

**ANÁLISIS CRÍTICO DEL USO DE PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO  
PARA LA REGENERACIÓN OSEA EN EL TRATAMIENTO DE FRACTURAS**

**MIGUEL ROBERTO MARTÍNEZ FRAGOZO**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
SANTIAGO DE CALI  
2017**

**ANÁLISIS CRÍTICO DEL USO DE PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO  
PARA LA REGENERACIÓN OSEA EN EL TRATAMIENTO DE FRACTURAS**

**MIGUEL ROBERTO MARTÍNEZ FRAGOZO**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA**

**DIEGO FERNANDO MEJÍA CARMONA, DSc**

**SANTIAGO DE CALI**

**2017**

**FIRMAS AVAL DEL CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO DE GRADO II**

**Firma Aval del Asesor:**

---

Diego Fernando Mejía Carmona, DSc

**Firma del estudiante:**

---

Miguel Roberto Martínez Fragozo

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas, que sin las cuales no se habría podido lograr el desarrollo de esta monografía:

A mi Dios que sin su acompañamiento no habría logrado vislumbrar y entender con claridad cada una de las etapas que fuimos superando durante este viaje tan espléndido.

Al profesor Diego Fernando Mejía por su dedicación, gran esfuerzo e inagotable ánimo durante el desarrollo y dirección del presente trabajo.

A mi familia por el acompañamiento, comprensión y apoyo fundamental en todo momento para alcanzar este logro.

## Tabla de contenido

<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>II</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VI</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Objetivos .....</b>	<b>3</b>
1.1 Objetivo General.....	3
1.2 Objetivos Específicos .....	3
1.2.1 Revisión del mecanismo molecular por medio del cual los factores de crecimiento transformantes tipo $\beta$ estimulan la regeneración ósea.....	3
1.2.2 Revisión del proceso de generación y producción de las BMPs mediante ingeniería genética y biotecnología.....	3
1.2.3 Revisión de casos exitosos en el uso de las BMPs como tratamiento de elección.....	3
1.2.4 Revisión de aspectos no deseables en el uso de las BMPs como tratamiento de elección...	3
1.2.5 Realizar un balance entre pros y contras del tratamiento con BMPs. ....	3
<b>2 Metodología Utilizada .....</b>	<b>4</b>
<b>3 Regeneración Ósea .....</b>	<b>5</b>
<b>4 Tejido Óseo .....</b>	<b>7</b>
4.1 Morfología del hueso.....	8
4.2 Histología del hueso .....	10
4.2.1 <i>Osteoblastos</i> .....	11
4.2.2 <i>Osteocitos</i> .....	12
4.2.3 <i>Osteoclastos</i> .....	12
4.3 Remodelación, Fractura y Regeneración Ósea.....	13
<b>5 Ingeniería de Tejidos y principales Terapias de Regeneración de Tejidos .....</b>	<b>16</b>
5.1 Ingeniería y Regeneración del Tejido Óseo: Células Madre .....	16

5.2	Ingeniería y Regeneración del Tejido Óseo: Factores de Crecimiento .....	18
<b>6</b>	<b>Proteínas Morfogenéticas de Hueso.....</b>	<b>20</b>
6.1	Estructura de las BMPs.....	22
6.2	Mecanismos de Señalización de BMP.....	24
6.2.1	Receptores .....	24
6.2.2	Rutas de señalización Smad o Canónica y Ruta de señalización Smad independiente .....	25
6.2.3	Regulación de la señalización de BMP .....	27
<b>7</b>	<b>Producción Biotecnológica de BMPs .....</b>	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>Aplicaciones clínicas de las BMPs (Aspectos deseables y no deseables como tratamiento de elección).....</b>	<b>33</b>
8.1	Análisis estudios comparativos BPM en procedimientos quirúrgicos .....	35
<b>9</b>	<b>BMPs, análisis, discusión y perspectivas a futuro .....</b>	<b>40</b>
	<b>Conclusiones .....</b>	<b>42</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Proteínas de la matriz orgánica. ....	111
Tabla 2 Clasificación de las BMPs. ....	21
Tabla 3 Aplicación de BMP en la reparación de fracturas, estudios clínicos .....	355

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Proceso de regeneración, remodelación y reparación ósea.....	6
Figura 2 Integración del tejido óseo en la homeostasis mineral y energética.....	8
Figura 3 Estructura lamelar de hueso cortical y esponjoso.....	10
Figura 4 Distintos tipos de células óseas y su interacción..	13
Figura 5 Proceso de regeneración ósea..	14
Figura 6 Fases en la regeneración de una fractura ósea. ....	15
Figura 7 Crecimiento de publicaciones y citas relevantes para la investigación con células madre.. .....	17
Figura 8 Tendencias de publicaciones sobre artículos de células madre. ....	18
Figura 9 Estructura terciaria de BMP-2. ....	23
Figura 10 Organización estructural BMPs.....	24
Figura 11 BMP vías de señalización, representación de las vías Smad-dependientes e independientes y sus mecanismos de regulación..	26

Figura 12 Potenciadores e inhibidores de la señalización de proteínas morfogénicas óseas (BMP).....27

## ABREVIATURAS

ALK	Receptor Tipo Activin Quinasa
ActRII	Receptor de la Activina Tipo II
ALP	Fosfatasa Alcalina
BMPs	Proteínas Morfogenéticas de Hueso
BMU	Unidades Básicas Multicelulares
CHO	Células Derivadas de Ovario de Hámster Chino
<i>COS7</i>	Células de tipo fibroblasto derivadas de tejido de riñón de mono
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ESC	Células Madre Embriónicas
FGF23	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 23
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
GDF	Factores de Crecimiento y Diferenciación
GDNFs	Factores de Crecimiento y Diferenciación
GM-CFU	Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
IGF	Factor de Crecimiento Análogo de Insulina
JNK	Proteínas Quinasas C-Jun N-terminal
MAD	Mothers Against Decantaplegic
MAPK	Proteínas Quinasas activadas por Mitógenos
MIS	Sustancia Inhibidora Muleriana
MSC	Células Madre Mesenquimales
NFκB	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
OPG	Osteoprotegerina
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PKA	Proteína Quinasa A
PKC	Proteína Quinasa C
<i>P. Pastoris</i>	<i>Pichia Pastoris</i>
RANK	Receptor Activador para el Factor Nuclear κ-B

RANKL	Ligando de Receptor Activador para el Factor Nuclear $\kappa$ -B
rhBMP-2	Proteína Morfogenética Ósea 2 Recombinante Humana
rhBMP-7	Proteína Morfogenética Ósea 7 Recombinante Humana
SMA	Gen <i>Sma</i>
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante Tipo $\beta$
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
WHO	Organización Mundial de la Salud

## RESUMEN

Las enfermedades, los accidentes, el envejecimiento de la población y el alto número de problemas que resultan a nivel óseo en esta etapa, las principales causas de lesiones y el enorme impacto en la economía, están representadas por la osteonecrosis, traumas diversos y distintos tipos de tumores lo cual conduce a que el desarrollo de técnicas de mejoramiento del sistema óseo sea de extrema importancia. Es por esto que la búsqueda del estímulo de la regeneración ósea en los pacientes, resulta un blanco atractivo para la investigación y diseño de alternativas de tratamiento de lesiones en el tejido óseo, por lo cual existe la necesidad del desarrollo de alternativas o complementos.

Dentro de estas alternativas se encuentran las Proteínas Morfogenéticas de Hueso, potentes inductores capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares y a través de diversas rutas de señalización promueven y/o previenen la adhesión celular, proliferación, migración y diferenciación, regulando positiva o negativamente la formación del hueso y el cartílago. El hallazgo de estos importantes elementos que como lo dicho no solo participan en el proceso de regeneración ósea, nos brinda la posibilidad de establecer nuevas dianas terapéuticas sin alterar su multifuncionalidad, aunque su uso es todavía muy controversial durante el proceso de regeneración de tejido óseo a pesar de la evidencia en estudios animales y preclínicos, los resultados en términos de eficacia ponen en tela de juicio los resultados para el tratamiento.

Aunque si bien se ha podido conocer las ventajas y desventajas acerca de las BMP a través de estudios *in vivo* e *in vitro* en modelos animales, se necesita más investigación, preclínica y clínica, en humanos que permitan tener información veraz y convincente sobre dosis, tiempo de tratamiento, dinámica de entrega y liberación en el sitio afectado y portadores o sistemas de administración idóneos para tal fin antes de sacar conclusiones definitivas. El presente trabajo, ha buscado ofrecer una visión completa del uso de las BMPs de su actividad en la regeneración ósea, su producción biotecnológica, su uso clínico y los posibles pros y contras de su uso.

## **Introducción**

El envejecimiento de la población y el alto número de problemas que resultan a nivel óseo en esta etapa, llevan a que el desarrollo de técnicas de mejoramiento del sistema óseo, sea de extrema importancia. Las principales causas de lesiones en el tejido óseo y el enorme impacto en la economía, están representadas por la osteonecrosis, traumas diversos y distintos tipos de tumores. En el año 2000, solo en Europa se estimó en 4 millones el número de fracturas nuevas, lo que representó casi unos 32 millones de euros al sistema de salud y en aumento creciente para el año 2050 que se proyecta hasta los 77 millones de euros(1). En los Estados Unidos el costo total por año es de aproximadamente 15 millones de dólares por frecuentes ingresos e intervenciones hospitalarias por fallas en el procedimiento inicial(2). El daño músculo-esquelético, que incluye las fracturas óseas, es la causa más común de incapacidad física y dolor severo de largo plazo, y afecta a millones de personas en el mundo entero(3).

De acuerdo con el informe presentado por la Organización Mundial de la Salud, (WHO como lo indica su nombre en inglés), los traumas producidos por accidentes de tránsito, imponen una pesada carga a la economía nacional y a las familias(4). La inmovilización y cirugía (de ser necesaria), son los tratamientos convencionales en los casos de fractura ósea. Sin embargo, la búsqueda de tratamientos continúa, debido a factores como problemas derivados de infecciones y hematomas en el sitio donante, y los tiempos de recuperación, entre otros. Los avances conocidos en la medicina regenerativa, junto con las metodologías ofrecidas por la biología celular y molecular, la nanotecnología y la biotecnología, ofrecen alternativas de solución revolucionarias y razonablemente novedosas para patologías que antes se consideraban intratables(5,6). Por ello, la búsqueda del estímulo de la regeneración ósea en los pacientes, resulta un blanco atractivo para la investigación y diseño de alternativas de tratamiento de lesiones en el tejido óseo.

Además, en la actualidad no hay sustitutos óseos heterólogos o sintéticos disponibles que tengan propiedades biológicas o mecánicas superiores o razonablemente similares a las del tejido óseo natural. Por lo tanto, está dada la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos

como alternativas o complementos a los métodos estándar utilizados para la regeneración ósea, en un esfuerzo por superar las limitaciones actuales, lo que ha sido una meta durante varias décadas(7).

Con un mejor entendimiento acerca de la cicatrización de fracturas y la regeneración ósea a nivel molecular, se han identificado algunas moléculas clave encargadas de regular este complejo proceso fisiológico, que ya están en uso clínico o en investigación para mejorar la reparación ósea(5). De estas moléculas, las Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs como lo indica su nombre en inglés) han sido las más ampliamente estudiadas, ya que son potentes inductores en el proceso de formación y regeneración ósea(7).

Estas proteínas son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares y a través de diversas rutas de señalización promueven y/o previenen la adhesión celular, proliferación, migración y diferenciación, regulando positiva o negativamente la formación del hueso y el cartílago. Desde el descubrimiento de las BMPs, se han realizado una serie de ensayos clínicos y experimentales que aportan información positiva sobre la seguridad y la eficacia de su uso como sustitutos de injerto para la regeneración ósea, así como también se han realizado ensayos extensos de formulaciones ideales para la entrega de estas proteínas(8,9). No obstante, existen aún ciertos inconvenientes y limitaciones asociados al uso y disponibilidad debido a varios inconvenientes, como su rápida degradación, altos costos, necesidad de altas dosis, osteólisis, formación ectópica de hueso e inflamación, e incluso hay algunos polémicos informes sobre su rentabilidad y eficacia(6).

El propósito de esta revisión es presentar un panorama concreto sobre las BMPs, como alternativa al tradicional injerto óseo, gracias a su gran potencial en la iniciación y promoción de la osteogénesis y su aplicación en los procesos regenerativos.

# **1 Objetivos**

## **1.1 Objetivo General**

Revisar de manera crítica el uso de BMPs en el tratamiento de fracturas óseas desde una perspectiva biotecnológica.

## **1.2 Objetivos Específicos**

- 1.2.1** Revisión del mecanismo molecular por medio del cual los factores de crecimiento transformantes tipo  $\beta$  estimulan la regeneración ósea.
- 1.2.2** Revisión del proceso de generación y producción de las BMPs mediante ingeniería genética y biotecnología.
- 1.2.3** Revisión de casos exitosos en el uso de las BMPs como tratamiento de elección.
- 1.2.4** Revisión de aspectos no deseables en el uso de las BMPs como tratamiento de elección.
- 1.2.5** Realizar un balance entre pros y contras del tratamiento con BMPs.

## 2 Metodología Utilizada

Por medio de la metodología exploratoria se analizaron múltiples artículos científicos especializados, entrevistas, comparación de los enfoques utilizados, para de forma narrativa y descriptiva, presentar un escrito con la información existente acerca del tema seleccionado, y de paso, presentar una posición crítica al respecto. Para la recopilación de dicha información, se usaron los principales bancos de datos electrónicos, PubMedline (National Library of Medicine database), que recogen los artículos y revistas de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, y el banco electrónico europeo, EMBASE (The bibliographic database for biomedical and pharmacological information). En aspecto general, se consultaron numerosas revisiones bibliográficas (Libros especializados, monografías) para el complemento del marco teórico y el análisis crítico.

El idioma para la búsqueda de la información fué el inglés, a partir de lo cual se realizó una lectura detallada de los resultados brindados, para obtener una mejor información y desarrollar así la monografía. Las palabras claves a ser utilizadas fueron: BMP, bone, regeneration, tissue engineering, fracture healing, Transforming Growth Factor. Los criterios de inclusión son: artículos publicados desde el año 2000 a 2018 (algunos artículos están disponibles, aunque se publicarán en papel, en ese año), estudios comparativos tratamiento estándar vs tratamiento con BMP, pacientes mayores de 18 años y grupos mayores de 20 pacientes, período de seguimiento del estudio por lo menos de 6 meses, y pruebas controladas aleatorizadas. Se leyó detalladamente cada uno de los artículos para obtener una información completa que nos condujera al alcance de los objetivos de este trabajo.

Para tales efectos se describió como propuesta general la temática usada para alcanzar los objetivos trazados:

- Tejido Óseo (Composición, Formación)
- Homeostasis Ósea (Remodelación ósea, Fractura y regeneración ósea)
- Ingeniería del tejido óseo (BMPs, estructura, mecanismos de señalización, aplicaciones)
- Producción biotecnológica de BMPs
- BMPs, aplicaciones clínicas

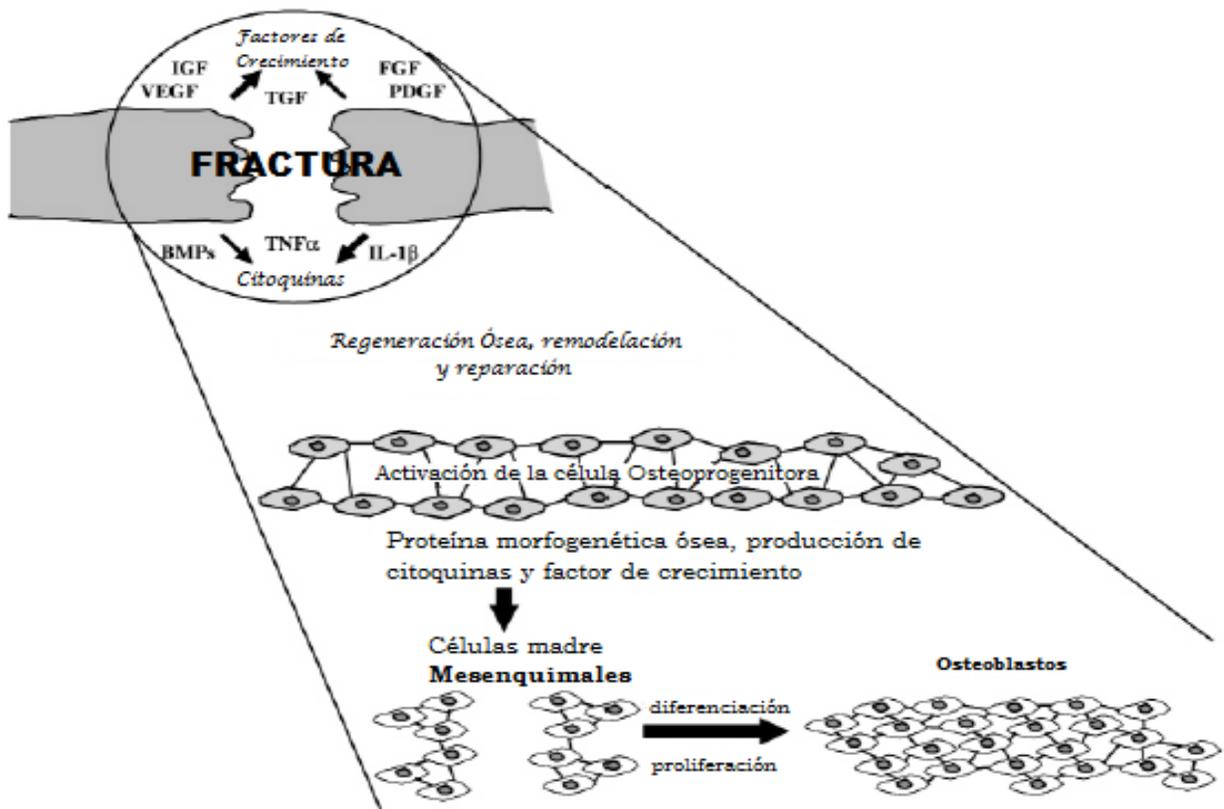
### 3 Regeneración Ósea

Uno de los más grandes desafíos con el que debe luchar a diario la cirugía traumatólogica, es la reconstrucción de lesiones óseas, en las que las posibilidades de tratamiento pueden ser muy limitadas dependiendo del sitio y grado de lesión. Cuando una lesión provoca daño tisular en el organismo, éste puede experimentar tres situaciones distintas; un proceso de necrosis que causa la pérdida del mismo, uno de reparación, donde se logra la restauración de dicho tejido, pero no se conserva su estructura y función original, o uno de regeneración, donde se puede originar tejido nuevo que posee todas las propiedades del tejido inicial, este último es el objetivo terapéutico(10).

Los métodos tradicionales de reparación de fracturas que fueron desarrollados en el siglo pasado, proporcionaron resultados confiables con respecto a la unión de la fractura y a la recuperación funcional. En estos casos, y con el ánimo de estimular y acelerar el proceso de regeneración ósea, se han desarrollado diversos métodos innovadores que se pueden emplear solos o combinados entre sí, con el potencial necesario para aumentar la tasa de cicatrización y obtener hueso regenerado. Otros beneficios incluyen un retorno temprano a las actividades funcionales, estancias hospitalarias más cortas y disminución de la incidencia de falta de unión ósea. Entre estos métodos, se encuentran: osteogénesis por distracción (cirugía reconstructiva, que consigue la expansión esquelética, así como de las partes blandas circundantes) y el transporte óseo(11), y el uso de diferentes métodos de injerto óseo, tales como autólogos, aloinjertos e injertos óseos y/o factores de crecimiento(8).

Cuando el tejido óseo ha sufrido daño en su estructura, presenta una excelente capacidad de regenerarse, lo que permite que los huesos puedan tomar formas, tamaños y dureza como su forma pre-lesionada. El tejido lesionado presenta básicamente tres alternativas para lograr su recuperación: sufrir un proceso de necrosis, que puede originar la pérdida de dicho tejido; darse la reparación, es decir, la restauración del tejido comprometido, pero no su arquitectura y función o se puede originar la regeneración del mismo, dándose el crecimiento de un nuevo tejido que conserva a su vez todas las propiedades características

del tejido original, este fenómeno es conocido como *restitutio ad integrum*. Los múltiples avances en la biología del hueso, permite conocer con más detalle los mecanismos moleculares que hacen parte de dicho proceso; lo que trae consigo, nuevas herramientas o mejoras en los tratamientos existentes. Es así como se ha establecido la existencia e importancia de una familia de proteínas que se expresan y liberan en la matriz extracelular del hueso fracturado durante su reparación; dentro de estas proteínas liberadas se encuentran las BMPs (Figura 1)(12,13).



**Figura 1.** Proceso de regeneración, remodelación y reparación ósea. Figura tomada y adaptada de la referencia (13).

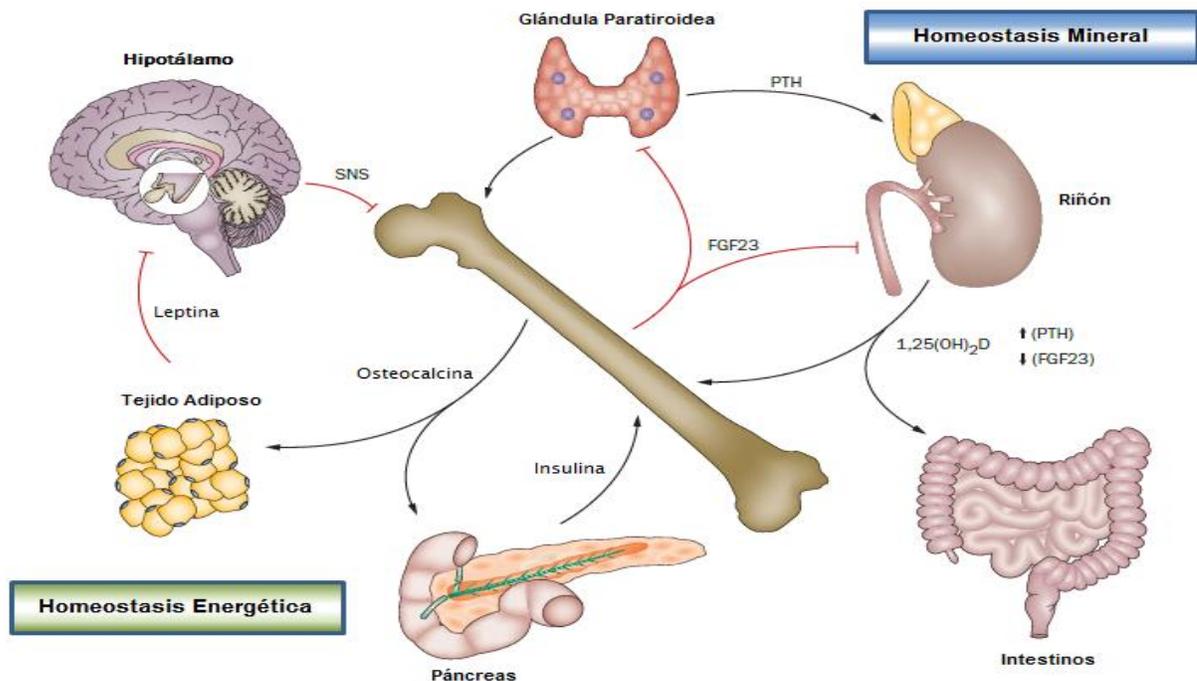
## 4 Tejido Óseo

El tejido óseo es conocido por ser un órgano multifuncional y tejido conectivo especializado que posee la capacidad propia de regeneración en respuesta a una lesión. Se le considera la parte más importante y dinámica del esqueleto debido, entre otras cosas, a que se encuentra en un proceso constante de formación y reabsorción requiriendo de gran cantidad de energía para dicho proceso(14). Está compuesto por células, agua, proteínas, fibras y material extracelular calcificado, lo que le brinda la dureza adecuada para que pueda cumplir con la función de soporte y protección para el organismo(15).

Algunos de los estudios realizados en los últimos años en Endocrinología, permiten conocer que además de su función de soporte, el tejido óseo es importante por su participación en procesos metabólicos como la homeostasis mineral y por actuar como órgano endocrino, participando en la regulación de varios procesos metabólicos como la excreción de fósforo, la tolerancia a la glucosa y la producción de testosterona por medio de proteínas como el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 23 (FGF23, como lo indica su nombre en inglés), Fosfatasa Alcalina (ALP, como lo indica su nombre en inglés) y la Osteocalcina(14,16). Todo este sistema de eventos biológicos de inducción y conducción ósea, implica una serie de señalizaciones moleculares intracelulares y extracelulares para reparar o restaurar los daños que puede llegar a sufrir el esqueleto por lesiones o enfermedades(15,17,18).

Es de resaltar que, con todos los estudios genéticos y moleculares realizados, se ha demostrado que el tejido óseo como órgano endocrino permite coordinar varios procesos metabólicos e integrar el funcionamiento de diferentes órganos y tejidos mediante mecanismos de retroalimentación para la síntesis y liberación de distintas hormonas, donde la concentración liberada de dichas hormonas en la circulación será el indicativo principal para el aumento o disminución de su producción misma. Comprender el rol endocrino del tejido óseo en su totalidad, nos permitirá mejorar en la capacidad de diagnóstico y manejo de los pacientes que sufran enfermedades metabólicas como la osteoporosis y diabetes mellitus. En la siguiente figura (Figura 2) se puede ver de manera resumida el

funcionamiento e interrelación del tejido óseo como órgano endocrino en la homeostasis mineral y energética en el cuerpo humano(19–22).



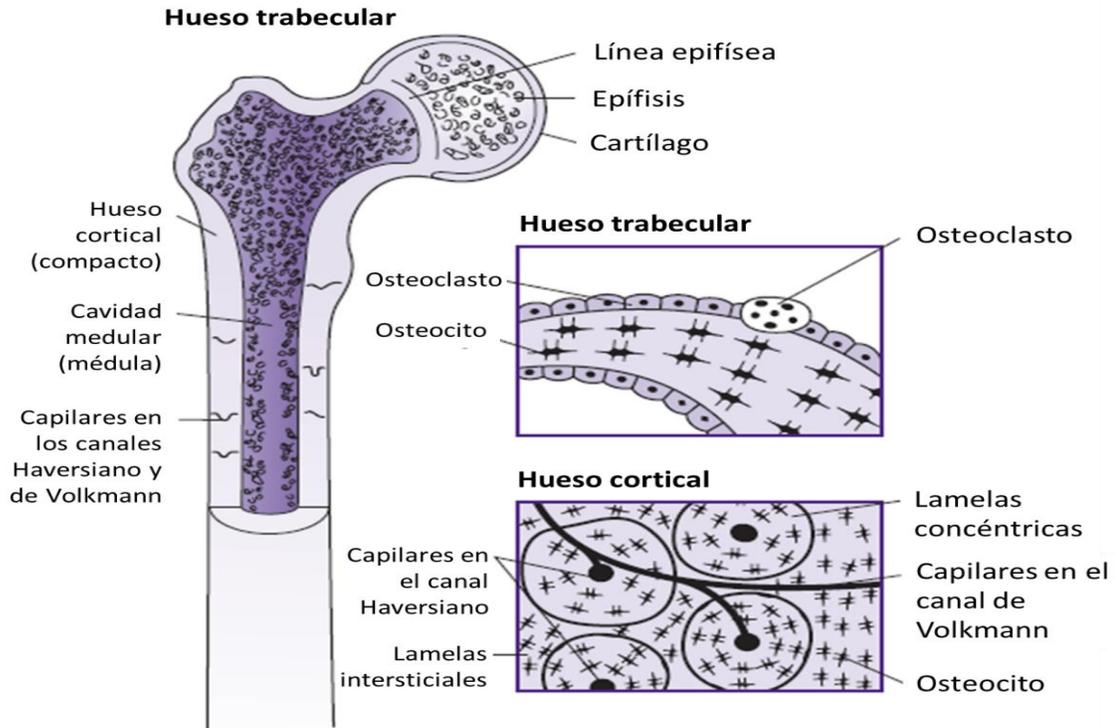
**Figura 2.** Integración del tejido óseo en la homeostasis mineral y energética, mostrando que el tejido óseo se podría considerar como un órgano en sí mismo. Figura tomada y adaptada de la referencia (19).

#### 4.1 Morfología del hueso

La disposición y forma de cada uno de los componentes del tejido óseo, básicamente se encuentra asociada a la función ejercida. Se pueden identificar dos estructuras en la organización del tejido óseo, tanto en los huesos largos como en los cortos. La primera y más exterior, es el hueso cortical o compacto, que ocupa alrededor del 80% del volumen total del hueso, encierra la cavidad medular (médula ósea) y es el principal responsable de la integridad mecánica; esta se encuentra formada básicamente por las osteonas también conocidas como sistema de Havers (unidad anatómica y funcional del tejido óseo), que a su

vez contienen, pequeñas láminas de sales minerales y fibras de colágeno que le brindan dureza y resistencia, células óseas llamadas osteocitos (son células diferenciadas derivadas del osteoblasto), diminutos canales para intercambios de nutrientes y residuos de la actividad celular de dichas células y un canal central que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios denominado canal de Havers. La segunda, se conoce como hueso trabecular o esponjoso, y ocupa alrededor del 20% restante del volumen total del hueso, relleno en el interior con una fina red de pequeñas láminas denominadas trabéculas que albergan y sirven de soporte a la médula ósea (Figura 3) por lo que es el responsable fundamental de la actividad metabólica(16,23–25).

Dicha actividad es realizada básicamente por dos tipos de células: los osteoblastos (encargados de la formación del tejido óseo y su posterior mineralización) y los osteoclastos (encargados de la reabsorción del tejido óseo) en conjunto con proteínas, minerales y vitaminas que bajo la dirección de señales hormonales mantienen el equilibrio en dicho órgano. Esto permite considerar que el tejido óseo es más que un entorno inerte de sostén, es un completo e irremplazable sistema dinámico y activo en el que se producen y transmiten importantes señales reguladoras que afectan la migración, la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular entre otras.



**Figura 3.** Estructura lamelar de hueso cortical y esponjoso. Figura tomada y adaptada de la referencia (16).

## 4.2 Histología del hueso

El tejido óseo contiene una abundante matriz formado por una fase orgánica y otra inorgánica. De manera general está formada aproximadamente en un 50% de sales minerales (calcio, fosfato y carbonato de hidroxapatita, magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor), un 20% de agua y un 30% de matriz orgánica (proteínas principalmente colágeno tipo I en un 90% del total de proteínas) (Tabla 1)(26,27). Además de todos los componentes mencionados, en el hueso existen varios tipos de células: de soporte, los osteoblastos y los osteocitos; de remodelación, los osteoclastos y unas células especializadas conocidas también como células osteoprogenitoras que derivan del mesénquima y pueden dar origen a diversos tipos de células: osteoblastos, fibroblastos (células del tejido conectivo encargadas de producir la matriz y colágeno extracelular), condroblastos (células encargadas de secretar sustancia intercelular y colágeno), adipocitos

(células que forman el tejido adiposo) y mioblastos (células precursoras de las fibras musculares) (Figura 4)(28,29).

**Tabla 1.** Proteínas de la matriz orgánica. Tomada y adaptada de la referencia (27)

<b>Proteína</b>	<b>Tipo, función</b>
<b>Colágeno</b>	Tipo I, III, V, XII
<b>Proteoglicanos</b>	Condroitin sulfato, decorina, biglicano, hialuronano
<b>Proteína con Ácido <math>\gamma</math>-Carboxi-Glutámico</b>	Osteocalcina, proteína de la matriz con ácido $\gamma$ -Carboxi-Glutámico
<b>Glicoproteínas</b>	Oteonectina, fosfatasa alcalina, fibronectina, osteopontina, vitronectina, sialoproteínas óseas
<b>Proteínas del Plasma</b>	Albúmina, $\alpha$ 2-SH-glicoproteína
<b>Factores de Crecimiento</b>	Factor de crecimiento de Insulina (I, II) Factor de crecimiento transformante tipo $\beta$ Factor de crecimiento derivado de Plaquetas

#### **4.2.1 Osteoblastos**

Son grandes células (20-30  $\mu$ m) de forma poliédrica, mononucleadas, con un citoplasma basófilo, un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso bien definidos. Son el resultado de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, son los encargados de la formación del tejido óseo y su posterior mineralización, además de sintetizar la matriz orgánica o el material osteoide, expresan una enzima característica responsable de desfosforilar varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides, la Fosfatasa Alcalina (ALP) para permitir de esta manera la mineralización. En la actualidad, como funciones de los osteoblastos se pueden enunciar las siguientes: sintetizar las proteínas de colágeno y no colágeno de la matriz ósea orgánica, dirigir la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, contribuir a la mineralización del material osteoide, mediar en la reabsorción realizada por los osteoclastos, a través de la síntesis de citoquinas específicas y sintetizar factores de crecimiento(27,30).

#### **4.2.2 Osteocitos**

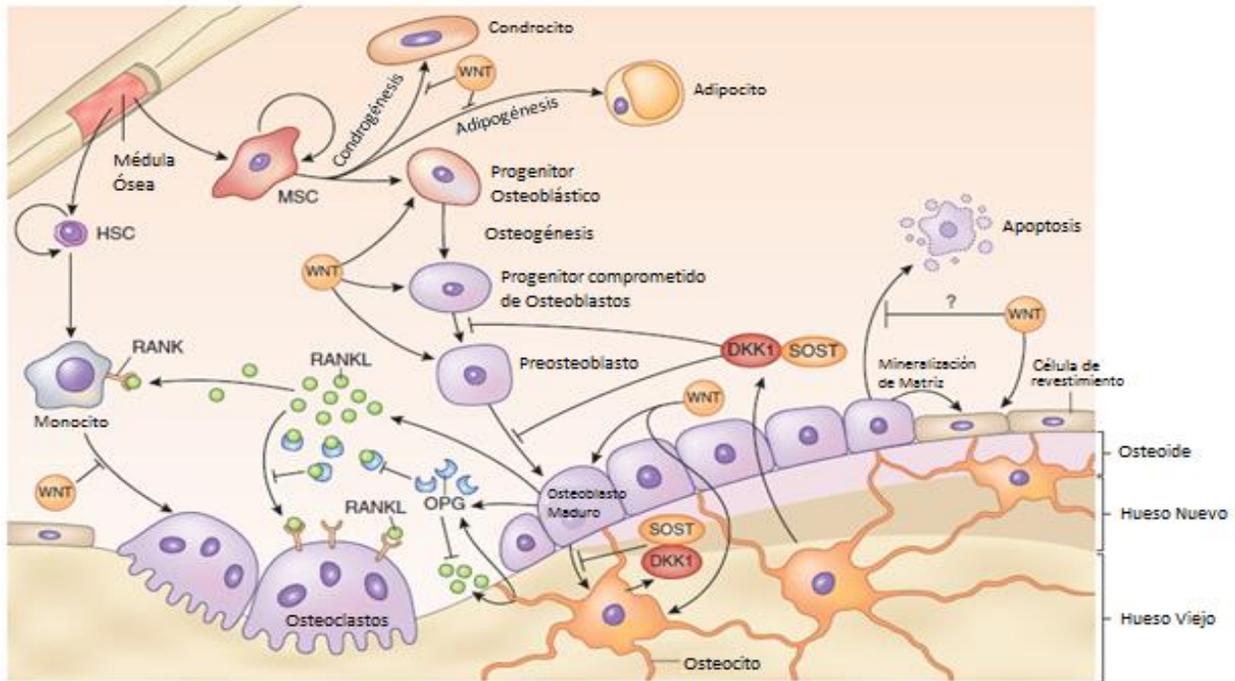
Una vez que la matriz está mineralizada, algunos osteoblastos son transformados en osteocitos, es decir, son células diferenciadas terminalmente derivadas del osteoblasto; son las células más abundantes del tejido óseo. Los osteoblastos, los osteoclastos y las células de revestimiento óseo se encuentran en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Se organizan formando un conjunto de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes(31). Los osteocitos son uno de los principales tipos celulares responsables de la detección de la tensión mecánica de las cargas controlando de esta forma el remodelado óseo(32,33).

#### **4.2.3 Osteoclastos**

Son células de gran tamaño (100µm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas, se encuentran localizados en unas cavidades denominadas lagunas de Howship. Es la principal célula encargada de la reabsorción del tejido óseo. Estas células son el resultado de la fusión de progenitores mononucleares derivados de células madre hematopoyéticas medulares conocidas como Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CFU, como lo indica su nombre en inglés), dicho proceso se denomina osteoclastogénesis(34). Se caracterizan porque en su membrana poseen dos zonas fácilmente diferenciables: un borde confinado, donde tiene lugar la reabsorción, y una zona clara rica en microfilamentos, con integrinas (superfamilia de glicoproteínas que participan en la unión de las células con la matriz extracelular) que sirven de anclaje a la matriz. Con este fin, los osteoclastos se desplazan hacia el área a reabsorber y luego se adhieren inmediatamente a la superficie del hueso mineralizado con el borde ondulado y sellando los bordes del área con las integrinas.

Con respecto a la osteoclastogénesis, se conoce que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Esta se regula por medio de la existencia de 3 moléculas clave: OPG, Osteoprotegerina, proteína soluble sintetizada por osteoblastos y

preosteoblastos; Ligando de Receptor Activador para el Factor Nuclear  $\kappa$ -B (RANKL, como lo indica su nombre en inglés) situado en la superficie de los osteoblastos y preosteoblastos y el Receptor Activador para el Factor Nuclear  $\kappa$ -B (RANK, como lo indica su nombre en inglés) receptor de RANKL, situado en las membranas de osteoclastos y preosteoclastos(30,35).

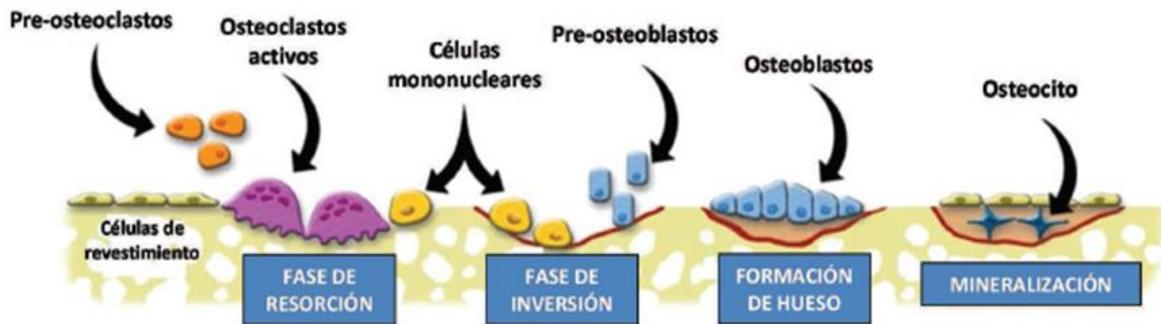


**Figura 4.** Distintos tipos de células óseas y su interacción. Figura tomada y adaptada de la referencia (36).

### 4.3 Remodelación, Fractura y Regeneración Ósea

El tejido óseo es uno de los más dinámicos del organismo, éste se encuentra bajo un proceso continuo de restauración (formación y reabsorción), que se lleva a cabo dando origen a un nuevo tejido que posee cada una de las propiedades del tejido original, *restitutio ad integrum*(12,13). Este proceso a nivel microscópico está coordinado por las Unidades Básicas Multicelulares (BMU, como su nombre lo indica en inglés) conformada por osteoclastos y osteoblastos (Figura 5). En una fractura, el proceso de regeneración ósea implica dos etapas (angiogénesis y osteogénesis), ambas estimuladas por una combinación

de hormonas, células, componentes de la matriz extracelular, citoquinas y factores de crecimiento(37,38).

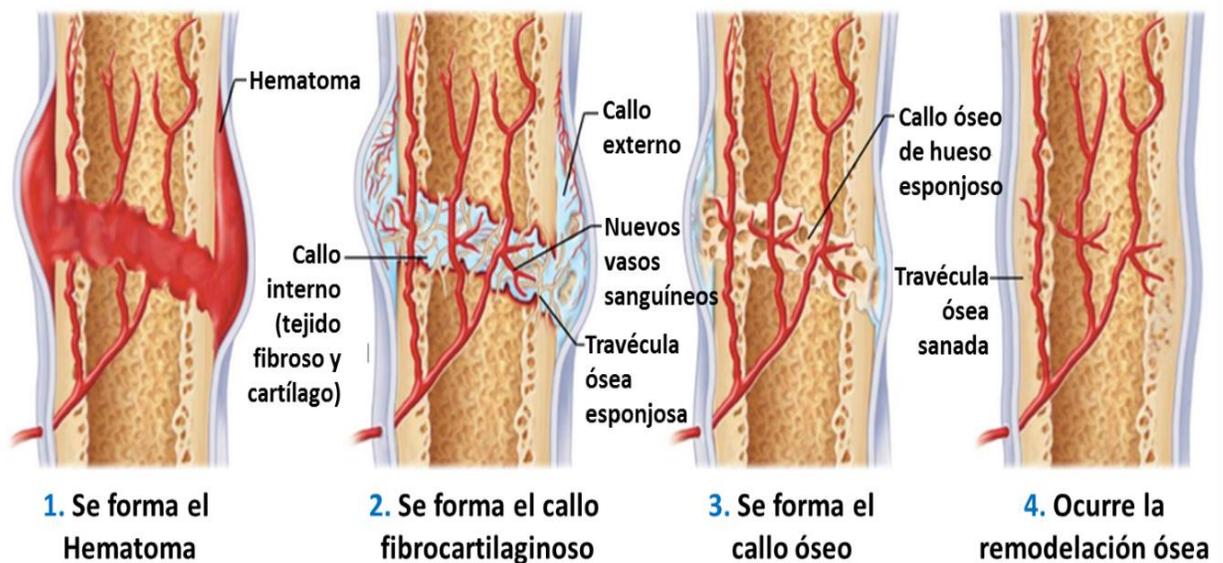


**Figura 5.** Proceso de regeneración ósea. Figura tomada y adaptada de la referencia (36).

La regeneración ósea es un proceso muy bien definido, coordinado y regulado tanto a nivel celular como molecular, con el fin de alcanzar la plena restitución del tejido lastimado en un trauma. Empieza con la formación de un hematoma producto de la rotura de los vasos sanguíneos, capilares del tejido óseo y partes blandas del sitio afectado desencadenando una reacción inflamatoria donde son liberados diversos factores de diferenciación encargados del reclutamiento, proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras del mesénquima seguido de una angiogénesis localizada (proceso por el que resultan nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes) con lo cual se consigue la formación de un callo fibrocartilaginoso que estabiliza progresivamente la fractura produciendo un aumento en la rigidez del callo así como formación de hueso plexiforme (hueso embrionario o inmaduro donde las fibras se disponen de manera desordenada) e invasión vascular que da lugar a la formación de un callo óseo a través de los osteoblastos favoreciendo el depósito de sales cálcicas y los osteoclastos produciendo cavidades y disminuyendo la densidad de la estructura, facilitando de esta manera la remodelación completa del hueso fracturado (Figura 6).

Con los aportes de la ciencia revisados aquí y el aprovechamiento de toda la información revelada acerca de los mecanismos moleculares implicados para el logro de una excelente

regeneración ósea, se han abierto nuevas posibilidades de tratamientos para defectos congénitos, enfermedades degenerativas y fracturas óseas(13,27,31,39,40); en las últimas décadas el surgimiento de la medicina regenerativa como esperanza en todos los campos de la medicina, siendo los defectos óseos uno de sus principales objetivos, incluyen principalmente dos tipos de estrategias diferentes basadas en células: la primera estrategia, la terapia celular, donde se aplican células dentro de un tejido directamente para reconstituir su integridad y su función y la segunda estrategia, la ingeniería de tejidos que es un poco más compleja ya que abarca cuatro enfoques principales, moléculas bioactivas (factores de crecimiento, citoquinas, compuestos de células madre mesenquimales y hormonas) que inducen la formación de tejidos; células y sustitutos celulares que responderán a las señales activadas por las moléculas bioactivas; matrices tridimensionales, con propiedades de adhesión y degradación específicas, para lograr la construcción similar del tejido o las partes perdidas del mismo, incluso órganos; y un buen soporte nutritivo que permita la posterior angiogénesis de la zona tratada.



**Figura 6.** Fases en la regeneración de una fractura ósea. Figura tomada y adaptada de la referencia (41)

## **5 Ingeniería de Tejidos y principales Terapias de Regeneración de Tejidos**

Un área de interés en la medicina regenerativa y en rápida evolución, desde comienzos del siglo XXI ha logrado reunir elementos de la física, la química, la informática y la biología, entre otros campos, para diseñar y ofrecer materiales, dispositivos, sistemas y estrategias clínicas para la reparación, mantenimiento, regeneración y reemplazo de tejidos y órganos dañados a través de una ciencia interdisciplinaria, la ingeniería de tejidos (42,43). Por medio de esta disciplina se pueden tener trasplantes de tejido como injertos de piel, trasplantes de suspensiones celulares como médula ósea y transfusiones de sangre, reemplazos con endoprotésis o stent (diminuto tubo de malla de acero inoxidable que actúa como una estructura para mantener permeable una arteria que se ha obstruido) y a nivel ortopédico hueso, cartílago, tendón, ligamento, menisco, disco intervertebral, grasa, músculo y nervio son los objetivos principales; este último con un crecimiento dramático en los últimos años.

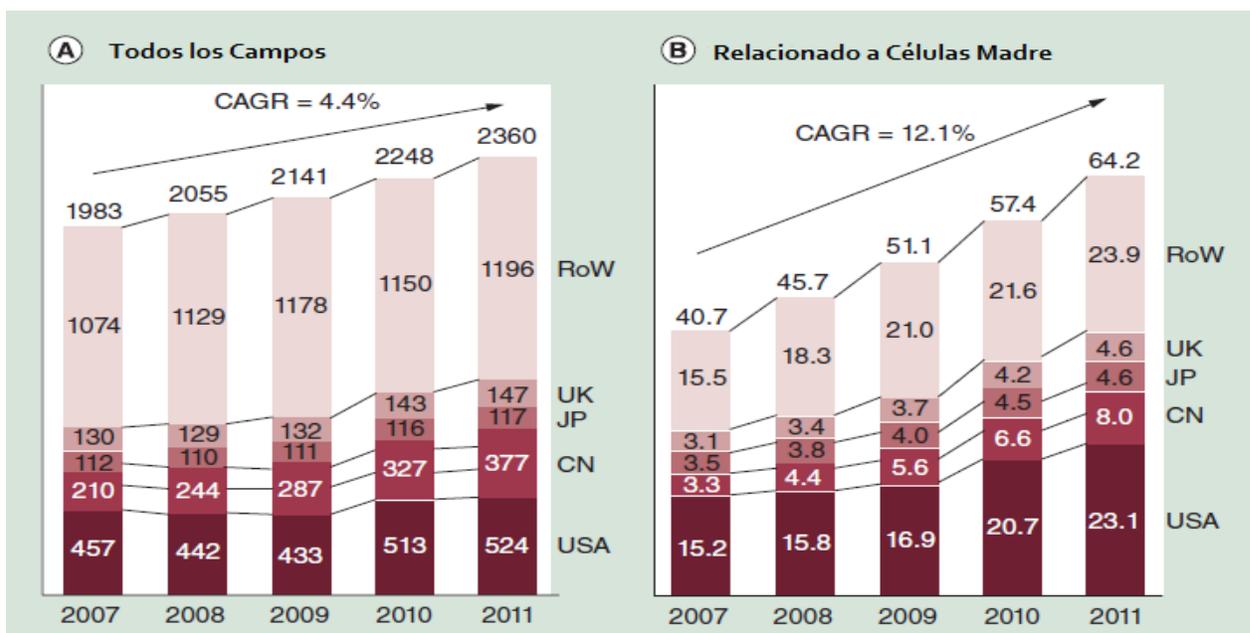
De esta manera, nace entonces la ingeniería de tejidos, definida por Laurencin como “la aplicación de principios de biología, química e ingeniería para la reparación, restauración o regeneración del tejido vivo mediante el uso de biomateriales, células y factores solos o en combinación”(44). En los últimos 20 años el rol de dicha disciplina en el campo de la medicina regenerativa ha sido un tema de enormes inversiones para la investigación, todos estos esfuerzos ha dado como resultado biomateriales bioactivos que permiten la expansión de alternativas y opciones quirúrgicas bastante interesantes para la restauración de la forma y función del hueso lesionado(45). Estos han sido evaluados en diversidad de modelos preclínicos y clínicos en patologías óseas distintas(46–48) en los que se ha logrado con éxito la formación de hueso.

### **5.1 Ingeniería y Regeneración del Tejido Óseo: Células Madre**

Por ser las células madre fuente principal de todos los tejidos nuevos que surgen de la reparación y la remodelación y estar presentes en todos los tejidos adultos incluso en el tejido óseo, dan lugar a células progenitoras, que progresan hasta convertirse en preosteoblastos y luego en osteoblastos, estos a su vez dan lugar tanto a la matriz de tejido

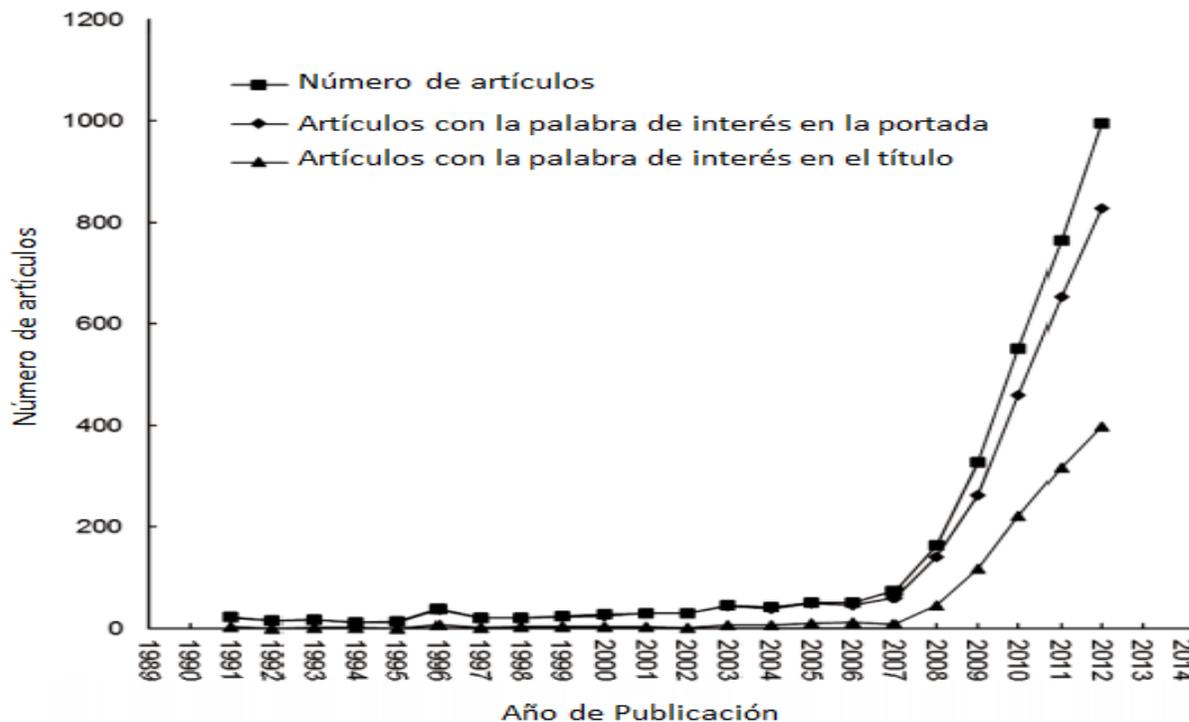
óseo nuevo como a osteocitos y células de revestimiento óseo que puede llegar a sobrevivir durante una media de veinte años o más en hueso cortical humano, proceso que se da también durante la reparación y regeneración ósea después de una fractura o un procedimiento de injerto óseo, al igual estos principios se aplican a las células del músculo, tendón, ligamento y cartílago. Esto brinda enormes posibilidades para que las células derivadas de un tejido puedan ser útiles para formar otro tejido diferente trayendo consigo gran importancia con respecto al diseño de estrategias de ingeniería de tejidos(49).

Los estudios realizados en torno a este tipo de investigación, enseñan el grado de jerarquía e interés que tienen los gobiernos y las instituciones públicas y privadas facilitando el trabajo *in vitro* e *in vivo* con células madres permitiendo con esto, grandes avances médicos y farmacéuticos(50,51). Es así, como lo muestra un estudio bibliométrico realizado acerca de las competencias globales que existen en los 4 principales países de investigación con células madres (EE.UU., China, Japón y el Reino Unido), cuyo campo científico es enormemente amplio, de acuerdo con el número de publicaciones que guardan una estrecha relación o afinidad al tema entre los años 2007 – 2011, se evidencia el crecimiento vertiginoso existente para esta ciencia (Figura 7)(52).



**Figura 7.** Crecimiento de publicaciones y citas relevantes para la investigación con células madre. Figura tomada y adaptada de la referencia (52).

En otro estudio elaborado se puede comprobar la importancia y el inmenso potencial de la información obtenida sobre células madre y por ende el avance de la ingeniería de tejidos para la medicina regenerativa (Figura 8)(53).



**Figura 8.** Tendencias de publicaciones sobre artículos de células madre. Figura tomada y adaptada de la referencia (53).

## 5.2 Ingeniería y Regeneración del Tejido Óseo: Factores de Crecimiento

El inicio de este enfoque perteneciente a la biotecnología molecular, se dio a partir del estudio realizado por Urist en 1965(54), en ese momento se empezó a hablar sobre la existencia de algunas proteínas que provocaban la formación ósea y se les llamó entonces Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs). Este descubrimiento abrió a su vez el camino para la identificación de otras proteínas como los factores de crecimiento, que son potentes mediadores biológicos que participan y regulan la quimiotaxis, diferenciación, proliferación y síntesis de matriz extracelular en cualquier proceso de reparación tisular.

En el proceso de regeneración ósea, los factores de crecimiento son secretados por las células óseas, estas actúan sobre un receptor específico para inducir un conjunto de transducción de señales que alcanzan el núcleo y producen una respuesta biológica, para que luego se active un sistema de transcripción de señales que viaja al núcleo unido al ADN para inducir la expresión de uno o varios genes que posteriormente cambian las características de la misma célula; los factores de crecimiento involucrados en los eventos biológicos de reparación y formación de huesos y de otros tejidos conectivos son los siguientes: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF, como su nombre lo indica en inglés); Factor de Crecimiento Análogo de Insulina (IGF); Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF); Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF); Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y Factor de Crecimiento Transformante Tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ )(11,55).

El Factor de Crecimiento Transformante Tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ )(8,11), es una citoquina (proteínas que regulan la función de las células que las producen sobre otros tipos de células) que participa en el desarrollo, diferenciación, crecimiento y apoptosis en la mayoría de las células; hace parte de una superfamilia conformada por más de 60 integrantes, subdividida en varios grupos, entre los que se podemos mencionar: los Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDFs, como su nombre lo indica en inglés), la Sustancia Inhibidora Muleriana (MIS), las Activinas e Inhibinas, los Factores Neurotróficos Derivados de la Glia (GDNFs), las Miostatinas, y las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs)(55,56).

## 6 Proteínas Morfogenéticas de Hueso

Las Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs), constituyen la subdivisión más grande de la superfamilia de ligandos conocidos como Factores de Crecimiento Transformantes  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y son vitales para el desarrollo esquelético, el crecimiento, la homeostasis y la curación de fracturas. Fueron descubiertas por Marshall Urist quien en uno de sus experimentos logró obtener la formación de hueso en tejido muscular de ratones a partir de implantes de hueso desmineralizado(54); se comprobó entonces que estas proteínas eran las responsables de desencadenar la diferenciación de células osteoprecursoras en osteoblastos, los cuales promueven la formación de hueso(57). Luego de múltiples estudios, se conoce que estas proteínas regulan también el crecimiento, diferenciación y apoptosis celular, además de su participación en el desarrollo embrionario(58,59). Sin embargo, solo hasta finales de los años 80 se caracterizaron y se clonaron las primeras BMPs, estableciendo entonces sus primeros estudios a nivel bioquímico(60).

A la fecha se han identificado al menos una veintena de miembros de BMPs en seres humanos y otras especies con funciones variables durante procesos tales como embriogénesis, formación de esqueletos, hematopoyesis y neurogénesis. Las BMPs exhiben una estructura altamente conservada en las múltiples especies animales (Tabla 2), estas se han dividido en varias subfamilias de acuerdo a las similitudes en la secuencia de aminoácidos y funciones conocidas: BMP2 y BMP4; BMP3, BMP3B (GDF10); BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a, BMP8b y GDF5, GDF6, GDF7, aunque no todos los miembros son osteogénicos(61), así como también BMP1 no pertenece a la superfamilia TGF- $\beta$ , siendo una metaloproteasa que escinde el extremo C del procolágeno I, II y III y que es capaz de inducir la formación de cartílago(62).

**Tabla 2.** Clasificación de las BMPs. Tomada y adaptada de las referencias (61) y (63)

<b>BMP</b>	<b>Función Fisiológica</b>	<b>Localización en el genoma humano</b>	<b>Año de Descripción</b>
<b>BMP2</b>	Reparación y regeneración ósea y de cartílago / formación del corazón	20p12	1988
<b>BMP3A</b>	Regulador negativo de la morfogénesis del hueso	4q21	1988
<b>BMP3B</b>	Regulador de la diferenciación celular	10q11.22	1995
<b>BMP4</b>	Reparación y regeneración ósea y de cartílago / formación del riñón	14q22–q23	1988
<b>BMP5</b>	Desarrollo de las extremidades / morfogénesis de hueso y cartílago	6p12.1	1990
<b>BMP6</b>	Hipertrofia de cartílago / morfogénesis de hueso / desarrollo del sistema nervioso	6p24–p23	1990
<b>BMP7</b>	Reparación y regeneración ósea y de cartílago / formación del riñón y ojos / desarrollo del sistema nervioso	20q13	1990
<b>BMP8A</b>	Morfogénesis de hueso / espermatogénesis	1p34.3	2002
<b>BMP8B</b>	Morfogénesis de hueso / espermatogénesis	1p35–p32	1992
<b>BMP9</b>	Morfogénesis de hueso / desarrollo del sistema colinérgico nervioso / metabolismo de la glucosa	10q11.22	2000
<b>BMP10</b>	Actividad proliferativa de los cardiomiocitos embrionarios	2p13.3	1999
<b>BMP11</b>	Modelado tejido neuronal y mesodérmico / desarrollo de páncreas y ojo / formación de riñón	12q13.2	1999
<b>BMP12</b>	Desarrollo de los tendones y ligamentos / desarrollo del sistema neurosensorial	2p24.1	1994
<b>BMP13</b>	Desarrollo del cartílago e hipertrofia	8q22.1	1994
<b>BMP14</b>	Condrogénesis / Angiogénesis	20q11.2	1994
<b>BMP15</b>	Desarrollo folicular; Factor de crecimiento / diferenciación específico de ovocitos que estimula la foliculogénesis y el crecimiento de células granulosas	Xp11.2	1998
<b>BMP16</b>	Modelado embrionario / regeneración y reparación esquelética	10q22.1	1999
<b>BMP17</b>	Modelado embrionario	1q42.1	2000
<b>BMP18</b>	Modelado embrionario	1q42.1	2000
<b>GDF1</b>	Modelado embrionario	19p12	1990
<b>GDF3</b>	Controlar negativa y positivamente la diferenciación de las células madre embrionarias	12p13.1	1993

<b>GDF8</b>	Regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético	2q32.2	1997
<b>GDF9</b>	Desarrollo folicular; Factor de crecimiento / diferenciación específico de ovocitos que estimula la foliculogénesis y el crecimiento de células granulosas	5q31.1	1993
<b>GDF15</b>	Desarrollo folicular; Factor de crecimiento / diferenciación específico de ovocitos que estimula la foliculogénesis y el crecimiento de células granulosas	19p13.11	1997

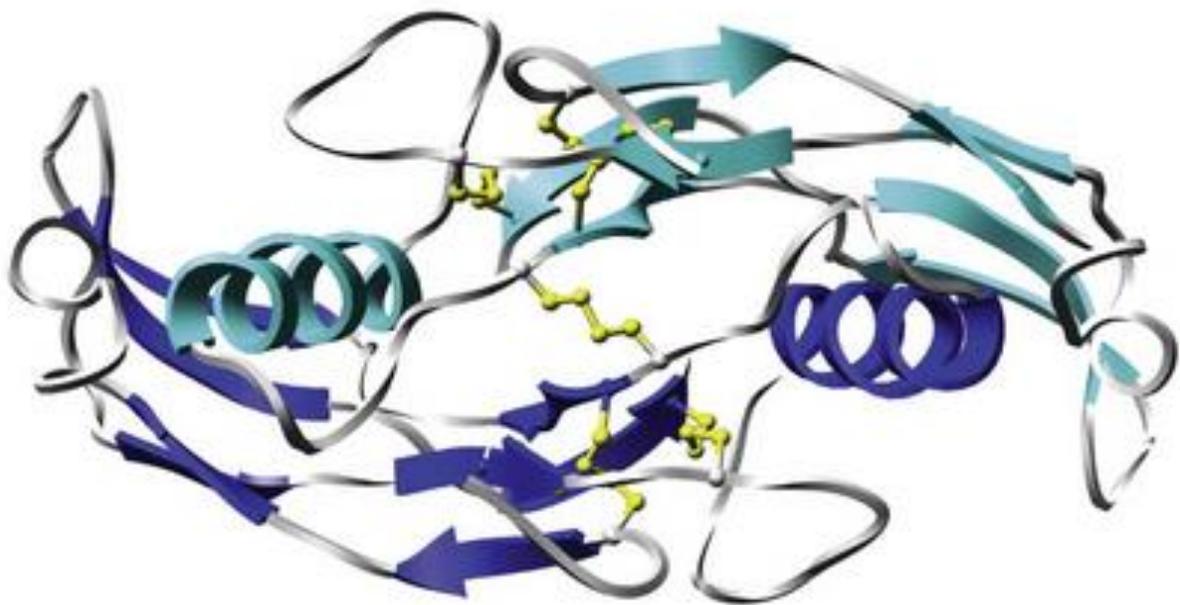
---

### 6.1 Estructura de las BMPs

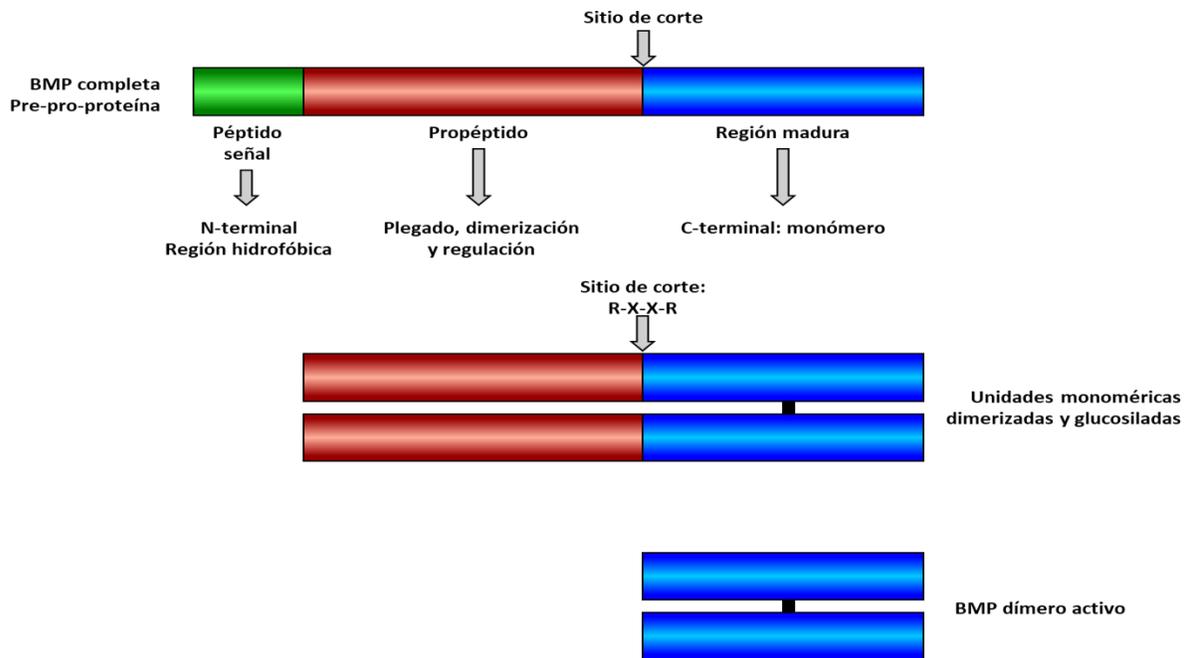
Las proteínas de la familia TGF- $\beta$  comparten la misma estructura dimérica en la que la hélice central de un monómero se comprime contra la superficie cóncava formada por las hebras  $\beta$  del otro monómero (Figura 9). La mayoría de los miembros de la familia se estabilizan adicionalmente mediante un enlace disulfuro inter-cadena que une los monómeros entre sí, además de otros puentes disulfuro que se forman de manera intra-catenaria. Estas proteínas se sintetizan como pre-pro-polipéptidos inactivos grandes (entre 400 – 500 aminoácidos) que contienen péptidos señal en sus extremos amino (N-terminal) y polipéptidos maduros en los extremos carboxilo (C-terminal), separados por pro-dominios(64,65).

Las BMPs consisten en dímeros cuyas cadenas están conectadas por enlaces disulfuro, este proceso de dimerización es un requisito previo para que las BMPs puedan presentar su capacidad osteoinductora(66). Las BMPs están activas tanto como moléculas de homodímero (dos cadenas idénticas) como en forma de heterodímero (dos cadenas diferentes) (Figura 10). Además, son glicoproteínas de masa molecular relativamente baja que se producen en el tejido óseo por células osteoprogenitoras, osteoblastos, condrocitos, plaquetas y células endoteliales.

Son responsables de múltiples funciones, no solamente inducen la formación de hueso y cartílago sino que cumplen también un papel fundamental en numerosos procesos no osteogénicos, regulan de manera importante las propiedades de diferentes tipos de células madres; por ejemplo, en **células madre embriónicas** (ESC), células de 4 – 5 días de edad, resultantes de la fertilización *in vitro*, muestran su capacidad para bloquear la auto-renovación; en **células madre mesenquimales** (MSC), tipo de células multipotentes que pueden diferenciarse en células cartilagosas (condrocitos), células óseas (osteoblastos) y células grasas (adipositos), induce e inhibe la diferenciación osteoblastica a través de los receptores tipo I; cumplen también con funciones pleiotrópicas (mutagénesis u oncogénesis), actúan sobre muchos tipos celulares diferentes, en la presencia de tumores óseos u osteosarcoma; participan en la formación y diferenciación del sistema nervioso central (desarrollo neuronal) y en diferentes regiones del mismo, para regular el destino celular, la proliferación y la diferenciación.



**Figura 9.** Estructura terciaria de BMP-2. Figura tomada y adaptada de la referencia (65).



**Figura 10.** Organización estructural BMPs. Figura tomada y adaptada de la referencia (61).

## 6.2 Mecanismos de Señalización de BMP

### 6.2.1 Receptores

Las funciones principales de las BMPs (actividad biológica) se da mediante la unión a receptores heterotetraméricos específicos en las células diana, lo que provoca una transducción de señal que conlleva a la movilización de ciertas proteínas de la familia Smad, palabra que resulta de coordinar dos raíces, MAD (por su siglas en inglés *Mothers Against Decapaplegic* de la mosca *Drosophila*, proteína de la mosca homóloga a la proteína morfogenética de hueso humana) y la proteína de la especie de nemátodos *Caenorhabditis elegans* SMA (del gen *Sma*); estos son receptores transmembrana serina/treonina quinasa y pueden ser de dos tipos: tipo I y tipo II (Figura 11). Ambos comparten propiedades estructurales similares comprendidos por un dominio extracelular corto con 10 a 12 residuos de cisteína, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad serina/treonina quinasa(67). Se han identificado cinco receptores

tipo I: ALK1 (Acvr11), ALK2 (ActRI), ALK3 (BRIa), ALK4 (ActRIb) y ALK6 (BRIb); y tres receptores tipo II: BRII, ActRIIa, y ActRIIb(63).

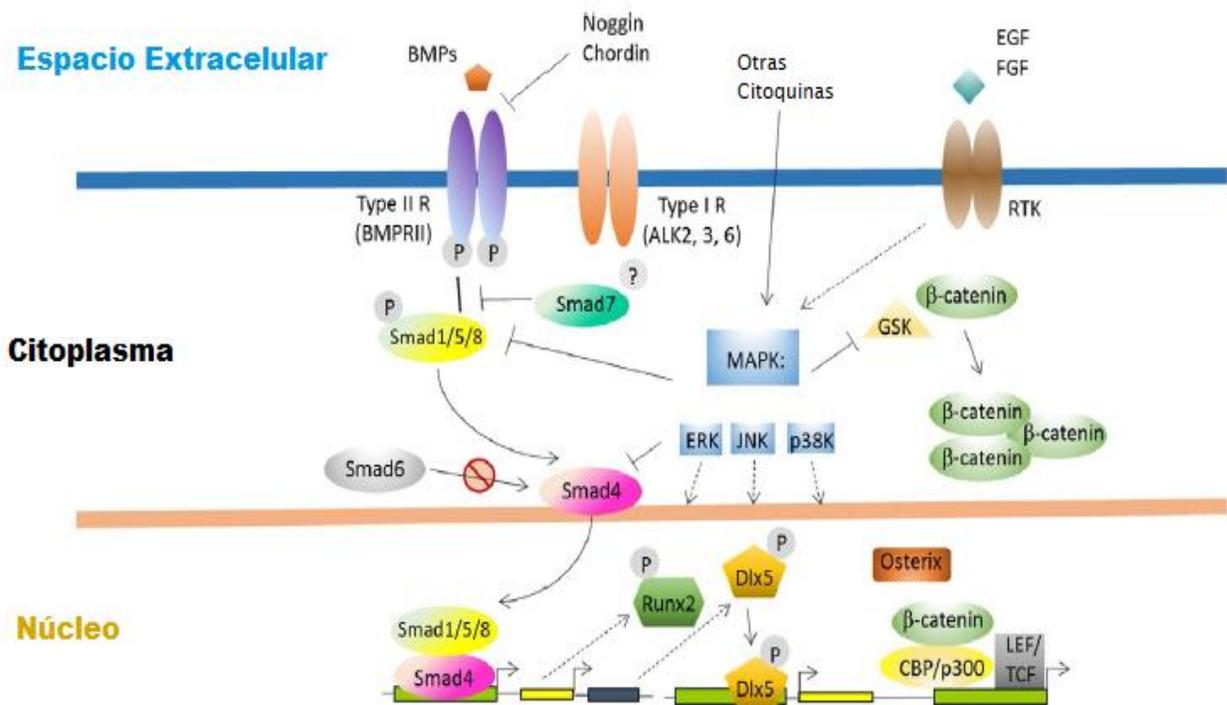
El receptor tipo II es constitutivamente activo cuando está fosforilado, es el sitio de unión primario del ligando y tras su activación, se produce la fosforilación del receptor tipo I. Una vez activado, es el receptor tipo I el que determina la naturaleza de la respuesta biológica; se asocia con receptores específicos regulados Smad que unen las señales de los receptores de ligando con el control de la transcripción. Por lo tanto, estas proteínas Smad se asocian con proteínas específicas de unión al ADN en el núcleo generando complejos transcripcionales. Se ha comprobado que las BPMs pueden activar diferentes rutas de señalización en respuesta a la unión con su receptor: la ruta de señalización Smad y la ruta de señalización Smad independiente(36,68,69).

### **6.2.2 Rutas de señalización Smad o Canónica y Ruta de señalización Smad independiente**

Las proteínas Smads son una familia de mensajeros citoplasmáticos conservadas evolutivamente y cuya actividad depende directamente de la activación por receptores en la superficie celular, participan en la propagación de señales intracelulares activadas por TGF- $\beta$  indispensables para muchas de las acciones de esta citoquina. Los miembros de la familia Smad se agrupan en tres clases: Smads asociadas a receptores de membrana (R-Smads), incluyendo Smad 1, 2, 3, 5 y 8; el mediador común (Co-Smad) Smad-4; y Smads inhibitoras con características antagonistas (I-Smads): los Smads 6 y 7.

Cuando se activa por interacción con su ligando, el receptor es capaz de fosforilar R-Smads. Cuando se fosforila, R-Smad se disocia del receptor para formar un complejo heterodimérico con un Co-Smad (Smad4), permitiendo su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, las proteínas Smad pueden activar o desactivar una amplia variedad de factores de transcripción y la regulación de la activación de genes específicos(70) (Figura 11).

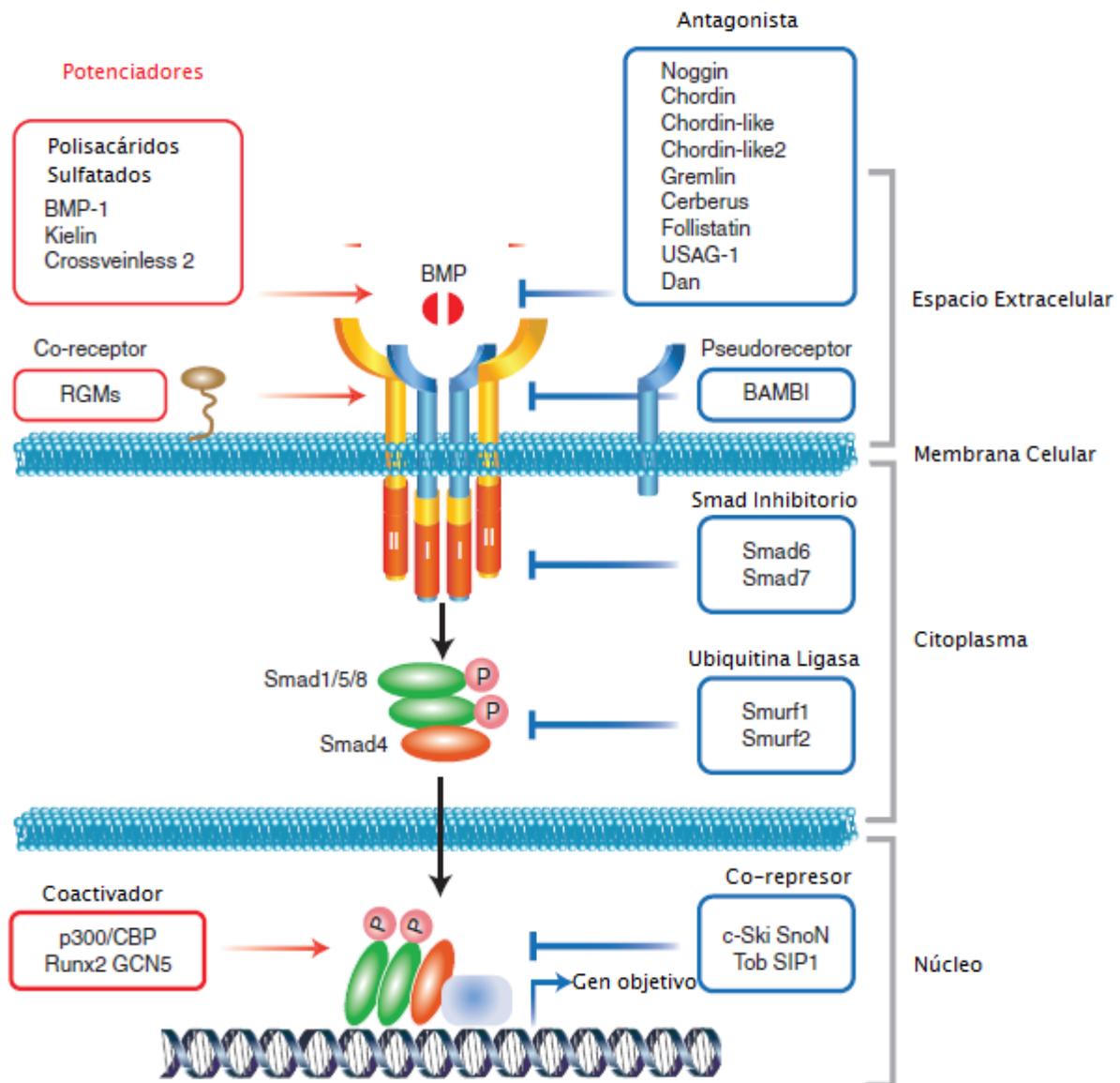
Aunque la ruta de señalización por medio de Smad es el mediador intracelular principal, se ha descrito que las BPMs tienen vías alternas independientes capaces de inducir la transcripción de genes a través de proteínas cinasas: (PKA y PKC, cinasa II independiente de calmodulina, MAPK, JNK); TAK1, TAB1, NFκB, ATF2, PI3K, calcineurina (fosfatasa dependiente de calcio), cinasa de tirosina c-Abelson (c-Abl); GTPasas Ras y Rho. Estas vías interactúan entre sí y también con Smad, creando complejas redes intracelulares de señalización(71,72). Aunque no se ha aclarado por completo el mecanismo exacto de iniciación de esta ruta, las BPMs demuestran la influencia en la supervivencia celular, la apoptosis, la migración y la diferenciación celular(63).



**Figura 11.** BMP vías de señalización, representación de las vías Smad-dependientes e independientes y sus mecanismos de regulación. Figura tomada y adaptada de la referencia (70).

### 6.2.3 Regulación de la señalización de BMP

La señalización se regula en múltiples niveles desde el espacio extracelular hasta el núcleo, está limitada por antagonistas o inhibidores BMP, que funcionan a través de la unión directa a BMP, evitando así su unión a receptores específicos y por potenciadores que se expresan en células específicas y desempeñan papeles importantes en diversas actividades biológicas de dichas BMP (Figura 12)(73).



**Figura 12.** Potenciadores e inhibidores de la señalización de proteínas morfogénicas óseas (BMP). Figura tomada y adaptada de la referencia (73).

## 7 Producción Biotecnológica de BMPs

El hallazgo de las BMPs como potentes factores de crecimiento con actividad osteoinductora y su capacidad de actuar como agentes quimiotácticos y promotores de la formación de osteoblastos a partir de las MSC, ha hecho que su uso ha sido un excelente aliado en el tratamiento de defectos óseos y regeneración ósea(74). Con el desarrollo de su uso, resultó evidente la necesidad de encontrar mecanismos y técnicas especializadas para el desarrollo de materiales e implantes que pudieran ser utilizados como injertos óseos para defectos esqueléticos complejos, ya sea de origen postraumático, degenerativo, neoplásico o congénito que requieren una reconstrucción y así garantizar la integridad estructural y funcional.

Existen métodos bien establecidos para la purificación de BMPs a partir de matriz ósea desmineralizada pero, este proceso es extremadamente laborioso e ineficiente, con una muy baja recuperación de proteínas y baja especificidad para una BMP determinada(75). Esta desventaja ha impulsado la sustitución de la purificación de BMPs del tejido óseo, por técnicas de Biología Molecular/Ingeniería Genética (clonación y expresión de cDNA) en la producción de éstas, lo que ha permitido obtener el gen de estudio y el uso de vectores apropiados que hacen posible la expresión de dichos genes en bacterias, levaduras y células de mamífero, con lo cual se logra el incremento en la producción de las proteínas de interés.

La producción a gran escala de proteínas recombinantes gira en torno a la búsqueda de potenciales reguladores de los procesos relevantes en la ingeniería de tejidos enfocando futuras estrategias terapéuticas y especialmente el diseño de nuevas drogas y terapias en un sistema que asegure la actividad biológica sin inmunogenicidad, imponiendo el uso de sistemas de expresión eucarióticos, que son capaces de glicosilar estas proteínas; no obstante, con esto, surgió la desconfianza de que las propiedades osteoinductivas de las BMP recombinantes pueden ser relativamente pequeñas en comparación con las de las BMP obtenidas a partir del hueso mediante procedimientos de purificación(76,77). Las hipótesis que se tejen al respecto, son variadas y entre ellas una para explicar estas desigualdades, es que existen diferencias en la secuencia de aminoácidos de las dos BMP.

Incluso se sugiere la necesidad de usar coordinadamente varias BMPs recombinantes para facilitar el proceso de reparación ósea, así como también, el tipo de material utilizado para el transporte o entrega de la proteína en el sitio afectado(77).

Ahora bien, puesto que la producción de proteínas recombinantes requiere de un sistema de expresión, el tamaño de la proteína, el tipo de modificaciones post-traduccionales necesarias en la molécula y el uso del producto final, son todos determinantes para la elección del mismo, ya que se convierten en factores decisivos para la eficiencia y calidad de la molécula final producida. Por ejemplo, la producción en células de mamíferos se caracteriza por brindar un producto en su conformación nativa, pero en su contra existen variables como bajo rendimiento de producción, costos elevados y tiempos de producción muy largos; en bacterias, se obtienen grandes cantidades de producto, en menos tiempo y con un costo más bajo(78–80), aunque se sacrifican las modificaciones postraduccionales, lo que implica la aplicación de otras metodologías o el uso de estas BMPs sin esas modificaciones(81).

En la actualidad el desafío para la producción de proteínas recombinantes a la escala de calidad requerida para las aplicaciones terapéuticas y comerciales ha permitido el desarrollo de diversos métodos para la producción de las mismas; todo esto nos permite tener importantes avances en los sistemas de expresión, entre los cuales podemos mencionar los siguientes:

**- Bacteriana:** *E. Coli* fue el primer microorganismo utilizado con este fin, es la bacteria más representativa y adecuada debido a sus altas tasas de crecimiento y bajos requerimientos para su mantenimiento; diversos parámetros como la fuente y concentración de nitrógeno (peptona y/o extracto de levadura) y carbono (glucosa y/o glicerol), la temperatura, el pH y el consumo de oxígeno son las principales condiciones a controlar durante la producción de proteínas recombinantes en dicho sistema, otros componentes empleados como inductores en la producción de proteínas recombinantes puede ser el cloruro de sodio o el isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)(82). Sin embargo, la escasa formación de enlaces disulfuro, el alto índice de formación de cuerpos de inclusión y

la limitada capacidad para modificaciones post-traduccionales, restringe su uso ya que todo lo anterior conduce a una reducción de la actividad biológica de la proteína producida(80). Existen diversos modelos en los que se ha logrado el aumento en la producción de la proteína con un mejorado nivel de actividad biológica en comparación con los análogos descritos hasta la fecha (83,84). Las cepas más usadas a nivel productivo son K-12(85), BL21(DE3)(79,83), TG1(86).

**- Levaduras:** Las levaduras son una buena alternativa como sistemas de expresión microbiano eucariótico cuando los sistemas de expresión bacterianos conducen a la síntesis de proteínas en cuerpos de inclusión inactivos y plegados incorrectamente. *Pichia pastoris* se ha convertido en el principal ejemplo como especie de levadura para la producción de proteínas recombinantes, contiene promotores regulados y eficientes que permiten altas tasas de crecimiento en medios de cultivo simples y de bajo costo(87,88). Como ventajas de este sistema, podemos mencionar la capacidad de las levaduras en las modificaciones post-traduccionales necesarias en las proteínas obtenidas (glicosilación y promoción correcta en la formación de enlaces disulfuro(80).

**- Sistema de Baculovirus/células de insectos (BEVS):** Es un sistema muy bien estudiado que se ha convertido en un vector para la administración de genes *in vivo* e *in vitro* debido a su baja citotoxicidad en células de mamíferos. Las aplicaciones se han expandido exponencialmente hacia la detección de fármacos, exhibición de genes eucarióticos, terapia del cáncer e ingeniería tisular, etc. El baculovirus más conocido y empleado es el AcMNPV (*Nucleopolyhedrovirus multicápside de Autographa californica*) es un virus de ADN que infecta insectos para la producción de proteínas recombinantes en células de insectos; su mayor potencial se ha encontrado en la administración de genes mediante la terapia celular con hMSCs(89–93). A pesar del menor rendimiento por los costos y mantenimiento más altos, tiene la ventaja de ser muy específico e incluir las principales modificaciones y requerimientos post-traduccionales para el correcto plegamiento y agregación de proteínas(80).

**- Células de mamíferos:** Las células de mamífero diseñadas genéticamente juegan un papel preponderante desde la investigación básica (estudio de función de genes y mecanismos de regulación) hasta la producción de proteínas recombinantes para la industria farmacéutica (detección de fármacos y proteínas farmacéuticamente activas). Las más comúnmente usadas para la producción de BMPs en sistemas de expresión de mamíferos incluyen células *CHO*, *BSC-1* y *COS7*. Las BMP producidas utilizando el sistema de expresión de mamíferos presentan las características más similares, cuando se comparan con las BMP endógenas originales, ya que este sistema permite todas las etapas de procesamiento de proteínas post-traduccionales, es decir, las células de mamífero tienen la capacidad única de procesar, plegar y modificar auténticamente proteínas humanas secretadas; además que los productos resultantes están libres de contaminantes microbianos, lo que minimiza el riesgo de respuestas inmunogénicas e inflamatorias respectivamente, produciendo así proteínas humanas recombinantes correctamente modificadas (80).

Sin embargo, en comparación con los sistemas alternativos de cultivo celular, son múltiples factores los que afectan la producción de proteínas recombinantes en células de mamíferos entre los cuales podemos mencionar la línea celular específica utilizada junto con el vector de expresión, el sitio de integración cromosómica y el número de copias del gen recombinante integrado, procedimientos de selección, condiciones de cultivo celular y medio empleado(94–97).

En un estudio comparativo desarrollado por la Universidad de Kyoto en Japón, se evaluó la eficacia entre la Proteína Morfogenética Ósea utilizando como sistema de expresión *Escherichia Coli* (ErhBMP-2) y Proteína Morfogenética Ósea utilizando como sistema de expresión células CHO (CrhBMP-2); los resultados del tejido óseo inducido por ErhBMP-2 presentaba una matriz ósea con mucho colágeno y abundante tejido graso, mientras que el inducido por CrhBMP-2 tenía una matriz ósea con poco colágeno y poco tejido graso permitiendo mayor actividad de la fosfatasa alcalina en el primer grupo; a nivel bioquímico, la actividad fue similar para ambos grupos; de acuerdo con el análisis de densidad ósea

(histomorfometría), resultó que ErhBMP-2 logró inducir eficazmente la formación de hueso(98).

## **8 Aplicaciones clínicas de las BMPs (Aspectos deseables y no deseables como tratamiento de elección)**

Las enfermedades y los accidentes, con frecuencia dan como resultado fracturas o defectos óseos de tamaño crítico y su manejo a veces requiere de un tratamiento especial, es por esto que el tratamiento de fracturas y la reconstrucción de defectos óseos sigue siendo un gran desafío para ortopedistas, traumatólogos y cirujanos maxilofaciales. Sin embargo, desde el descubrimiento de las BMPs se ha demostrado que son los factores de crecimiento más eficaces para mejorar la cicatrización de las fracturas(7,8). Estas proteínas presentan además un enorme potencial multifuncional y efectos benéficos para el uso en el tratamiento de diversos defectos óseos(99). No obstante, deben estar asociadas a un sistema de administración eficaz para ejercer y mantener su actividad biológica en el sitio quirúrgico de una manera controlada, evitando así la difusión sistémica(9,100).

En la mayoría de los casos, las BMPs han mostrado su eficacia para revertir las condiciones patológicas en ortopedia y odontología, disminuyendo la morbilidad quirúrgica, el tiempo de hospitalización y la necesidad de re-intervenciones quirúrgicas para correcciones anatómicas, mejorando así la calidad de vida del paciente(101–104). La disponibilidad de BMP recombinantes humanas y la aprobación clínica a través de la Agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos, productos biológicos y derivados sanguíneos (FDA, como lo indica su nombre en inglés) en conjunto con la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) han requerido la ejecución de exigentes estudios preclínicos y pruebas clínicas, de los cuales, como resultado se permite el uso de la BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) (Comercializada como Infuse®-Medtronic) para fracturas abiertas de la tibia y la fusión intersomática lumbar en adultos y la BMP 7 recombinante humana (rhBMP-7) (OP-1®-Stryker) para uniones no tibiales(101–103).

En numerosos estudios donde se establecen tratamientos comparativos de rhBMP-2 contra el tratamiento estándar (injerto de cresta ilíaca) el resultado obtenido permite concluir que la rhBMP-2 presenta menores complicaciones clínicas y mayor mineralización del tejido

óseo afectado durante el período de tratamiento, es decir, con el uso de rhBMP-2 se obtiene una mejor formación ósea y se reduce la morbilidad del tratamiento en comparación con el autoinjerto de cresta ilíaca(104–109).

Sin embargo, a pesar de las ventajas asociadas, sus prometedores resultados y efectividad comprobada, existen aún muchas inquietudes respecto a su uso (entre ellas, la obtención eventual de una baja resistencia mecánica y su elevado rango de liberación inicial). Se han documentado posibles efectos adversos; éstos incluyen osteólisis, aumento sérico de las concentraciones de anticuerpos anti-BMP, radiculitis e hinchazón de tejidos blandos(110–112), formación de hueso ectópico(113); aunque la causa no está clara, existen también fuertes evidencias de que el uso de BMP-2 se asocia con un mayor riesgo de eyaculación retrógrada(114,115). Todas estas preocupaciones llevan a la necesidad de seguir con investigaciones que permitan entender la razón de dichos efectos colaterales(116,117).

Aunque está comprobada la formación de hueso a partir de la administración o entrega de las BMP a través de diversos tipos de biomateriales, bien sean de origen sintético o natural, éstos deben poseer la habilidad de inducir una respuesta adecuada que pueda permitir la retención de estas proteínas en el sitio de la lesión durante el tiempo necesario facilitando la osteoconducción y sirviendo de estructura para el depósito del hueso nuevo. Las características ideales de estos biomateriales son: deben inducir una respuesta inflamatoria adecuada, ser completamente biodegradable y presentar una porosidad óptima para la infiltración y la proliferación de células y el crecimiento de vasos sanguíneos en el sitio de la formación de hueso nuevo, evitar la degradación de las BMP manteniendo su bioactividad y permitir una liberación sostenida de forma controlada para promover la formación de hueso nuevo en el sitio del defecto. Por último, debe esterilizarse fácilmente, fácil de manipular y estable cuando se almacena y ser comercialmente viable, permitiendo la producción a mayor escala(118,119).

A continuación, se presenta un análisis respectivo a los procedimientos quirúrgicos en los cuales, las BMP se emplean con mayor frecuencia y en los que se ha evidenciado efectividad en el tratamiento.

## 8.1 Análisis estudios comparativos BPM en procedimientos quirúrgicos

De acuerdo con los criterios descritos en la metodología, la búsqueda de información para el uso de BMP en reparación de fracturas y cirugía de columna se presenta la siguiente información (Tabla 3).

Tabla 3. Aplicación de BMP en la reparación de fracturas, estudios clínicos

Autor y año de ejecución	Proteína utilizada	Dosis	Sitio de Aplicación	Resultado	Eventos Adversos
Friedlaender 2001(120)	BMP-7	3.5 mg/ml	Tibia	Positivo	Ninguno
Govender 2002(121)	BMP-2	0.75 mg/ml 1.5 mg/ml	Tibia	Positivo	Ninguno
Jones 2006(122)	BMP-2	1.5 mg/ml	Tibia	Positivo	Ninguno
Aro 2011(123)	BMP-2	1.5 mg/ml	Tibia	Similar	Infección
Tressler 2011(47)	BMP-2	12 mg/cm <sup>2</sup>	Múltiples sitios	Positivo	Ninguno
Lyon 2013(113)	BMP-2	1 mg/ml 2 mg/ml	Tibia	Similar	Edema, formación de hueso ectópico, dolor
Goode 2014(124)	BMP-2	N/A	Columna vertebral	N/A	Disfagia, complicaciones neurológicas
Poorman 2016(125)	BMP-2	8.75 mg/ml	Columna vertebral	Positivo	Complicaciones neurológicas

En cabeza de prestigiosas universidades y centros de investigación, se dio inicio a una serie de estudios prospectivos, controlados aleatorizados con el objetivo de recolectar evidencias en el uso de las BMPs. Fue así como en 2001 un estudio liderado por Friedlaender de la

Universidad de Yale (E.E.U.U.), 122 pacientes con pseudoartrosis tibial, fueron divididos en dos grupos: un grupo sometido a tratamiento mediante la inserción de una barra intramedular acompañada de BPM en un transportador de colágeno de tipo I y el otro grupo sometido a tratamiento con autoinjerto óseo. Nueve meses después, los estudios clínicos y radiográficos en el 75% de los pacientes del primer grupo y en el 84% de los pacientes del segundo grupo, mostraron que los resultados eran positivos sin una diferencia estadísticamente significativa(120). El siguiente año, 2002, el departamento de ortopedia de la Universidad Natal en Sudáfrica, evaluó la seguridad y eficacia de las BPM en un grupo de 450 pacientes divididos aleatoriamente en 3 grupos bajo las siguientes condiciones, grupo I: 151 pacientes recibiendo una dosis de 0.75 mg/ml en un transportador de colágeno, grupo II: 149 pacientes recibiendo una dosis de 1.5 mg/ml en un transportador de colágeno y el grupo III: grupo control con solo una barra intramedular en el sitio afectado. Luego de 12 meses de tratamiento, los resultados demostraron ser seguros y efectivos para la consolidación de fracturas tibiales con dosis de 1.5 mg/ml; la frecuencia de las intervenciones secundarias, y las infecciones fueron relativamente menores(121).

Cuatro años más tarde, en el 2006, Jones, de la Universidad de Texas, y sus colaboradores, investigaron el tratamiento de fracturas tibiales asociadas con pérdida ósea sustancial en 30 pacientes, clasificándolos así: 15 pacientes con injerto óseo autólogo y 15 pacientes con BMP en combinación con aloinjerto. Los resultados para ambos tratamientos demuestran ser seguros y efectivos, y no hubo diferencia significativa en la tasa de curación 12 meses después del tratamiento(122). Años después, más exactamente 2011, Aro y colaboradores, en la Universidad de Turku, en el Hospital de Finlandia, evaluaron el uso de BMP en el tratamiento de fracturas tibiales abiertas agudas tratadas con fijación de clavo intramedular. En ese estudio, se evaluaron 277 pacientes, clasificados de la siguiente manera, 136 pacientes con injerto óseo autólogo y 139 pacientes con BMP en combinación con aloinjerto. Los resultados mostraron que no hubo incremento alguno en el proceso de cicatrización de la fractura con la adición de la BMP, siendo este grupo, el de mayor incidencia en infección durante el proceso(123).

Tressler y colaboradores desde Vanderbilt University, Tennessee, hicieron también una comparación de los tratamientos realizados a un grupo de 89 pacientes con 93 situaciones comprobadas de no unión en el proceso de cicatrización de una fractura, divididos así: 74 pacientes fueron tratados con injerto óseo autólogo y 19 pacientes tratados con BMP en combinación con aloinjerto. En el estudio se encontró que no hubo incremento alguno estadísticamente significativo en el proceso de cicatrización de la fractura con la adición de la BMP; sin embargo, la evidencia del estudio sugiere que el tratamiento con BMP podría ofrecer ventajas potenciales sobre el injerto óseo autólogo, como la reducción del tiempo operatorio y la pérdida de sangre intraoperatoria(47). Aparece entonces en el año 2013 Lyon y colaboradores, que evaluaron un grupo de pacientes con fracturas tibiales, un grupo con barra intramedular en el sitio afectado y aplicación de BMP, otro grupo con una nueva formulación de matriz de fosfato de calcio inyectable y un último grupo con fijación de clavo intramedular como control; no hubo diferencias significativas con o sin BMP en dicho tratamiento(113).

Para el año 2014 Goode y colaboradores, investigaron acerca de las complicaciones y eventos adversos que pudieron ocurrir luego de un año de uso durante las fusiones de columna vertebral. Solo en los E.E.U.U. en el período comprendido de 2002 – 2009 fueron realizados un estimado de 1.3 millones de procedimientos de columna vertebral. Los resultados dieron muestra de que los pacientes que recibieron tratamiento con BMP tuvieron un mayor riesgo de complicaciones del sistema nervioso y una mayor tasa de reingreso hospitalario y de atención médica, lo que deja en tela de juicio la seguridad y efectividad en el uso de BMP por uso inadecuado o fuera de lo aprobado por las autoridades regulatorias(124). Poorman y su equipo de trabajo, encontraron que el tratamiento para artrodesis realizado con BMP presentó mayores tasas de éxitos; la dosis promedio empleada, fue menor a la recomendada por el fabricante por lo que se recomiendan más estudios para extraer conclusiones adecuadas de la dosificación óptima(125).

En términos generales, la inclusión de las BMP se ha empleado como una valiosa herramienta para el cirujano, pero existen múltiples variables que inciden en la

administración de BMP y que deben mejorarse para una mejor precisión. Entre estas variables podemos mencionar, el sitio de lesión y tipo de hueso afectado, la edad y movilidad del sujeto, el tamaño del defecto a tratar y el mismo proceso natural de eventos que ocurren durante la reparación ósea, además, existen fuertes diferencias en los resultados obtenidos en animales respecto a los resultados dados en humanos. Por los resultados obtenidos en los estudios clínicos de estas proteínas, se puede afirmar que son el estándar para el tratamiento de patologías óseas complicadas. No obstante, debido a distintas limitaciones clínicas, principalmente su corta vida media *in vivo* (1-4 horas), la degradación por enzimas y la reducción de su actividad biológica originada por los posibles cambios de pH, las tecnologías deben ser mejoradas significativamente(109, 110).

Otro punto crítico son los sistemas o mecanismos empleados para la entrega de la BMP (sistemas de administración), éstos deben ser fundamentales, pues deben permitir hacer la entrega de la dosis correcta durante el período de tiempo adecuado para que las células formadoras de tejido regenerativo migren al área lesionada a cumplir su función. Una vez se logren subsanar estos aspectos, la variedad de BMPs puede ofrecer una gran promesa para la futura medicina regenerativa(127). Un área bastante activa de la investigación con BMP tiene que ver con el desarrollo o mejoramiento del sistema de administración, éste debe brindar condiciones excepcionales para estimular el reclutamiento y adhesión celular con el fin de potencializar la angiogénesis; no debe producir reacciones inmunitarias o tóxicas que puedan torpedear el proceso de reparación, debe permitir una mejor entrega con el fin de disminuir la cantidad de dosis y con ello aminorar los efectos adversos(128,118,119).

Finalmente vale la pena mencionar que los resultados impresionantes respecto a la cicatrización de fracturas en un sinnúmero de estudios (105, 106, 129, 130) deben ser interpretados o analizados con precaución debido a que estos estudios manejan muestras poblacionales pequeñas y carentes de grupos de control; si bien los estudios realizados describen hallazgos positivos y prometedores en el uso de las BPM, aún se presentan resultados mixtos en términos de eficacia; sigue siendo una gran incógnita el hecho de lograr reproducir en humanos de una manera fiable o convincente, los resultados obtenidos

en animales. Se hace necesaria más investigación con estudios comparativos bien diseñados para confirmar los hallazgos prometedores y comprender el potencial real en términos de este enfoque biológico para favorecer la cicatrización ósea.

## **9 BMPs, análisis, discusión y perspectivas a futuro**

El descubrimiento de BMPs marcó el comienzo de una nueva era no sólo en la comprensión de la fisiología ósea, sino también en el desarrollo de nuevos métodos para el tratamiento de los defectos que requieren cirugía ortopédica, maxilofacial y otras situaciones clínicas. La regeneración ósea y la reparación con BMPs están liderando una nueva era en la reconstrucción ortopédica y craneofacial. Actualmente grandes cantidades de proteínas se producen a través de la ingeniería genética, en particular a través de células transgénicas bacterianas, de levaduras y de animales; lo que permite desarrollar más estudios sobre su papel en el crecimiento y metabolismo celular.

Las proteínas morfogenéticas de hueso son producto de los osteoblastos con la capacidad de desencadenar un sinnúmero de eventos celulares, que permiten el estímulo de múltiples células conectivas para lograr la formación de células osteoprogenitoras; así participan activamente en la producción de hueso, lo que se ha convertido en un aliado fundamental para el tratamiento de fracturas abiertas, aplicaciones odontológicas, pseudoartrosis, defectos óseos, osteoporosis, fusión espinal, entre otros, o se han usado como complemento a diversos tratamientos en el ámbito quirúrgico, reduciendo el costo del mismo.

Los resultados existentes en múltiples estudios sobre diferentes tratamientos con BMP, respaldan algunas aplicaciones terapéuticas; sin embargo, la dosis terapéuticas suprafisiológicas empleadas durante el tratamiento han reportado efectos adversos, entre los que resaltan el desarrollo de anticuerpos, la formación de hueso ectópico, entre otros por lo que existen aún varias preguntas que no se han logrado dilucidar, una de las cuales es, por qué las terapias BMP usan cantidades de microgramos mientras que las BMP endógenas actúan a nivel de nanogramos?.

Algunos retos críticos para los investigadores, están en la depuración y puesta a punto de los sistemas de entrega de estos factores osteoinductivos, la bioseguridad, la rentabilidad, la facilidad de uso y el plazo de entrega óptimo también deben abordarse de manera tal que garantice el éxito clínico; los avances en la investigación de nuevos materiales con factores bioactivos predicen un futuro bastante prometedor en el campo de la Bioingeniería y la

Medicina Regenerativa. Se requieren estrategias combinadas para mejorar sustancialmente la formación ósea y facilitar la cicatrización, mediante el uso simultáneo de otros factores de crecimiento y matrices inteligentes o portadores adecuados que puedan ofrecer la detección de los cambios de pH en el sitio de aplicación y de acuerdo a esto posibles estrategias de liberación controlada reduciendo las altas concentraciones de BMPs y de esta manera lograr guiar la osteogénesis de una forma predecible y controlable.

Del mismo modo, los avances en el campo de los biomateriales también aumentarán los posibles enfoques de la Ingeniería Tisular para el suministro de BMP en el tratamiento de los defectos óseos. Nuevas tácticas, como las nanopartículas, los biopolímeros y los sistemas inyectables, permitirán el suministro limitado, dirigido y específico de BMPs con factores angiogénicos y células que podrían potencialmente aumentar la velocidad, el volumen y la calidad del hueso recién formado asegurando un futuro prometedor más allá de la presente década para millones de pacientes en todo el mundo.

Los estudios futuros tendrán que enfocarse en el desarrollo de materiales y sistemas de entrega controlables, bien sea, localizables y de liberación modificada con perfiles de liberación del factor de crecimiento ajustable según el sitio, el tamaño y la vascularidad del defecto, sin aumentar su dosis. Estos sistemas de administración inteligente proporcionarán BMPs y otros factores de crecimiento en respuesta a requerimientos fisiológicos, teniendo la capacidad de detectar cambios en el microambiente del defecto óseo y, en consecuencia, alterar la liberación de la proteína para llevar a mejores y más seguros resultados.

El uso de las BMPs durante el proceso de regeneración de tejido óseo es todavía muy controversial, dada la naturaleza compleja de la osteoregeneración. Se ha demostrado que puede ser posible la entrega de diferentes factores de crecimiento con diferentes características de liberación, en la búsqueda de respuestas tanto estimuladoras como inhibitorias sobre la formación ósea, siendo el enfoque clínico más deseable, con precaución a la elección de combinaciones. Este sistema puede representar un paso fundamental para la personalización de la cinética de liberación de dichas proteínas.

## Conclusiones

Aunque el conocimiento del mecanismo molecular por el cual los TGF- $\beta$  fomentan la regeneración ósea ha sido ampliamente estudiado y se discute en el presente documento, los eventos moleculares por los cuales se presentan efectos colaterales no deseados, aún no han sido completamente esclarecidos. Luego de casi 50 años de estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*, nuestro entendimiento de las ventajas y desventajas acerca de las BMP parece está lejos de haber llegado a un fin completamente satisfactorio, y se necesita más investigación antes de poder sacar conclusiones definitivas.

Desde su descubrimiento y evidencia de su eficacia *in vitro* e *in vivo* hasta la producción por Ingeniería Genética Recombinante, han sido muchos años de investigación, muchos casos exitosos en estudios animales y preclínicos en los que la participación de las BMP en la formación de hueso es indiscutible, sin embargo las pruebas clínicas en humanos siguen siendo la limitante para obtener resultados convincentes y veraces sobre dosis, tiempo de tratamiento, dinámica de entrega y liberación en el sitio afectado y portadores o sistemas de administración idóneos para tal fin; las investigaciones futuras, preclínicas y clínicas, deberían estar encausadas para entender los mecanismos moleculares implícitos en la formación ósea, de tal modo que se puedan desarrollar tratamientos eficaces y seguros.

El uso adecuado de las BMP ha demostrado ser seguro y efectivo si se maneja bajo las indicaciones aprobadas por FDA y EMA, ya que dependiendo del sitio de aplicación y del estado médico del paciente (presencia de comorbilidades) existirán así mayores probabilidades de complicaciones o efectos colaterales indeseados. Es por esto que su uso debe ser de común acuerdo a expensas de la relación riesgo – beneficio para el paciente.

Sigue siendo muy controvertido el uso de BMP a pesar de los hallazgos positivos descritos en varios de los estudios realizados, los resultados mixtos en términos de eficacia ponen en tela de juicio la evidencia clínica para el tratamiento de fracturas. Es necesaria una investigación con estudios mejor diseñados que no sean heterogéneos, permitiendo de esta manera una mejor comprensión del enorme potencial de dichas proteínas. Entender de una

manera más clara la maquinaria de señales, procesos, intercambios y condiciones que adecúa el organismo durante el proceso de regeneración ósea, nos permitirá establecer que un enfoque único como estrategia de regeneración ósea, no puede soportar muchos de los requisitos del tejido mismo por lo que serán necesarias estrategias refinadas y dirigidas de acuerdo con el sitio o problema a resolver.

## Bibliografía

1. Gimeno J, Jódar E. Epidemiología de las fracturas osteoporóticas. Mortalidad y morbilidad Fractura de Cadera. *Rev Osteoporos Metab Min.* 2010;2(Supl 4):5–9.
2. Zimmermann G, Wagner C, Schmeckenbecher K, Wentzensen A, Moghaddam A. Treatment of tibial shaft non-unions: bone morphogenetic proteins versus autologous bone graft. *Injury.* Elsevier Ltd; 2009;40 Suppl 3:S50–3.
3. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 2003;81(9):646–56.
4. WHO | Road traffic injuries. WHO [Internet]. World Health Organization; 2017 [cited 2017 Oct 1]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs358/en/>
5. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12):1392–404.
6. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis P V. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011;9(16):1–10.
7. Komatsu DE, Warden SJ. The control of fracture healing and its therapeutic targeting: Improving upon nature. *J Cell Biochem.* 2010;109(2):302–11.
8. Giannoudis P V, Einhorn TA. Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury.* Elsevier Ltd; 2009;40 Suppl 3:S1-3.
9. Blokhuis TJ. Formulations and delivery vehicles for bone morphogenetic proteins: latest advances and future directions. *Injury.* Elsevier Ltd; 2009;40 Suppl 3:S8-11.
10. Bollo A, Lewis J. Different forms of bone grafts. *J foot ankle Surg.* 1996;35(5):400–5.
11. Giannoudis P V., Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury.* 2005;36(3):S20–7.
12. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;355S(355):86–103.
13. Braddock M, Houston P, Campbell C, Ashcroft P. Born again bone: tissue engineering for bone repair. *News Physiol Sci.* 2001;16(October):208–13.

14. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev.* 1986;66(4):855–86.
15. Masquelet AC, Begue T. The Concept of Induced Membrane for Reconstruction of Long Bone Defects. *Orthop Clin North Am.* Elsevier Ltd; 2010;41(1):27–37.
16. Manoj BP and R. Bone injury, healing and grafting. In *Basic Orthopaedic Sciences. The Stanmore Guide.* Ramachandr. London: Hodder Arnold; 2007. 123-134 p.
17. Einhorn RMTA. The Biology of Fracture Healing. *Injury.* 2011;42(6):551–5.
18. Shimono K, Oshima M, Arakawa H, Kimura A, Nawachi K, Kuboki T. The effect of growth factors for bone augmentation to enable dental implant placement: A systematic review. *Jpn Dent Sci Rev.* 2010;46(1):43–53.
19. DiGirolamo DJ, Clemens TL, Kousteni S. The skeleton as an endocrine organ. *Nat Rev Rheumatol.* Nature Publishing Group; 2012;8(11):674–83.
20. González-Rozas M, Pérez Castrillón JL. Regulación endocrina del metabolismo energético a través del hueso. *Rev Osteoporos y Metab Miner.* 2014;6(2):57–62.
21. Shao J, Wang Z, Yang T, Ying H, Zhang Y, Liu S. Bone regulates glucose metabolism as an endocrine organ through osteocalcin. *Int J Endocrinol.* 2015;2015.
22. Guntur AR, Rosen CJ. Bone as an Endocrine Organ. *Cell Endocrinol Heal Dis.* 2012;18(5):758–62.
23. Wolf J. Das Gesetz der Transformation der Knochen. *Dtsch Med Wochenschrift.* 1982;(47):1222–4.
24. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8(1):455–98.
25. Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological Basis of Bone Formation, Remodeling, and Repair—Part I: Biochemical Signaling Molecules. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(3):259–73.
26. Young MF. Bone matrix proteins: More than markers. *Calcif Tissue Int.* 2003;72(1):2–4.
27. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med oral, Patol oral y cirug??a bucal.* 2006;11(1):47–51.

28. Friedenstein AJ. Precursor Cells of Mechanocytes. *Int Rev Cytol.* 1976;47(C):327–59.
29. Harada S, Rodan G a. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349–55.
30. Simonet W., Lacey D., Dunstan C., Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell.* 1997;89(2):309–19.
31. José A. Andrades, Lucía Narváez-Ledesma, Luna Cerón-Torres, Anyith P. Cruz-Amaya, Daniel López-Guillén MLM-A and JAM-M. Bone Engineering: A Matter of Cells, Growth Factors and Biomaterials. In: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering.* 2013. p. 615–41.
32. Bozal CB. *Biología del osteocito.* 2006;2(1):19–21.
33. Parra-Torres A, Valdés-Flores M. Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Top Osteoporos.* 2013;1–28.
34. Mundy GR. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res.* 1993;8 Suppl 2:S505-10.
35. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93(2):165–76.
36. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* Nature Publishing Group; 2013;19(2):179–92.
37. Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10(5):223–8.
38. Shirley D, Marsh D, Jordan G, McQuaid S, Li G. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *J Orthop Res.* 2005;23(5):1013–21.
39. Hutchinson M, Mallatt J, Marieb EN, Wilhelm PB, Hutchings RT, Zanetti NC, et al. A brief atlas of the human body. *Human Anatomy & Physiology, 7th Edition* [Internet]. 2007 [cited 2017 Oct 1]. 129 p. Available from: <https://www.pearson.com/us/higher-education/product/Marieb-Human-Anatomy-Physiology-7th-Edition/9780805359091.html>

40. Werner S GR. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003;83:835–70.
41. Fracture & Repair - ms. gallagher's classroom [Internet]. [cited 2017 Oct 1]. Available from: <http://msgallagherlhs.weebly.com/fracture--repair.html>
42. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86–A(7):1541–58.
43. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 2004;4(8):743–65.
44. Laurencin CT, Ambrosio A, Borden M, Cooper Jr. J. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 1999;1:19–46.
45. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Res* [Internet]. Sichuan University; 2013;1(3):216–48. Available from: <http://www.nature.com/articles/boneres201317>
46. Jiang XQ, Sun XJ, Lai HC, Zhao J, Wang SY, Zhang ZY. Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone complex with  $\beta$ -TCP and BMP-2 gene-modified bMSCs in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(12):1333–40.
47. Tressler MA, Richards JE, Sofianos D, Comrie FK, Kregor PJ, Obrebsky WT. Bone Morphogenetic Protein-2 Compared to Autologous Iliac Crest Bone Graft in the Treatment of Long Bone Nonunion. *Orthopedics.* 2011;34(12):877–84.
48. Wei S, Cai X, Huang J, Xu F, Liu X, Wang Q. Recombinant Human BMP-2 for the Treatment of Open Tibial Fractures. *Orthopedics.* 2012;35(6):e847–54.
49. Muschler GF, Midura RJ, Nakamoto C. Practical Modeling Concepts for Connective Tissue Stem Cell and Progenitor Compartment Kinetics. *J Biomed Biotechnol.* 2003;2003(3):170–93.
50. Winickoff DE, Saha K, Graff GD. Opening Stem Cell Research and Development: A Policy Proposal for the Management of Data, Intellectual Property, and Ethics. *Yale J Health Policy Law Ethics.* 2013;9(1):52–127.
51. Brindley DA, Reeve BC, Sahlman WA, Bonfiglio GA, Davie NL, Culme-Seymour EJ, et al. The impact of market volatility on the cell therapy industry. *Cell Stem Cell.* Elsevier Inc.; 2011;9(5):397–401.

52. Watatani K, Xie Z, Nakatsuji N, Sengoku S. Global competencies of regional stem cell research: bibliometrics for investigating and forecasting research trends. *Regen Med.* 2013;8(5):659–68.
53. Lin CL, Ho Y-S. A Bibliometric Analysis of Publications on Pluripotent Stem Cell Research. *Cell J.* 2015;17(1):59–70.
54. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clin Orthop Relat Res.* 1965;150(395):4–10.
55. Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor  $\beta$  Superfamily During Murine Fracture Healing. *J Bone Miner Res.* 2002;17(3):513–20.
56. Sánchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, ten Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone.* Elsevier B.V.; 2015;80:43–59.
57. Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(12):7599–603.
58. Mabie, Mehler, Kessler. Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J Neurosci.* 1999;19(16):7077–88.
59. Kirker-Head C. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;43(1):65–92.
60. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM WE. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.
61. Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys.* Elsevier Inc.; 2014;561:64–73.
62. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone Morphogenetic Protein-1: The Type I Procollagen C-Proteinase. *Science (80- ).* 1996;271(5247):360–2.
63. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. *Cell Signal.* Elsevier Inc.; 2011;23(4):609–20.

64. Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone Morphogenetic Protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362:550–3.
65. Hinck AP. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors - Insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies;* 2012;586(14):1860–70.
66. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol.* 2000;142(1):9–21.
67. Rao SM, Ugale GM, Warad SB. Bone morphogenetic proteins: Periodontal regeneration. *N Am J Med Sci.* 2013;5(3):161–8.
68. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal.* 2004;16(3):291–9.
69. Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(3):651–7.
70. Carreira ACO, Zambuzzi WF, Rossi MC, Filho RA, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: Promising Molecules for Bone Healing, Bioengineering, and Regenerative Medicine. *Vitam Horm.* 2015;99:293–322.
71. Moustakas A. Non-Smad TGF- signals. *J Cell Sci.* 2005;118(16):3573–84.
72. Wilkes MC, Leof EB. Transforming growth factor  $\beta$  activation of c-Abl is independent of receptor internalization and regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and PAK2 in mesenchymal cultures. *J Biol Chem.* 2006;281(38):27846–54.
73. Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2016 Jun 1;8(6):a021899.
74. Riley EH, Lane JM, Urist MR, Lyons KM, Lieberman JR. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res [Internet].* 1996 Mar [cited 2017 Oct 12];(324):39–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8595775>
75. Gao T, Lindholm TS, Marttinen A, Urist MR. Orthopaedics Original article Composites of bone morphogenetic protein ( BMP ). 1996;321–5.
76. Bustos-Valenzuela JC, Halcsik E, Bassi ÊJ, Demasi MA, Granjeiro JM, Sogayar MC. Expression, purification, bioactivity, and partial characterization of a recombinant human bone morphogenetic protein-7 produced in human 293T cells.

- Mol Biotechnol. 2010;46(2):118–26.
77. Bessho K, Kusumoto K, Fujimura K, Konishi Y, Ogawa Y, Tani Y, et al. Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1999;37(1):2–5.
  78. 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. Elsevier Inc.;* 2009;63(2):89–94.
  79. Long S, Truong L, Bennett K, Phillips A, Wong-Staal F, Ma H. Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2006;46(2):374–8.
  80. Brondyk WH. Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. 1st ed. *Methods in Enzymology.* Elsevier Inc.; 2009. 131-147 p.
  81. Hung CW, Koudelka T, Anastasi C, Becker A, Moali C, Tholey A. Characterization of post-translational modifications in full-length human BMP-1 confirms the presence of a rare vicinal disulfide linkage in the catalytic domain and highlights novel features of the EGF domain. *J Proteomics. Elsevier B.V.;* 2016;138:136–45.
  82. Zerbs S, Frank AM, Collart FR. Chapter 12 Bacterial Systems for Production of Heterologous Proteins. 1st ed. *Methods in Enzymology.* Elsevier Inc.; 2009. 149-168 p.
  83. Sharapova NE, Kotnova a. P, Galushkina ZM, Lavrova N V., Poletaeva NN, Tukhvatulin a. E, 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.* 2010;44(6):923–30.
  84. Pramesti HT, Suciati T, Indrayati A, Asjarie S, Retnoningrum DS. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: Optimization of Overproduction, Solubilization, Renaturation and Its Characterization. 2012. p. 133–43.
  85. Yuvaraj S, Al-Lahham SH, Somasundaram R, Figaroa PA, Peppelenbosch MP, Bos NA. *E. coli*-produced BMP-2 as a chemopreventive strategy for colon cancer: A proof-of-concept study. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012.
  86. Vallejo LF, Brokelmann M, Marten S, Trappe S, Cabrera-Crespo J, Hoffmann A, et

- al. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2002;94(2):185–94.
87. Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T. Chapter 13 Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. 1st ed. *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2009. 169-189 p.
  88. Ling C, Yi-De H, Yan-Ding Z. Expression and Secretion of Human Bone Morphogenetic Protein-7 in *Pichia pastoris*. *CHINESE J Biotechnol Chin J Biotech*. 2006;22(226):907–13.
  89. Chuang CK, Sung LY, Hwang SM, Lo WH, Chen HC, Hu YC. Baculovirus as a new gene delivery vector for stem cell engineering and bone tissue engineering. *Gene Ther*. 2007;14(19):1417–24.
  90. Jarvis DL. Chapter 14 Baculovirus-Insect Cell Expression Systems. 1st ed. *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2009. 191-222 p.
  91. Hu Y-C. Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Curr Gene Ther*. 2008;8(1):54–65.
  92. Sung LY, Lo WH, Chiu HY, Chen HC, Chung CK, Lee HP, et al. Modulation of chondrocyte phenotype via baculovirus-mediated growth factor expression. *Biomaterials*. 2007;28(23):3437–47.
  93. Lin C-Y, Lu C-H, Luo W-Y, Chang Y-H, Sung L-Y, Chiu H-Y, et al. Baculovirus as a gene delivery vector for cartilage and bone tissue engineering. *Curr Gene Ther*. 2010;10(3):242–54.
  94. Mueller P, Wirth D, Unsinger J, Hauser H. Genetic approaches to recombinant protein production in mammalian cells. *Handb Ind Cell ....* 2003;21–51.
  95. Khan KH. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Adv Pharm Bull*. 2013;3(2):257–63.
  96. 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):139–50.
  97. Bandaranayake AD, Almo SC. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies*; 2014;588(2):253–60.

98. Bessho K, Konishi Y, Kaihara S, Fujimura K, Okubo Y, Iizuka T. Bone induction by *Escherichia coli* -derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000;38(6):645–9.
99. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Bigham-Sadegh A. Bone morphogenetic proteins: A powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. *BioFactors.* 2014;40(5):459–81.
100. Chen F, Ma Z, Dong G, Wu Z. Composite glycidyl methacrylated dextran (Dex-GMA)/gelatin nanoparticles for localized protein delivery. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(4):485–93.
101. de Oliveira ORG, Martins SPR, de Lima WG, Gomes MM. The use of bone morphogenetic proteins (BMP) and pseudarthrosis, a literature review. *Rev Bras Ortop (English Ed.* 2016;2(x x).
102. Granjeiro JM, Granjeiro JM, Oliveira RC, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Bustos-Valenzuela JC, et al. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brazilian J Med Biol Res.* 2005;38(10):1463–73.
103. Davies SD, Ochs MW. Bone Morphogenetic Proteins in Craniomaxillofacial Surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* Elsevier Ltd; 2010;22(1):17–31.
104. Chin M, Ng T, Tom WK, Carstens M. Repair of alveolar clefts with recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) in patients with clefts. *J Craniofac Surg.* 2005;16(5):778–89.
105. Herford AS, Boyne PJ, Rawson R, Williams RP. Bone Morphogenetic Protein-Induced Repair of the Premaxillary Cleft. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(11):2136–41.
106. Dickinson BP, Ashley RK, Wasson KL, O’Hara C, Gabbay J, Heller JB, et al. Reduced Morbidity and Improved Healing with Bone Morphogenic Protein-2 in Older Patients with Alveolar Cleft Defects. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(1):209–17.
107. Canan LW, da Silva Freitas R, Alonso N, Tanikawa DYS, Rocha DL, Coelho JCU. Human Bone Morphogenetic Protein-2 Use for Maxillary Reconstruction in Cleft Lip and Palate Patients. *J Craniofac Surg.* 2012;23(6):1627–33.

108. Alonso N, Tanikawa DYS, Freitas R da S, Canan, Lady, Ozawa TO, Rocha DL. Evaluation of Maxillary Alveolar Reconstruction Using a Resorbable Collagen Sponge with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Cleft Lip and Palate Patients. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(5):1183–9.
109. Hofstetter CP, Hofer AS, Levi AD. Exploratory meta-analysis on dose-related efficacy and morbidity of bone morphogenetic protein in spinal arthrodesis surgery. *J Neurosurg Spine*. 2016;24(3):457–75.
110. Lewandrowski K-U, Nanson C, Calderon R. Vertebral osteolysis after posterior interbody lumbar fusion with recombinant human bone morphogenetic protein 2: A report of five cases. *Spine J*. 2007;7(5):609–14.
111. Balseiro S, Nottmeier EW. Vertebral osteolysis originating from subchondral cyst end plate defects in transforaminal lumbar interbody fusion using rhBMP-2. Report of two cases. *Spine J*. Elsevier Inc; 2010;10(7):e6–10.
112. McClellan JW, Mulconrey DS, Forbes RJ, Fullmer N. Vertebral Bone Resorption After Transforaminal Lumbar Interbody Fusion With Bone Morphogenetic Protein (rhBMP-2). *J Spinal Disord Tech*. 2006;19(7):483–6.
113. Lyon T, Scheele W, Bhandari M, Koval KJ. Efficacy and Safety of Recombinant Human Bone Matrix for Closed Tibial Diaphyseal Fracture. *J Bone Jt Surg Am*. 2013;95(23):2088–97.
114. Carragee EJ, Mitsunaga KA, Hurwitz EL, Scuderi GJ. Retrograde ejaculation after anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2: A cohort controlled study. *Spine J*. Elsevier Inc; 2011;11(6):511–6.
115. Comer GC, Smith MW, Hurwitz EL, Mitsunaga KA, Kessler R, Carragee EJ. Retrograde ejaculation after anterior lumbar interbody fusion with and without bone morphogenetic protein-2 augmentation: A 10-year cohort controlled study. *Spine J*. Elsevier Inc; 2012;12(10):881–90.
116. Forriol F. Proteínas morfogenéticas Óseas y su aplicación clínica. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. Elsevier; 2010;54(SUPPL. 1):2–10.
117. Gómez-Barrena E, Orozco-Delclós L, Munuera-Martínez L. Agentes locales en la consolidación ósea: perspectivas para el futuro. *Rev Ortop y Traumatol*. Elsevier; 2006;50:22–9.

118. Haidar ZS, Hamdy RC, Tabrizian M. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part A: Current challenges in BMP delivery. *Biotechnol Lett.* 2009;31(12):1817–24.
119. Sheikh Z, Javaid M, Hamdan N, Hashmi R. Bone Regeneration Using Bone Morphogenetic Proteins and Various Biomaterial Carriers. *Materials (Basel).* 2015;8(4):1778–816.
120. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions: A prospective, randomized clinical trial comparing RHOP-1 with fresh bone autograft. *J Bone Jt Surg.* 2001;83(Pt 2):S151-8.
121. 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):2123–34.
122. Jones AL, Bucholz RW, Bosse MJ, Mirza SK, Lyon TR, Webb LX, et al. Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(7):1431–41.
123. Aro HT. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: A Randomized Trial in Open Tibial Fractures Treated with Reamed Nail Fixation. *J Bone Jt Surg.* 2011;93(9):801.
124. Goode AP, Richardson WJ, Schectman RM, Carey TS. Complications, revision fusions, re-admissions and utilization over a one-year period following bone morphogenetic protein use during primary cervical spine fusions. *Spine J.* 2014;14(9):2051–2059.
125. Poorman GW, Jalai CM, Boniello A, Worley N, McClelland S, Passias PG. Bone morphogenetic protein in adult spinal deformity surgery: a meta-analysis. *Eur Spine J.* 2017;26(8):2094–102.
126. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins. *J Dent Res.* 2014;93(4):335–45.

127. Begam H, Nandi SK, Kundu B, Chanda A. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Mater Sci Eng C. Elsevier B.V.*; 2017;70:856–69.
128. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol. Nature Publishing Group*; 2014;11(1):45–54.
129. Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81(4):710–8.
130. Maniscalco P, Gambera D, Bertone C, Rivera F, Crainz E, Urgelli S. Healing of fresh tibial fractures with OP-1. A preliminary report. *Acta Biomed.* 2002;73(1–2):27–33.