo, libre de proteínas, hidrolizados, suero o componentes de origen animal), con volúmenes secuencialmente mayores. Luego, son obtenidos miles de litros del medio en tanques de fermentación. Al final, la BMP-2 es purificada del medio, dimerizada y glucosilada.<sup>61</sup> Con el proceso se han podido favorecer la reproducibilidad del método, la disminución del riesgo biológico patógeno, además de la pureza y actividad biológica de la molécula.<sup>27</sup>

### LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNAS ÓSEAS MORFOGENÉTICAS

Son una fracción proteínica altamente purificada de hueso bovino que contiene una mezcla de varias proteínas (BMP-2-3-4-5-6-7, TGF- $\beta$  1/2/3 y factor de crecimiento de fibroblastos) y otras proteínas no colágenas. El producto final está compuesto por dicha fracción, en combinación con colágeno tipo I de tendones bovinos (en una relación de proteína 1.5 mg/45 mg de peso seco), pudiendo contener matriz ósea desmineralizada, que es reconstituida con solución

fisiológica estéril. La obtención del extracto mantiene el proceso para la diáfisis de bovino (limpieza, pulverización, desmineralización, lavado, extracción y purificación).<sup>65</sup>

La colágena, a pesar de tener pobres propiedades biomecánicas y baja afinidad por las proteínas, es usada como medio de transporte de BMP debido a que tiene alta biocompatibilidad, alta biodegradación y baja inmunogenicidad.<sup>66</sup> Por tanto, la producción en escala industrial de las BMP no es la única solución al problema de concentración de factores de crecimiento en el sitio quirúrgico; también lo son el medio de transporte, su liberación *in situ* y la permanencia de sus actividades biológicas. Esto es evidente al encontrar en diversos estudios gran variabilidad de las dosis efectivas para lograr la osteoinducción, lo que indica que las cantidades para las aplicaciones clínicas deben aumentar su concentración local en más de  $10^6$  del valor fisiológico.<sup>67-69</sup> Se ha encontrado, además, que la concentración sanguínea después de su aplicación local es de tan sólo 0.1% de la dosis utilizada, con una dispersión sistémica rápida y un registro de vida media en rango de minutos. Ante todo esto, se han buscado sistemas liberadores que aumenten la concentración y presencia locales de las BMP.<sup>70</sup> En general, los sistemas deben permitir la osteogénesis, la infiltración por células mesenquimales y vasos san-

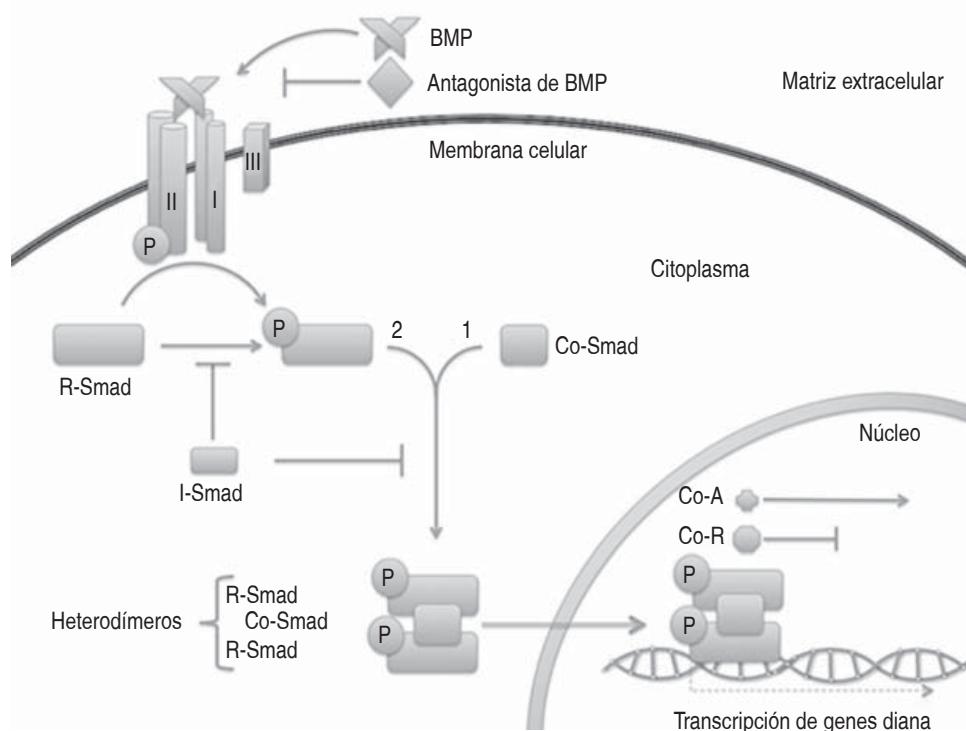


Figura 3.

Esquema sobre la transducción de señal por proteínas morfogenéticas óseas. Nótese, de arriba hacia abajo: membrana (unión de BMP a receptor I y II), citoplasma (activación de vía Smad y formación de heterodímeros (2 R-Smad + 1 Co-Smad) y núcleo (traslocación de complejos y afectación de transcripción genética). Nótese que los sitios de regulación son: en matriz extracelular (antagonista de BMP), en membrana celular (correceptor III), en citoplasma (Smad inhibidoras o I-Smad) y en el núcleo (coactivadores [Co-A] y corepresores [Co-R]).

guíneos y la liberación controlada de factores en fase tardía para evitar proteasas.<sup>71,72</sup> La concentración/ liberación de los transportadores ha mejorado con la modificación estructural de las BMP en sus dominios de unión a la matriz, o bien potenciando su actividad biológica al usar péptidos biomiméticos relacionados a la osteoinducción.<sup>69</sup> Además, existen otras tecnologías de producción de proteínas recombinantes, como el uso de levaduras (*Pichia pastoris*), bacterias (*Escherichia coli*) y virus (*Baculovirus*).<sup>72-75</sup>

## APLICACIONES CLÍNICAS

El ensayo *BMP-2 evaluation in surgery for tibial trauma* (BESTT, por sus siglas en inglés) en 2002,<sup>67</sup> y de manera subsecuente en 2006,<sup>76</sup> reportó que los adultos con fracturas expuestas tibiales tratados con 1.5 mg/kg de rhBMP-2 tuvieron menores fallas de material de osteosíntesis, menor índice de infecciones y una rápida recuperación en comparación con el grupo control, lo que llevó a su aprobación en Europa en julio de 2002. Cuatro meses después, la FDA de Estados Unidos aprobó su uso en combinación con esponjas reabsorbibles de colágena bovina tipo I para el mismo espectro de pacientes. En 2008, la misma FDA autorizó el uso de la rhBMP-2 en cirugía de artrodesis de columna en enfermedad discal degenerativa, en forma de cilindros de titanio llenos de proteína/collágeno. En la actualidad, está aceptado por la FDA el uso de rhBMP-2 y rhBMP-7 para la artrodesis intercorpórea lumbar y los defectos en huesos largos (fracturas abiertas de tibia y pseudoartrosis), respectivamente, destacando como implante en cirugías posterolaterales lumbares y uniones óseas recalcitrantes de huesos largos. La rhBMP-7 también se ha empleado en el tratamiento de la osteonecrosis postraumática de la cabeza femoral en conjunto con la descompresión nuclear, la osteotomía, los injertos óseos vascularizados y no vascularizados.<sup>77,78</sup> A continuación se mencionan las proteínas óseas morfogenéticas para uso en humanos, con su año de aprobación: fusión de columna vertebral lumbar (InFUSE™/2002/Estados Unidos), fracturas tibiales (InductOs™/2002/Unión Europea), pseudoartrosis de tibia (InductOs™/2001/Estados Unidos y Unión Europea), fracturas expuestas de tibia (InFUSE™ + Colágeno/2004/Estados Unidos) y fusión posterolateral lumbar en adultos con espondilolistesis (Opgenra™/2009/Unión Europea).<sup>79</sup> Todas las proteínas aprobadas son adyuvantes de osteosíntesis y no deben usarse fuera de las indicaciones mencionadas.

Ya se han intentado establecer dosis seguras y efectivas de rhBMP-2 en ortopedia (por ejemplo, fusión por nivel vertebral con 2.38 mg/mL y en fracturas expuestas de tibia con 1.50 mg/mL).<sup>67,80</sup> Sin embargo, existen aún varios efectos adversos que han marcado sus principales contraindicaciones. Entre ellos, el edema local y la generación de seromas,<sup>81,82</sup> la obliteración articular por hipertrofia de cartílago que culmina en osteoartritis,<sup>83</sup> el incremento en el riesgo de padecer cáncer<sup>84</sup> con el uso de dosis altas (40 mg/mL) o problemas locales en cirugía de columna cervical (por ejemplo, disfagia con edema de cuello y obstrucción grave de la vía aérea) y de columna lumbar (por ejemplo, eyaculación retrógrada).<sup>85</sup> Otras limitantes son la cuantificación exacta de la dosis de proteína para la osteoinducción, las respuestas variables asociadas con la edad del paciente, los tipos de proteínas empleadas, la efectividad de los sistemas liberadores y, por supuesto, su alto costo.<sup>85</sup> Entender mejor su estructura molecular y su relación con los efectos pleiotrópicos, junto con el desarrollo de métodos de producción y liberación más efectivos, lograrán que los estudios controlados comparen y sustenten su uso clínico seguro y de rutina en otros contextos clínicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Urist MR, Silverman BF, Büring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. Clin Orthop Relat Res. 1967; 53: 243-283.
2. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science. 1965; 150 (3698): 893-899.
3. Peterson B, Whang PG, Iglesias R, Wang JC, Lieberman JR. Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model. J Bone Joint Surg Am. 2004; 86-A (10): 2243-2250.
4. Edwards JT, Diegmann MH, Scarborough NL. Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model. Clin Orthop Relat Res. 1998; (357): 219-228.
5. Katz J, Diegl EC, Nataraj C. Time course of DBM-induced intermuscular endochondral ossification. Orthopedic Research Society Meeting (2006) abs.912.
6. Bostrom MP, Seigerman DA. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. HSS J. 2005; 1 (1): 9-18.
7. Kanakaris NK, Giannoudis PV. Clinical applications of bone morphogenetic proteins: current evidence. J Surg Orthop Adv. 2008; 17 (3): 133-146.
8. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. Adv Drug Deliv Rev. 2012; 64 (12): 1063-1077.
9. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2013; 2 (1): 47-63.
10. Santibáñez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. Clin Sci (Lond). 2011; 121 (6): 233-251.

11. Urist MR. Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J Bone Miner Res.* 1997; 12 (3): 343-346.
12. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science.* 1996; 271 (5247): 360-362.
13. Urist MR, Hay PH, Dubuc F, Buring K. Osteogenetic competence. *Clin Orthop Relat Res.* 1969; 64: 194-220.
14. Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973; 70 (12): 3511-3515.
15. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1971; 50 (6): 1392-1406.
16. Reddi AH, Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972; 69 (6): 1601-1605.
17. Reddi AH, Anderson WA. Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. *J Cell Biol.* 1976; 69 (3): 557-572.
18. Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng.* 2000; 6 (4): 351-359.
19. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001; 10 Suppl 2: S96-S101.
20. Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84 (20): 7109-7113.
21. Jennings JC, Mohan S, Baylink DJ. Purification of bovine skeletal growth factor. *Methods Enzymol.* 1987; 146: 281-294.
22. Urist MR, Chang JJ, Lietze A, Huo YK, Brownell AG, DeLange RJ. Preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide fragments. *Methods Enzymol.* 1987; 146: 294-312.
23. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsch LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988; 242 (4885): 1528-1534.
24. 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 U S A.* 1988; 85 (24): 9484-9488.
25. 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 U S A.* 1990; 87 (6): 2220-2224.
26. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; 8 (1): 11-20.
27. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002; 27 (16 Suppl 1): S2-S8.
28. Sartori R, Sandri M. Bone and morphogenetic protein signalling and muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015; 18 (3): 215-220.
29. Kelleher FC, Fennelly D, Rafferty M. Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta Oncol.* 2006; 45 (4): 375-388.
30. Alarmino EL, Kallioniemi A. Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumourigenesis? *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17 (2): R123-R139.
31. Hardwick JC, Kodach LL, Offerhaus GJ, van den Brink GR. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8 (10): 806-812.
32. Sipe JB, Zhang J, Waits C, Skikne B, Garimella R, Anderson HC. Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. *Bone.* 2004; 35 (6): 1316-1322.
33. Garimella R, Tague SE, Zhang J, Belibi F, Nahar N, Sun BH et al. Expression and synthesis of bone morphogenetic proteins by osteoclasts: a possible path to anabolic bone remodeling. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56 (6): 569-577.
34. Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, Kakiuchi M, Kimura T, Ochi T et al. Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res.* 2002; 17 (5): 898-906.
35. Lieberman JR, Daluisi A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84-A (6): 1032-1044.
36. Sánchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, Ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone.* 2015; 80: 43-59.
37. Kopf J, Paarmann P, Hiepen C, Horbelt D, Knaus P. BMP growth factor signaling in a biomechanical context. *Biofactors.* 2014; 40 (2): 171-187.
38. Nomura S, Takano-Yamamoto T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol.* 2000; 19 (2): 91-96.
39. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20 (5-6): 343-355.
40. Lowery JW, Amich JM, Andonian A, Rosen V. N-linked glycosylation of the bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2) enhances ligand binding. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71 (16): 3165-3172.
41. Constat DB, Robertson EJ. Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol.* 1999; 144 (1): 139-149.
42. Nelsen SM, Christian JL. Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6, and PC7. *J Biol Chem.* 2009; 284 (40): 27157-27166.
43. Harrison CA, Al-Musawi SL, Walton KL. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- $\beta$  superfamily ligands. *Growth Factors.* 2011; 29 (5): 174-186.
44. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA et al. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factors.* 1996; 13 (3-4): 291-300.
45. Valera E, Isaacs MJ, Kawakami Y, Izpisúa Belmonte JC, Choe S. BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2010; 5 (6): e11167.
46. Yang J, Shi P, Tu M, Wang Y, Liu M, Fan F et al. Bone morphogenetic proteins: relations between molecular structure and their osteogenic activity. *Food Sci Hum Well* 2014; 3 (3-4): 127-135.
47. Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol.* 1999; 287 (1): 103-115.
48. Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF- $\beta$ /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.* 2015; 3: 15005.
49. Board TN, Rooney P, Kay PR. Strain imparted during impaction grafting may contribute to bony incorporation: an *in vitro* study of the release of bmp-7 from allograft. *J Bone Joint Surg Br.* 2008; 90 (6): 821-824.
50. Guo J, Wu G. The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012; 23 (1-2): 61-67.
51. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol.* 2016; 12 (4): 203-221.

52. Heinecke K, Seher A, Schmitz W, Mueller TD, Sebald W, Nickel J. Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. *BMC Biol.* 2009; 7: 59.
53. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells.* 2002; 7 (12): 1191-1204.
54. Groppe J, Hinck CS, Samavarchi-Tehrani P, Zubieta C, Schuermann JP, Taylor AB et al. Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell.* 2008; 29 (2): 157-168.
55. Radaev S, Zou Z, Huang T, Lafer EM, Hinck AP, Sun PD. Ternary complex of transforming growth factor-beta1 reveals isoform-specific ligand recognition and receptor recruitment in the superfamily. *J Biol Chem.* 2010; 285 (19): 14806-14814.
56. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003; 113 (6): 685-700.
57. Blair CR, Stone JB, Wells RG. The type III TGF- $\beta$  receptor betaglycan transmembrane-cytoplasmic domain fragment is stable after ectodomain cleavage and is a substrate of the intramembrane protease  $\gamma$ -secretase. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813 (2): 332-339.
58. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 2002; 296 (5573): 1646-1647.
59. Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000; 11 (1-2): 15-22.
60. Mollenhauer JA, Jandt KD, Hortschank P. Ceramics in Orthopedics. Session 8.3. Application of bone morphogenetic proteins on solid implants. En: Belazzo F, Falez F, Dietrich M. 11th BIOLOX Symposium Rome, June 30-July 1, 2006 Proceedings. *Bioceramics and Alternative Bearings in Joint Arthroplasty.* Springer; 2006. pp. 277-282.
61. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors.* 1992; 7 (2): 139-150.
62. Kaufman RJ. Selection and coamplification of heterologous genes in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 1990; 185: 537-566.
63. Kaufman RJ, Wasley LC, Spiliotes AJ, Gossels SD, Latt SA, Larsen GR et al. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol.* 1985; 5 (7): 1750-1759.
64. Tanaka H, Tapscott SJ, Trask BJ, Yao MC. Short inverted repeats initiate gene amplification through the formation of a large DNA palindrome in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99 (13): 8772-8777.
65. Damien CJ, Grob D, Boden SD, Benedict JJ. Purified bovine BMP extract and collagen for spine arthrodesis: preclinical safety and efficacy. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002; 27 (16 Suppl 1): S50-S58.
66. Friess W. Collagen—biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998; 45 (2): 113-136.
67. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84-A (12): 2123-2134.
68. Valentin-Opran A, Wozney J, Csimma C, Lilly L, Riedel GE. Clinical evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; (395): 110-120.
69. Arrabal PM, Visser R, Santos-Ruiz L, Becerra J, Cifuentes M. Osteogenic molecules for clinical applications: improving the BMP-collagen system. *Biol Res.* 2013; 46 (4): 421-429.
70. Uludag H, Gao T, Porter TJ, Friess W, Wozney JM. Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. *J Bone Joint Surg Am.* 2001; 83-A Suppl 1 (Pt 2): S128-S135.
71. Peel SA, Hu ZM, Clokie CM. In search of the ideal bone morphogenetic protein delivery system: *in vitro* studies on demineralized bone matrix, purified, and recombinant bone morphogenetic protein. *J Craniofac Surg.* 2003; 14 (3): 284-291.
72. Brondyk WH. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods Enzymol.* 2009; 463: 131-147.
73. Bessa PC, Cerqueira MT, Rada T, Gomes ME, Neves NM, Nobre A et al. Expression, purification and osteogenic bioactivity of recombinant human BMP-4, -9, -10, -11 and -14. *Protein Expr Purif.* 2009; 63 (2): 89-94.
74. Sharapova NE, Kotnova AP, Galushkina ZM, Lavrova NV, Poletaeva NN, Tukhvatulin AE et al. Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli* and testing of its biological activity *in vitro* and *in vivo*. *Mol Biol (Mosk).* 2010; 44 (6): 1036-1044.
75. Maruoka Y, Oida S, Iimura T, Takeda K, Asahina I, Enomoto S et al. Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system. *Biochem Mol Biol Int.* 1995; 35 (5): 957-963.
76. Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88 (6): 1258-1265.
77. Mont MA, Etienne G, Ragland PS. Outcome of nonvascularized bone grafting for osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Relat Res.* 2003; (417): 84-92.
78. Seyler TM, Marker DR, Ulrich SD, Fatscher T, Mont MA. Nonvascularized bone grafting defers joint arthroplasty in hip osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2008; 466 (5): 1125-1132.
79. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat Biotechnol.* 2014; 32 (10): 992-1000.
80. Hamilton DK, Smith JS, Reames DL, Williams BJ, Shaffrey CI. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as an adjunct for instrumented posterior arthrodesis in the occipital cervical region: An analysis of safety, efficacy, and dosing. *J Craniovertebr Junction Spine.* 2010; 1 (2): 107-112.
81. Wiwanitkit V. The concern on clinical use of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniovertebr Junction Spine.* 2011; 2 (2): 102-103.
82. Taghavi CE, Lee KB, He W, Keorochana G, Murray SS, Brochmann EJ et al. Bone morphogenetic protein binding peptide mechanism and enhancement of osteogenic protein-1 induced bone healing. *Spine (Phila Pa 1976).* 2010; 35 (23): 2049-2056.
83. Yeh TT, Wu SS, Lee CH, Wen ZH, Lee HS, Yang Z et al. The short-term therapeutic effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on collagenase-induced lumbar facet joint osteoarthritis in rats. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007; 15 (12): 1357-1366.
84. Carragee EJ, Chu G, Rohatgi R, Hurwitz EL, Weiner BK, Yoon ST et al. Cancer risk after use of recombinant bone morphogenetic protein-2 for spinal arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am.* 2013; 95 (17): 1537-1545.
85. Fu R, Selph S, McDonagh M, Peterson K, Tiwari A, Chou R et al. Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2013; 158 (12): 890-902.