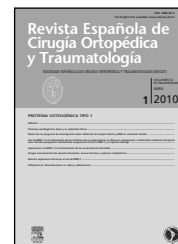


Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología

www.elsevier.es/rot



PROTEÍNA OSTEOGÉNICA TIPO 1

Proteínas morfogénicas óseas y su aplicación clínica

F. Forriol

Unidad de Investigación, Hospital FREMAP, Majadahonda, Madrid, España

PALABRAS CLAVE

BMP;
BMP-7;
Factores de crecimiento;
Seudoartrosis;
Hueso

Resumen

Las proteínas morfogénicas óseas (BMP: rhBMP-2 y rhBMP-7) se han introducido en el uso quirúrgico, durante los últimos años, para el tratamiento de las pseudoartrosis de los huesos largos y en la artrodesis vertebral. Sin embargo, sus buenos resultados y el interés despertado han promovido numerosos trabajos experimentales y propuestas para aumentar sus indicaciones a otras enfermedades y situaciones. Analizar su coste, su eficacia, el transportador más adecuado para cada situación y la combinación con otros elementos es uno de los retos que tiene planteados la investigación en cirugía ortopédica.

© 2010 SECOT. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

BMP;
BMP-7;
Growth factors;
Pseudoarthrosis;
Bone

Bone morphogenetic protein and its clinical application

Abstract

Bone morphogenetic protein (BMP: rhBMP-2 and rhBMP-7) have been introduced into the surgical use, in recent years, for the treatment of pseudoarthrosis of long bones and spinal fusion. However, its success and interest have promoted numerous experimental and proposals to increase its indications to other diseases and conditions. Analyze the cost, effectiveness, the carrier most appropriate for each situation and the combination with other elements is one of the challenges facing research in orthopedic surgery.

© 2010 SECOT. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Urist^{1,2} y más tarde otros autores^{3,4} señalaron que el hueso desmineralizado induce la formación ósea heterotópica. Achacaron este fenómeno, denominado osteoinducción, a una sustancia propia de la matriz ósea que transforma células no osteogénicas en osteoblastos bajo la influencia de las proteínas morfogénicas óseas (BMP). Sin embargo, la capacidad osteogénica de la matriz de hueso descalcificada se ha exagerado, por los datos experimentales provenientes de roedores, pues no ocurre en otros animales superiores^{5,6}. Aspenberg et al⁷ no pudieron demostrar la osteoinducción en el hombre y para Schwarz et al⁸ sólo los injertos autogénicos en perros consiguieron una neoformación ósea de forma constante. No podemos olvidar que también la médula ósea representa un injerto lógico y que se indica en el tratamiento de las pseudoartrosis o retardos de consolidación^{9,10}; Burwell et al¹¹ colocaron médula ósea en un músculo paravertebral y observaron la formación de hueso heterotópico (tabla 1).

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas secretadas por las células que actúan sobre una o varias células diana, con una acción concreta, para inducir la división celular o promover la síntesis de matriz extracelular. Esta acción puede ser autocrina, paracrina o endocrina. Por lo tanto, no es de extrañar que los factores de crecimiento tengan efectos en múltiples tipos de células y promuevan una variedad de funciones celulares en tejidos muy distintos¹². Los factores de crecimiento están presentes en la matriz ósea hasta que la remodelación o un traumatismo ocasionan su solubilización y liberación¹³, por lo que el hueso dispone de los factores de crecimiento en el momento y en la cantidad adecuados y su aporte externo es necesario únicamente en condiciones patológicas, retardos de consolidación o pseudoartrosis, en las alteraciones de la vascularización o en técnicas en que se requiere formación de hueso extra, como pueden ser los aloinjertos óseos o las elongaciones.

Cuando el factor de crecimiento se une a un receptor de la célula diana, induce una señal intracelular que alcanza el núcleo y produce una respuesta biológica. La mayor parte de los factores de crecimiento se unen a receptores específicos

y la respuesta será proporcional a la concentración del factor de crecimiento y el número de receptores en cada célula.

Se han descrito numerosos factores de crecimiento relacionados con el aparato locomotor, y se dividen en: a) factores de crecimiento transformantes (TGF); b) factores de crecimiento insulinoideos (IGF); c) factores de crecimiento fibroblásticos (FGF); d) factores de crecimiento plaquetarios (PDGF); e) factores de crecimiento epidérmicos (EGF), y f) otros péptidos activos.

Los llamados factores osteogénicos están envueltos en procesos de formación ósea y remodelación, como quimiotaxis, proliferación y diferenciación de las células formadoras y encargadas de la reabsorción ósea, los vasos, los nervios y los elementos medulares. Los factores de crecimiento como IGF-1 y TGFβ1 tienen un efecto estimulador de la formación de hueso, pero son incapaces de formar hueso ectópico, como ocurre con las BMP¹⁴. La administración sistémica de TGFβ en ratas y conejos produce la formación endostal de hueso e hipertrofia osteoblástica generalizada y tiene un efecto estimulador de la condrogénesis perióstica. Otros factores, como el factor de necrosis tumoral (TNFα), inhiben la actividad osteoblástica y estimulan la actividad osteoclástica y la reabsorción ósea^{15,16}.

Las citocinas son moléculas solubles con una función esencial en las interacciones intercelulares; son un grupo de proteínas de bajo peso molecular secretadas por numerosas células que se unen a receptores específicos. Inician una cascada de señales intracelulares que altera el patrón de expresión génica de la célula diana para producir una respuesta biológica determinada. Según la célula que las produce, se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocito) o interleucinas (IL) (células hematopoyéticas). La producción de citocinas suele ser breve y está limitada a lo que dura el estímulo y se caracterizan por ser pleotrópicas, es decir, tienen múltiples efectos al actuar sobre diferentes células, y varias de ellas pueden producir el mismo efecto. Se pueden dividir en citocinas catabólicas (IL-1, TNFα, IL-17, IL-18), que actúan sobre las células incrementando los productos de degradación de la matriz; citocinas anticatabólicas o inhibitoras (IL-4, IL-10, IL-13), que impiden la actividad de las citocinas catabólicas, y por último, citocinas anabólicas (IGF-1, TGFβ1, β2 y β3, BMP-2, 4, 6, 7, 9 y 13), que actúan como factores de crecimiento y de diferenciación para incrementar la actividad sintética. Además,

Tabla 1 Hitos en el desarrollo de las proteínas morfogenéticas

Autor o empresa	Descubrimiento
Senn, 1889	Hueso descalcificado de buey repara defectos osteomielíticos
Levander, 1934, 1938	Extractos alcohólicos inducen formación ósea
Sharrard y Collins, 1961	Aloinjerto descalcificado en EDTA induce unión vertebral en niños
Urist, 1965	Hueso descalcificado en ácido induce la formación de hueso descalcificado en rata
Sampath y Reddi, 1981	Matriz ósea sin BMP no forma hueso
Johnson et al, 1992	Resultados clínicos con BMP humana purificada
Creative Biomolecules & Genetic Institute, 1995	Secuencia de varias BMP. Disputa por las patentes
Stryker Corp & Medtronic Sofamor Danek, 2002	Aprobación por la FDA de Osigraft® (BMP-7) (Stryker) en defectos de huesos largos. BMP-2 en un <i>carrier</i> de colágeno con un cajetín ALIF (Medtronic Sofamor Danek)

algunas pueden ser clasificadas como moduladoras (IL-6, LIF, IL-11), por su capacidad para regular las actividades de las otras citocinas. Sin embargo, su acción fundamental es dirigir el mecanismo de la inflamación, y así se dividen en proinflamatorias (IL-1, TNF α , IL-8, IL-12, IL-16 y los interferones [IFN] 10, 11 y 12) y antiinflamatorias (IL-10).

Las BMP

Dentro de la familia del TGF están las BMP, inhibinas, activinas, sustancia mülleriana, complejo genético de *Drosophila* y otros factores de diferenciación y crecimiento y polipéptidos reguladores. Las BMP son parte de un complejo sistema de señales que consiste en numerosas moléculas, diferentes tipos de receptores y una cantidad de antagonistas solubles. Las BMP también inducen los osteoclastos y, por lo tanto, la reabsorción y muchas veces esta respuesta precede a la respuesta formadora de hueso¹⁷. Por eso, se ha señalado que el tratamiento con BMP se puede completar con un bisfosfonato para proteger el hueso de la reabsorción^{18,19}, aunque el efecto anabólico y sinérgico de estas dos terapias debe ser estudiado.

Las BMP fueron identificadas inicialmente por su capacidad para inducir la formación heterotópica de hueso en roedores^{1,2,20}. Pero no todas las BMP tienen un comportamiento osteoinductor. Se considera osteoinductoras a las BMP-2, 4, 6 y 7 (Osigraft®). Las BMP son proteínas pleotrópicas con múltiples y diferentes acciones biológicas²¹, ya que regulan la hematopoyesis, estimulan la síntesis de matriz extracelular e influyen en el mantenimiento celular, y también en su muerte o apoptosis, en el crecimiento y diferenciación de condroblastos y osteoblastos *in vitro* y funciones en la morfogénesis de diferentes tejidos y órganos, como son el renal y el nervioso (tabla 2).

Se conocen más de 20 BMP, que se pueden clasificar en subgrupos, en función de su estructura y su función²²; comparando la secuencia de los aminoácidos de las BMP encontradas en los extractos de hueso osteoinducido, se ha visto que corresponden a tres subclases²⁰. La primera subclase incluye BMP-2 y BMP-4, dos moléculas muy relacionadas que

se diferencian en la región aminoterminal. La segunda subclase está compuesta por BMP-5, 6, 7 (Osigraft®) y 8 (OP-2); son proteínas mayores que las anteriores y con un 70% de aminoácidos idénticos entre sí. Por último, el tercer subgrupo incluye la BMP-3 u osteogenina²³ (fig. 1).

Las BMP son los únicos morfógenos, pues estimulan la multiplicación de las células conectivas y son capaces de transformarlas en células osteoprogenitoras²³. Las células, en presencia de BMP-7, se diferencian directamente a osteoblastos evitando el paso intermedio por tejido cartilaginoso y saltando el proceso de osificación endcondral²⁴. Los otros factores, TGF β , IGF, FGF, PDGF y VEGF, inducen la multiplicación celular, pero no pueden diferenciar una célula. Las BMP inducen una cascada de fenómenos que lleva a la osificación endcondral o desmal. También son proteínas morfogénicas de cartílago, ya que éste es el primer paso en la formación ósea²¹. Los extractos de cartílago articular bovino contienen proteínas morfogénicas derivadas del cartílago (CDMP) y también los factores de crecimiento/diferenciación (GDF) miembros de la familia de las BMP. Esto explica los buenos resultados del cartílago tratado con BMP-7.

Se ha señalado que la BMP-2 induce localmente la condrogénesis y podría regular la apoptosis durante el desarrollo esquelético, y se ha establecido la relación de la BMP-7 sobre los osteoclastos encargados en los procesos de remodelación ósea en fetos humanos y en la metáfisis de rata y la expresión de BMP-4 y 6 en los osteoclastos del cartílago de crecimiento²⁵, la BMP-2 en osteoblastos presentes en la formación ectópica de hueso inducida por el periostio²⁶ y BMP-2, 4 y 7 en osteoclastos de hueso regenerado durante la reparación de fracturas²⁷. La BMP-7 es fundamental en el proceso de diferenciación de las células mesenquimales, en hueso y cartílago, en osteoblastos por la transcripción de numerosos genes osteogénicos²⁸, mientras que la BMP-4 se cree que está implicada en el desarrollo de hueso y cartílago y es muy importante durante el desarrollo embrionario²⁹. Sin embargo, su pérdida no tiene consecuencias patológicas en el desarrollo del esqueleto apendicular embrionario³⁰. Una disminución de BMP-4 también está implicado en la fibrodiasplasia osificante progresiva³¹.

Tabla 2 Efecto de las BMP

BMP	Función
BMP-2	Osteoinducción, diferenciación osteoblastos, apoptosis
BMP-3 (osteogenina)	BMP más abundante en el hueso, inhibe la osteogénesis
BMP-4	Osteoinductiva, desarrollo pulmones y ojos
BMP-5	Condrogénesis
BMP-6	Diferenciación osteoblastos, condrogénesis
BMP-7 (Osigraft®)	Osteoinducción, desarrollo riñones y ojos
BMP-8 (OP-2)	Osteoinductiva
BMP-9	Sistema nervioso, sistema reticuloendotelial, hepatogénesis
BMP-10	Desarrollo cardíaco
BMP-11 (GDF-8 miostatina)	Patrón mesodermal y tejido nervioso
BMP-12 (GDF-7)	Induce formación de tendones
BMP-13 (GDF-6)	Induce formación de tejidos tendinoso y ligamentoso
BMP-14 (GDF-5)	Condrogénesis, mejora la reparación del tendón y formación de hueso
BMP-15	Modifica la actividad de la folitropina

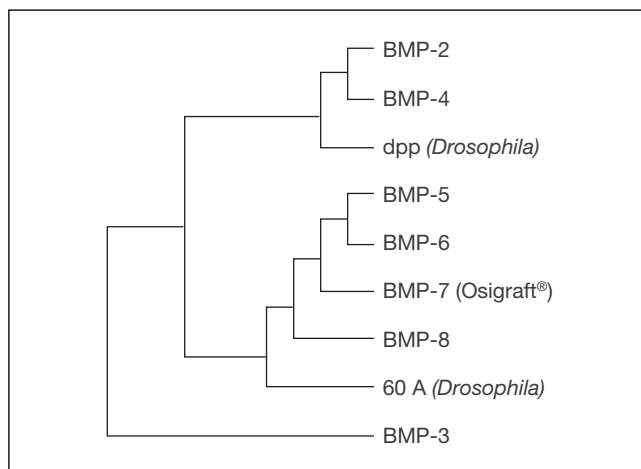


Figura 1 Clasificación de las BMP, según la secuencia de sus aminoácidos.

Los receptores más importantes que participan en las cascadas de transducción de señal de las BMP son una familia relacionada con los receptores de tirosincinasa: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4). El VEGFR-2 parece ser el receptor con una mayor función y el que se encuentra predominantemente en la superficie de las células endoteliales^{32,33}. El VEGFR-1 tiene, por su parte, una función en el mantenimiento y reclutamiento de los precursores de las células endoteliales durante la vasculogénesis, mientras que el VEGFR-3 es el encargado del desarrollo de los vasos sanguíneos y linfáticos³⁴.

Cada tipo de receptor puede unirse independientemente a la BMP y la afinidad de unión aumenta considerablemente cuando están presentes ambos receptores. Una vez activado, el complejo receptor traduce señales intracelulares por la activación de proteínas Smad específicas, las cuáles constituyen formas heteroméricas complejas que se acumulan en el núcleo celular, participando en la regulación de la expresión de genes concretos^{35,36}.

Las proteínas Smads se pueden dividir en tres grupos distintos: receptores-reguladores de Smads (R-Smads), mediadores comunes de Smads (Co-Smads) e inhibidores de Smads (I-Smads). Las BMP tienen antagonistas específicos como la nogina y la cordina y miembros de los denominados gremlin que se unen a sus mismos receptores, inhibiendo su acción. Los R-Smads para BMP-2, 4 y 7 son los Smad-1, Smad-5 y Smad-8, mientras que las que están relacionadas con el ciclo del TGF β /activina/nodal y, también, con la BMP-3 son los Smad-2 y Smad-3. Una vez activados, el R-Smad se asocia con el Smad-4 (Co-Smad) en el citoplasma y después se trasloca al núcleo, donde están los genes diana activados específicos. Las Smad inhibitoras (Smad-6 y Smad-7) son potentes antagonistas intracelulares de los receptores Smad. La Smad-7 inhibe la BMP, el TGF β y los ciclos de la activina, mientras que Smad-6 inhibe específicamente la señal de las BMP^{37,38}. La acción de las BMP se debe en parte a sus inhibidores, como nogina, folistatina, Drm/Gremlin, esclerostina y cordina^{39,40}. La cordina y la nogina se unen directamente al ligando de BMP^{41,42}; la esclerostatina puede inhibir la cascada de los Smad.

Transportadores para los factores de crecimiento

Un aspecto que considerar en el tratamiento con factores de crecimiento es colocarlos en materiales adecuados. Sin embargo, la inyección de la proteína percutánea podría tener muchas ventajas por su fácil administración en el tratamiento de las pseudoartrosis o en las elongaciones óseas, fracturas cerradas e incluso en la fusión vertebral. El desarrollo de transportadores inyectables para los factores osteogénicos es un medio indispensable para no tener que convertir una fractura cerrada en otra abierta³⁶. En estudios preclínicos, Einhorn et al⁴³ vieron buenos resultados con la inyección percutánea de BMP-2 en fracturas de fémur en ratas. Mizumoto et al⁴⁴, también en ratas, demostraron que una inyección única de rhBMP-7 administrada en la osteotomía mejora el índice de regeneración.

Sin embargo, un transportador ayuda a mantener la concentración de rhBMP en el lugar de reparación durante largo tiempo, con lo que mejora su capacidad inductiva y debe tener capacidad para liberar los factores de crecimiento en tiempo y dosis adecuados. Además, cualquier biomaterial debe ser un sustrato que estimule el reclutamiento y la adhesión celular y potencie la quimiotaxis permitiendo la migración celular y la angiogénesis y, también, debe ser biodegradable sin producir reacciones inmunitarias, inflamatorias o tóxicas que inhiban el proceso de reparación⁴⁵.

Se han descrito cuatro tipos de transportadores para los factores de crecimiento: materiales inorgánicos; polímeros sintéticos, polímeros naturales y composites o compuestos de los materiales citados anteriormente. Entre los materiales más utilizados están el colágeno tipo I, los geles de ácido hialurónico y diferentes sucedáneos óseos, como el hueso desmineralizado, la hidroxiapatita y el coral, además de los ácidos poliláctico o poliglicólico. Los aloinjertos óseos también se han utilizado para la liberación de factores osteogénicos. Actualmente, se trabaja en la obtención de materiales artificiales, sintéticos o biológicos desnaturalizados que puedan sustituir el hueso. Hay un elevado número de transportadores que cumplen las condiciones adecuadas. También disponemos de polímeros naturales como el colágeno, el ácido hialurónico, la fibrina, el quitosán, el alginato y otros derivados de polisacáridos de animales o vegetales. El colágeno bovino es el más utilizado actualmente. Sin embargo, las BMP se unen fuertemente al colágeno derivado de hueso²³. La rhBMP-2 se libera en una esponja de colágeno reabsorbible y la rhBMP-7, en colágeno bovino tipo I.

Factores de crecimiento y reparación ósea. Aplicaciones clínicas de los factores de crecimiento en la regeneración ósea

Las aplicaciones clínicas de los factores de crecimiento cubren un amplio campo de posibilidades que, actualmente, se limitan al tratamiento de retrasos de consolidación y pseudoartrosis y las artrodesis vertebrales. La proteína osteogénica recombinante rhBMP-7 (Osigraft®) ha mostrado seguridad en su aplicación y eficacia en el tratamiento de las pseudoartrosis de diferentes huesos largos del esqueleto en el hombre y en muchos de los estudios experimentales. Sin embargo, hay que procurar una serie de condiciones

elementales para conseguir buenos resultados, como un lecho limpio, sin contaminación bacteriológica, viable y vascularizado, con una buena estabilización del defecto óseo⁴⁶.

Numerosos trabajos experimentales han demostrado la utilidad de los factores de crecimiento en la reparación ósea. Seeherman et al⁴⁷ realizaron una resección de peroné bilateral, de 6 a 8 cm, en primates *Cynomolgus*. En un lado inyectaron rhBMP-2 3 h después de la intervención, utilizando como transportador fosfato cálcico en pasta, y demostraron una aceleración del 40% en el proceso de consolidación respecto al lado control. También Edwards et al⁴⁸ demostraron que la inyección de rhBMP-2 en fosfato cálcico mejora la reparación de las osteotomías tibiales en perros. Summer et al⁴⁹ analizaron el efecto de la BMP-2 en la osteólisis alrededor de los implantes, y observaron que todos los cilindros tratados con diferentes dosis de BMP-2 presentaron mayor formación ósea y mayor actividad ósea que los controles. Los tratados con 800 mg tuvieron 3 veces más actividad que el grupo control.

Roldan et al⁵⁰ compararon el efecto de la BMP-7 y el plasma rico en plaquetas (PRP) en los defectos de mandíbula de rata colocando hueso bovino no orgánico (Bio-Oss®) y costilla autóloga. No se vio mejor efecto colocando costilla autóloga. Sin embargo, al colocar el PRP y la BMP-7 sobre un sustituto óseo, no se vieron diferencias entre el grupo control y el PRP, pero se obtuvo formación de hueso combinando rhBMP-7 con el sustituto óseo. También consiguieron una osificación heterotópica con la BMP-7, cosa que no ocurrió al inyectar PRP. En nuestro estudio⁵¹ obtuvimos resultados semejantes en un defecto de mandíbula en ovejas de 6 cm, con buenos resultados con OP-1 y OP-2 completando un aloinjerto congelado; no se observaron resultados osteogénicos al inyectar PRP en el defecto.

Entre los estudios clínicos hay pocos ensayos prospectivos, aleatorizados y comparativos. Geesink et al⁵² analizaron la consolidación de defectos peroneos > 15 mm en pacientes a los que se practicó una osteotomía tibial proximal metafisaria. Compararon el implante de Osigraft® con la matriz ósea desmineralizada y un tercer grupo control tratado con colágeno tipo I; 5 de los 6 pacientes tratados con Osigraft® y 4 de los 6 pacientes tratados con matriz ósea desmineralizada presentaron signos de consolidación ósea a las 10 semanas, mientras que ninguno de los defectos tratados con colágeno I se rellenó.

Fajardo et al²² vieron en muestras de pseudoartrosis clínicas una sobreexpresión de BMP-7 en el hueso reparado, mientras que en el foco de pseudoartrosis aparecía un aumento de expresión de BMP-4, gremlin, folistatina y nogina. La función de las BMP o sus antagonistas en las pseudoartrosis no se entienden bien. Inicialmente se pensó en una interrelación entre los dos grupos de proteínas^{37,38,53}; sin embargo, no se observó que hubiese un aumento de los antagonistas; por el contrario, éstos también habían disminuido. También Kloen et al³⁷ vieron en los focos de pseudoartrosis clínicos siete de los componentes de señal de la BMP en 17 de los 21 pacientes. Según Fajardo et al²², los antagonistas de las BMP, a excepción de la cordina, están sobreexpresados en el foco de pseudoartrosis.

La eficacia de la Osigraft®, proteína recombinante humana osteoprogenitora 1 (rhOP-1) o BMP-7 (Stryker, Biotech,

Hopkinton, Massachusetts, Estados Unidos) indicada para “el tratamiento de las pseudoartrosis de la tibia con una duración de falta de consolidación de al menos 9 meses, secundaria a traumatismos en pacientes esqueléticamente maduros, en casos en que los tratamientos previos con injerto autólogo haya fracasado o su utilización no sea posible”⁵⁴, se demostró en un ensayo clínico multicéntrico⁵⁵ en 122 pacientes con 124 retardos de consolidación tibial. En todos los casos se efectuó un tratamiento con clavo intramedular. A un grupo se le aplicó injerto de esponjosa autólogo y a otro, Osigraft® embebido en colágeno tipo I. Para demostrar su eficacia, se tuvo en cuenta la existencia de puentes corticales o trabeculares en el foco de pseudoartrosis en tres o cuatro planos radiográficos, el apoyo completo en la extremidad afecta, que los pacientes no padecieran dolor fuerte en la extremidad intervenida y no hubiesen requerido cirugía en el foco de pseudoartrosis para estimular su reparación y, por último, ausencia de dolor crónico en la zona donante de injerto. La evolución de los pacientes se midió con la escala visual analógica y el formulario corto del SF-36. A los 9 meses, el 81% de los retardos tratados con Osigraft® y el 85% de los tratados con injerto presentaron signos clínicos de consolidación, con lo que se demostró que Osigraft® tiene efecto clínico y radiográfico similar al del injerto de esponjosa autólogo. Este resultado manifiesta que Osigraft® puede sustituir al injerto autólogo de esponjosa. Otros estudios han avalado los buenos resultados de Osigraft® en el tratamiento de la pseudoartrosis, en muchos casos rebelde a la curación⁵⁶.

El otro producto comercializado actualmente es el InductOs®, una proteína recombinante humana (rhBMP-2) (Wyeth Pharmaceuticals, Madison, New Jersey, Estados Unidos) que está indicada para su utilización específica en “un único nivel entre L4 y S1 para la fusión anterior de la columna lumbar como sustituto del injerto óseo autólogo en adultos con un disco degenerado que no haya sido operado en los últimos 6 meses por esta causa”⁵⁷. También está indicada “para el tratamiento de las fracturas agudas de tibia en adultos como complemento al tratamiento estándar utilizando la reducción abierta y un clavo intramedular”⁵⁷. Por su parte, la rhBMP-2 también se aplicó en el tratamiento de las fracturas abiertas de tibia en 450 pacientes tratados inicialmente con irrigación, desbridamiento y un clavo intramedular bloqueado. En algunos casos se aplicó rhBMP-2, 1,5 mg/kg, y en este grupo se hallaron menos fallos del implante, menor número de infecciones y una curación de la herida más rápida^{58,59}.

Se han obtenido buenos resultados con BMP-2 y BMP-7 en las artrodesis vertebrales^{60,61}. Para la indicación vertebral, la primera variable para conocer la eficacia era la artrodesis vertebral radiográfica medida por observadores independientes. El dolor y la incapacidad se obtuvieron con el Oswestry Low Back Pain Disability Index Questionnaire. El estudio incluyó a 279 pacientes mayores de 18 años con un disco degenerado y una o más de las siguientes características: inestabilidad, formación de osteofitos, disminución de la altura del disco, engrosamiento de los ligamentos, degeneración o hernia discal, con o sin degeneración facetaria. Se exigió como criterio de inclusión presentar un Oswestry basal > 35, no tener más de un punto de espondilolistesis, padecer alteración en un único nivel entre L4 y

S1 y no responder durante al menos 6 meses al tratamiento conservador⁶². Burkus et al⁶³ utilizaron rhBMP-2 en la artrodesis de la columna lumbar en un estudio multicéntrico, aleatorizado, prospectivo y no ciego, durante 2 años, que incluyó a un total de 279 pacientes con un disco lumbar degenerado, efectuada una fusión anterior con dos cajetines. En el grupo control, de 136 pacientes, se aplicó injerto autólogo de cresta y el grupo de estudio, de 143 pacientes, recibió rhBMP-2 en una esponja de colágeno reabsorbible. Se realizaron radiografías y tomografías computarizadas (TC) 6, 12 y 24 meses tras la cirugía. El tiempo de cirugía y la pérdida de sangre fueron menores en el grupo con BMP y las consolidaciones, más frecuentes (el 94,5 frente al 88,7%). La escala de Oswestry para la lumbalgia y el estado neurológico fueron semejantes en ambos grupos. En el grupo control se presentaron 8 efectos adversos relacionados con la toma del autoinjerto y se apreció nueva formación ósea en todos los pacientes tratados con BMP.

La expresión de BMP también se ha descrito durante los procesos de elongación^{6,64}. En un estudio de elongación tibial en perros, Hansen-Angelstaedt et al³⁴ vieron un incremento de expresión de VEGF y sus receptores en los músculos que rodeaban el hueso elongado, no sólo local, sino también a distancia, en los músculos contralaterales. Esto demuestra, como habían sospechado Holbein et al⁶⁵, que cualquier agresión produce una respuesta sistémica de los factores de crecimiento. Mandu-Hrit et al⁶⁶ inyectaron BMP-7, con lo que mejoró la maduración del callo de elongación de conejos. En las elongaciones, Eingartner et al⁶⁷ encontraron TGF β en los osteoblastos y fibroblastos del callo de elongación, con mayor expresión en zonas proliferativas. Por su parte, Tsubota et al⁶⁸ consiguieron acelerar la fase de maduración del proceso de elongación trasplantando osteoblastos y estimulando la osteogénesis por medio de citocinas, colágenos y otros agentes derivados de las células trasplantadas.

En el hueso osteoporótico los estudios son interesantes y prometedores. La combinación de MSC con células autógenas transfectadas con BMP-2 produce mayor cantidad de hueso maduro a las 8 semanas en la mandíbula de la rata⁶⁹. Otros dos estudios^{70,71} demostraron una mejor reparación de las fracturas con rhBMP-2 en ratas ovariectomizadas. Sarban et al⁷² utilizaron rhBMP-2 embebida en esponjas de colágeno reabsorbible, con lo que mejoró la imagen radiográfica en el grupo control, mejoría que no se vio en ratas ovariectomizadas. Se recomienda la combinación de BMP-7 con un bisfosfonato, ya que en algunas ocasiones aumenta la formación de hueso pero también se incrementa la reabsorción^{19,73,74}. Esta reabsorción puede explicar algunos resultados no satisfactorios obtenidos en clínica. Harding et al¹⁹ vieron experimentalmente que el grupo tratado con BMP-7 y ácido zoledrónico aumentaban la cantidad de hueso en un 400% respecto a los grupos no tratados.

Planteamientos para el futuro

Los factores de crecimiento no presentan muchos de los inconvenientes de los injertos y no están influidos por la edad, la conservación ni su disponibilidad. La evolución de algunos estudios clínicos ha demostrado que la utilización

de las BMP reduce el sangrado entre 43 y 336 ml y disminuye el tiempo quirúrgico entre 9 y 15 min^{55,63}.

Conocemos algunas complicaciones o factores secundarios de las BMP, ya que aumentan el número de células inflamatorias en ovejas⁷⁵, aumentan las concentraciones séricas de anticuerpos contra las BMP, el edema generalizado, el crecimiento óseo y las osificaciones heterotópicas⁷⁶. Sin embargo, se desconocen las complicaciones o efectos adversos en ensayos clínicos.

Un problema es el coste. Como señalan Sandhu et al⁷⁷ el coste de un injerto autólogo de hueso iliaco también es elevado y no siempre se tiene en cuenta. Además, el volumen y la calidad de este hueso son variables y limitados, lo que explica algunos fracasos de las artrodesis vertebrales. Los factores de crecimiento, una vez se demuestre su eficacia, disminuirán los riesgos quirúrgicos, el tiempo de la cirugía y de personal, la morbilidad de la zona donante y los problemas que se puedan presentar cuando fracase la cirugía. Además, podrán prevenir los casos en que se sospeche una pseudoartrosis o retardo de consolidación. Hay que tener en cuenta que los materiales de relleno óseo no pueden ser reemplazados por BMP en las grandes cirugías, como la escoliosis o los grandes defectos, por su elevado coste y por que no se recomienda más de dos dosis por tratamiento de BMP.

Otro aspecto por dilucidar es la dosis necesaria efectiva de las BMP, que se ha establecido a partir de pocos trabajos experimentales y de la práctica clínica. El hueso contiene unos 0,002 mg de BMP-7 por kilo de hueso pulverizado. En el sitio de la fractura, la BMP se libera en mayor concentración, aunque se desconoce en qué cantidad. En estudios experimentales con animales de tamaño medio, para obtener una reparación ósea se necesita más concentración de BMP que en animales pequeños. También depende del tipo de lesión. En los estudios de fusión vertebral, la unión entre los cuerpos vertebrales se consigue más fácilmente que las uniones intertransversas, donde la frecuencia de pseudoartrosis es mucho mayor⁷⁸. Sin embargo, un problema es que en clínica se necesitan dosis mucho mayores, lo que encarece el proceso y puede disparar efectos secundarios desconocidos^{74,79-81}. Por ello, una alternativa propuesta es estimular la sobreexpresión de BMP-7 endógena⁸².

Entre los aspectos de mayor interés, queremos resaltar la combinación de BMP-7 con factores angiogénicos, paratirina y células mesenquimales⁸³. También la combinación con biomateriales y, especialmente, injertos. La BMP-7 estimula la proliferación y la diferenciación de las líneas de células mesenquimales pluripotenciales y la angiogénesis a través de los factores de crecimiento derivados osteoblásticos vasculares endoteliales y mejora la capacidad osteoinductiva de los injertos óseos autólogos, lo que facilita la proliferación y la diferenciación de las células osteoprogenitoras para que maduren a osteoblastos. La combinación de BMP-7 y autoinjerto de esponjosa potencia la capacidad osteogénica del injerto⁸⁴⁻⁸⁷ y ha conseguido en grandes series de pseudoartrosis resultados positivos entre el 88,8 y el 92% de los casos 6-8 meses después de la intervención.

Quedan otros aspectos por discutir, pues las estatinas estimulan el promotor del gen de la BMP-2 y mejora la formación ósea en ratas⁸⁸ y la reparación de las fracturas en ratones⁸⁹, aunque hasta ahora no hay datos relevantes para su aplicación clínica.

Las BMP, hay que repetirlo, no son sustancias mágicas; son un producto que sigue un esquema de funcionamiento claro que todavía no conocemos del todo y precisa de vasos, células y una matriz o ambiente donde actuar, sin olvidar unas condiciones mecánicas apropiadas, eso que Giannoudis et al⁹⁰ han dado en llamar el concepto del diamante.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Urist MR, Silverman BF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res.* 1967;53:243-83.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150:893-9.
- Reddi AH, Weintroub S, Muthukumar N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am.* 1987;18:207-12.
- Bauer FCH, Nilsson OS, Tornquist H. Formation and resorption of bone induced by demineralized bone matrix implants in rats. *Clin Orthop Relat Res.* 1984;191:139-43.
- Lindholm ST, Urist MR. A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow and bone matrix. *Clin Orthop Relat Res.* 1980;150:288-300.
- Sato M, Ochi T, Nakase T, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, et al. Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein BMP-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1084-95.
- Aspenberg P, Lohmander LS, Thorgren KG. Failure of bone induction by bone matrix in adult monkeys. *J Bone Joint Surg (Am).* 1988;70-A:625-7.
- Schwarz N, Schlag G, Thurnher M, Eschberger J, Dinges HP, Redl H. Fresh autogeneic, frozen allogeneic and decalcified allogeneic bone grafts in dogs. *J Bone Joint Surg (Br).* 1991;73-B:787-90.
- Healey JH, Zimmerman PA, McDonnell JM, Lane JM. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and non union in cancer patients. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;256:280-5.
- Hernigou P, Mathieu G, Pognard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg (Am).* 2006;88-A Suppl 1:322-7.
- Burwell GR, Friedlander GE, Mankin HJ. Current perspectives and future directions: the 1983 international conference on osteochondral allografts. *Clin Orthop Relat Res.* 1985;197:141-57.
- Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2003;5:32-45.
- Lind M. Growth factors: Possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand.* 1996;67:407-17.
- Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D, Kandziora F, Stange R, Haas NP, et al. Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β 1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *J Orthop Res.* 2004;22:514-9.
- Goldring MB, Goldring SR. Skeletal tissue response to cytokines. *Clin Orthop Relat Res.* 1990;198:245-78.
- Miyamoto S, Takaoka K, Ono K. Bone induction in mokeys by BMP: a transfilter technique. *J Bone Joint Surg (Br).* 1993;75-B:107-10.
- Laursen M, Hoy K, Hansen ES, Gelineck J, Christensen FB, Burger CE, et al. Recombinant bone morphogenetic protein-7 as an intracorporal bone growth stimulator in unstable thoracolumbar burst fractures in humans: preliminary results. *Eur Spine J.* 1999;8:485-90.
- Jepsson C, Astrand J, Tagil M, Aspenberg P. A combination of biphosphonates and BMP additives in impacted bone allografts. *Acta Orthop Scand.* 2003;74:483-9.
- Harding AK, Aspenberg P, Kataoka M, Bylski D, Tägli M. Manipulating the anabolic and catabolic response in bone graft remodeling: synergism by a combination of local BMP-7 and a single systemic dose of zoledronate. *J Orthop Res.* 2008;26:1245-9.
- Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine.* 2002;27 Suppl:S2-8.
- Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic scienceto clinical aspplications. *J Bone Joint Surg (Am).* 2001;83-A Suppl 1:S1-6.
- Fajardo M, Liu Ch-J, Egol K. Levels of expression for BMP-7 and several BMP antagonists may play an integral role in a fracture nonunion. A pilot study. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467:3071-8.
- Rengachary SS. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus.* 2002;13:34-61.
- Borden M, Attawia M, Khan Y, El-Amin SF, Laurencin CT. Tissue-engineered bone formation in vivo using a novel sintered polymeric microsphere matrix. *J Bone Joint Surg (Br).* 2004;86-B:1200-8.
- Anderson HC, Hodges PT, Aguilera XM, Missana L, Moylan PE. Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis and articular cartilage. *J Histochem Cytochem.* 2000;48:1493-502.
- Nashimura T, Simmons DJ, Mainous EG. The origin of bone formed by heterotopic periosteal implants. *J Oral Maxillofacial Surg.* 1997;55:1265-8.
- Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kat M, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic (BMP) family members and BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone.* 1998;22:605-12.
- Wu X, Shi W, Cao X. Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:29-49.
- Behesti H, Holt JK, Sowden JC. The level of BMP-4 signaling is critical for the regulation of distinct T-box gene expression domains and growth along the dorso-ventral axis of the optic cup. *BMC Dev Biol.* 2006;6:62.
- Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Tabin CJ, Rosen V. BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture healing in the limb. *J Bone Joint Surg (Am).* 2008;90-A Suppl 1:14-8.
- Kaplan FS, Fiori J, Ahn J, Billings PC, Shore EM. Dysregulation of the BMP-4 signaling pathway in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:54-65.
- Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Res.* 2009;19:71-88.
- Hendy GN, Kaji H, Sowa H, Lebrun JJ, Canaff L. Menin and TGF- β superfamily member signaling via the Smad pathway in pituitary, parathyroid and osteoblast. *Horm Metab Res.* 2005;37:375-9.
- Hansen-Angelstaedt N, Algensatedt P, Böttcher A, Joscheck C, Schwarzloh B, Schaefer C, et al. Bilaterally increased VEGF-levels in muscles during experimental unilateral callus distraction. *J Orthop Res.* 2003;21:805-12.
- Nakamae A, Sunagawa T, Ishida O, Suzuki O, Yasunaga Y, Hachisuka H, et al. Acceleration of surgical angiogenesis in necrotic bone with a single injection of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res.* 2004;22:509-13.
- Seeherman H, Wozney J, Li R. Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine.* 2002;27 Suppl:S16-23.

37. Kloen P, DiPaola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet DL, et al. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone*. 2003;33:362-71.
38. Kloen P, Doty SB, Gordon E, Rubel IF, Goumans MJ, Helfet DL. Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2002;84-A:1909-18.
39. Tsiologiannis E, Polyzois I, Oak Tang Q, Pavlou G, Tsiroidis E, Heliotis M, et al. Targeting bone morphogenetic protein antagonists: in vitro and in vivo evidence of their role in bone metabolism. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13:123-37.
40. Winkler D, Yu C, Goeghegan JC, Ojala EW, Skonier KE, Shpektor D, et al. Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J Biol Chem*. 2004;279:36293-8.
41. Abe E, Yamamoto M, Taguchi Y, Lecka-Czernik B, O'Brien CA, Economides AN, et al. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res*. 2000;15:663-73.
42. Rosen V. BMP and BMP inhibitors in bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1068:19-25.
43. Einhorn TA, Majeska RJ, Mohaideen A, Kagel EM, Bouxsein ML, Turek TJ, et al. A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2003;85-A:1425-35.
44. Mizumoto Y, Moseley T, Drews M, Cooper VN, Reddi H. Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2003;85-A:124-30.
45. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2002;84-A:1034-44.
46. Giltaij LR, Shimmin A, Friedlaender GE. Osteogenic protein-1 (OP-1) in the repair of bone defects and fractures of long bones: clinical experience. En: Vukicevic S, Sampath KT, editores. *Bone morphogenetic proteins: from laboratory to clinical practice*. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser; 2002.
47. Seeherman HJ, Li R, Bouxsein ML, Kim H, Li XJ, Smith-Adaline EA, et al. Rh-BMP-2/Calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2006;88-A:144-60.
48. Edwards RB, Seeherman HJ, Bogdanske JJ, Devitt J, Vanderby R, Markel MD. Percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a calcium phosphate paste accelerates healing of a canine tibial osteotomy. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2004;86-A:1425-38.
49. Summer DR, Turner TM, Urban RM, Turek T, Seeherman H, Wozney JM. Locally delivered rhBMP-2 enhances bone ingrowth and gap healing in a canine model. *J Orthop Res*. 2004;22:58-65.
50. Roldán JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Açil Y, et al. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. Bone morphogenetic protein-7. *Bone*. 2004;34:80-90.
51. Forriol F, Longo GU, Concejo C, Ripalda P, Maffulli N, Denaro V. Platelet-rich-plasma, rhOP-1® (BMP-7) and frozen rib allograft for the reconstruction of bony mandibular defects in sheep. A pilot experimental study. *Injury*. 2009;40 Suppl 3:44-9.
52. 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-B:710-8.
53. Kwong FN, Hoyland JA, Freemont AJ, Evans CH. Altered relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. *J Orthop Res*. 2009;27:752-7.
54. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for human use. European Public Assessment Report (EPAR): Osigraft, EMEA/H/C/393 [citado 1 Nov 2007]. Disponible en: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/osigraft/039301en1.pdf>
55. Friedlander GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Clerny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2001;83-A Suppl 1:S151-8.
56. Pecina M, Haspl M, Jelic M, Vukicevic S. Repair of a resistant tibia non-union with a recombinant bone morphogenetic protein-7 (rh-BMP-7). *Inbt Orthop*. 2003;27:320-1.
57. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for human use. Post-authorisation summary of opinion for inductos. 2005 Feb 17 [citado 1 Nov 2007]. EMEA/57906/2005. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/opinion/5790605en.pdf>
58. BESTT (BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma) Study Group, Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2002;84-A:2123-34.
59. Swiontkowski MF, Aro HT, Donell S, Esterhai JL, Goulet J, Jones A, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures. A subgroup analysis of data combined from two prospective randomized studies. *J Bone Joint Surg (Am)*. 2006;88-A:1258-65.
60. Li RH, Bouxsein ML, Blake CA, D'Augusta D, Kim H, Li XJ, et al. RhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (a-BSM) accelerates healing in the rabbit lunar osteotomy model. *J Orthop Res*. 2003;21:997-1004.
61. Sandhu HS. Bone morphogenetic proteins and spinal surgery. *Spine*. 2003;28 Suppl:S64-73.
62. Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE. The use of rh-BMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine*. 2000;25:376-81.
63. Burkus JK, Gornet MF, Dickman CA, Zdeblick TA. Anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages. *J Spinal Disord Tech*. 2002;15:337-49.
64. Yoshimura Y, Nomura S, Kawasaki S, Tsutsumimoto T, Shimizu T, Takaoka K. Colocalization of noggin and bone morphogenetic protein-4 during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2001;16:876-84.
65. Holbein O, Neidlinger-Wilke C, Suger G, Kinzl L, Claes L. Ilizarov callus distraction produces systemic bone cell mitogens. *J Orthop Res*. 1995;13:629-38.
66. Mandu-Hrit M, Haque T, Lauzier D, Kotsioprifitis M, Rauch F, Tabrizian M, et al. Early injection of OP-1 during distraction osteogenesis accelerates new bone formation in rabbits. *Growth Factors*. 2006;24:172-83.
67. Eingartner C, Coerper S, Fritz J, Gaissmaier C, Koveker G, Weise K. Growth factors in distraction osteogenesis. Immunohistological pattern of TGF-beta1 and IGF-I in human callus induced by distraction osteogenesis. *Int Orthop*. 1999;23:253-9.
68. Tsubota S, Tsuchiya H, Shinokawa Y, Tomita K, Minato H. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. *J Bone Joint Surg (Br)*. 1999;81-B:125-9.
69. Tang Y, Tang W, Lin Y, Long J, Wang H, Liu L, et al. Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats. *Cell Biol Int*. 2008;32:1150-7.
70. Bostrom M, Lane J, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T, et al. Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulna nonunion model. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;327:272-82.
71. Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Betz O, Merkle HP, et al. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone*. 2007;41:247-55.

72. Sarban S, Senkoylu A, Isikan UE, Korkusuz P, Korkusuz F. Can rhBMP-2 containing collagen sponges enhance bone repair in ovariectomized rats? *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467:3113-20.
73. Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H. Stimulatory effect of bone morphogenetic protein -2 on osteoclastlike cell formation and bone resorbing activity. *J Bone Min Res.* 1995;10:1681-90.
74. Okamoto M, Murai J, Yoshikawa H, Tsumaki N. Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1022-33.
75. Egermann M, Lill CA, Griesbeck K, Evans CH, Robbins PD, Schneider E, et al. Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep. *Gene Therapy.* 2006;13:1290-9.
76. Perri B, Cooper M, Laurysen C, Anand N. Adverse swelling associated with use of rhBMP-2 in anterior cervical discectomy and fusion: a case study. *Spine J.* 2007;235-9.
77. Sandhu HS, Anderson DG, Andersson GBJ, Boden SD, Damien C, Ebara S, et al. Summary statement: alternative delivery by gene therapy and cost justification of bone morphogenetic proteins for spine fusion. *Spine.* 2002;27:S86.
78. Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop.* 2007;31:721-7.
79. Axelrad T, Steen B, Lowenberg D, Creevy W, Einhorn T. Heterotopic ossification after the use of commercially available recombinant human bone morphogenetic proteins in four patients. *J Bone Joint Surg (Br).* 2008;90-B:1617-22.
80. Wysocki R, Cohen M. Ectopic ossification of the triceps muscle after application of bone morphogenetic protein-7 to the distal humerus for recalcitrant nonunions: a case report. *J Hand Surg Am.* 2007;32:647-50.
81. Giannoudis P, Kanakaris N, Einhorn T. Interaction of bone morphogenetic proteins with cells of the osteoclast lineage: review of the existing evidence. *Osteoporos Int.* 2007;18:1565-81.
82. Alam N, St-Arnaud R, Lauzier D, Rosen V, Hamdy RC. Are endogenous BMPs necessary for bone healing during distraction osteogenesis? *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467:3190-8.
83. Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Mineral Res.* 2005;20:848-57.
84. Giannoudis PV, Kanakaris NK, Dimitriou R, Gill I, Kolimarala V, Montgomery RJ. The synergistic effect of autograft and BMP-7 in the treatment of atrophic nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467:3239-48.
85. Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, Burssens P, De Biase P, Capanna R, et al. Application of BMP-7 to tibial nonunions: a 3-year multicenter experience. *Injury.* 2008;39 Suppl 2:S83-90.
86. Ronga M, Baldo F, Zappala G, Cherubino P. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 for treatment of long bone nonunion: an observational, retrospective, non-randomized study of 105 patients. *Injury.* 2006;37 Suppl 3:S51-6.
87. Zimmermann G, Müller U, Löffler C, Wentzensen A, Moghaddam A. Therapieerfolg bei atrophischen Tibiaschaftpseudarthrosen. *Unfallchirurg.* 2007;110:931-8.
88. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999;286:1946-9.
89. Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P. Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res.* 2002;17:2004-8.
90. Giannoudis P, Einhorn T, Marsch D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury.* 2007;38 Suppl 4:S3-4.