

PROTEÍNA OSTEOGÉNICA TIPO 1

Diseño de un programa de investigación sobre utilización de terapia celular y BMP en artrodesis lumbar

E. Guerado^{a,b,c,*}, A.M. Cerván^a, J.A. Ortega^a, M. Rodríguez-Solera^a, J.A. Andrade^{c,d},
P. Zamora^{b,c}, M.D. Cuenca-López^{c,d}, I. Prats^e, M.C. Hernández^e y J. Becerra^{c,d}

^a Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Hospital Universitario Costa del Sol, Marbella, Málaga, España

^b Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Málaga, España

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Málaga, España

^d Laboratorio de Medicina Regenerativa y Regeneración Tisular (LABRET), Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, Málaga, España

^e Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos, Málaga, España

PALABRAS CLAVE

Proteínas
morfogénicas;
Terapia celular;
Células troncales;
Artrodesis vertebral;
Ensayo clínico;
Estudio de cohortes

Resumen

Presentamos los resultados en raquis utilizando proteínas morfogénicas de hueso (BMP-7) y células troncales pluripotenciales capacitadas a la línea osteogénica. En el ensayo clínico aleatorizado y controlado, los resultados mostraron que la BMP-7 consiguió una formación de hueso similar al autoinjerto. Igualmente, en otra cohorte prospectiva y controlada, se apreció una formación de hueso cuando se utilizó BMP-7 con aloinjerto mayor que con aloinjerto solo. En ningún paciente se observaron efectos secundarios. Los estudios experimentales mostraron resultados prometedores con la terapia celular. Se discuten las bases actuales de la terapia celular.

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

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: eguerado@hcs.es (E. Guerado Parra).

KEYWORDS

Morphogenetic proteins;
Cell therapy;
Stem cells;
Vertebral arthrodesis;
Clinical trial;
Cohort study

Design of a research program on the use of cell therapy and BMP in lumbar arthrodesis**Abstract**

We report the spinal results of the use of bone morphogenetic protein (BMP-7) and pluripotent stem cells differentiated to the osteogenic lineage. The results of this randomized, controlled clinical trial show that BMP-7 achieved similar bone formation to the use of autograft. Equally, in another controlled prospective cohort, greater bone formation was found when BMP-7 was used with allograft compared with allograft alone. No adverse effects were found. Experimental studies of cell therapy show promising results. The current foundations of cell therapy are discussed.

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

Introducción

El dolor de espalda es uno de los problemas de salud más frecuentes en el mundo industrializado^{1,2}, con una incidencia de un 50-80% en algún momento de la vida³. Actualmente, si bien la generalidad de los dolores de espalda no se trata mediante cirugía, la mayoría de la cirugía raquídea está encaminada a artrodesar los niveles afectados. Una artrodesis vertebral consiste en la unión terapéutica, por continuidad, de dos o más vértebras o parte de ellas mediante tejido óseo, con el objetivo de evitar el dolor o la inestabilidad o corregir una deformidad⁴. La técnica habitual consiste en colocar un sistema de fijación y añadir una sustancia osteogénica, idealmente autoinjerto, que pretende conseguir mediante unos principios biomecánicos (fijación) y biológicos (preparación del lecho receptor con aportación de la sustancia osteogénica), la formación de hueso entre los niveles deseados. La artrodesis vertebral se fundamenta en las mismas bases científicas que la osteogénesis terapéutica para una fractura diafisaria o incluso falta de unión atrófica donde los extremos óseos (niveles que fijar) se consoliden una vez descorticados e inmovilizados mediante el principio de neutralización⁴.

No existe una sustancia osteogénica ideal, si bien se considera que el autoinjerto es el patrón de referencia, ya que contiene las tres variables esenciales: células osteogénicas, matriz osteoconductora y proteínas osteoinductoras. Su desventaja principal está relacionada con el proceso de obtención, puesto que alarga el tiempo quirúrgico, aumenta el sangrado (necesidad de hemoderivados, lo que conlleva riesgos de reacción transfusional y aumento de costes), produce dolor en la zona donante, con mayor riesgo de infección, y puede lesionar nervios cutáneos. La alta incidencia de complicaciones graves asociadas a la obtención de autoinjerto⁵, junto con la cantidad disponible tan escasa, insuficiente en algunas artrodesis multisegmentarias, ha hecho un objetivo importante la búsqueda de un sustituto.

Este trabajo se concentra en ese objetivo, y presenta los resultados de un programa de investigación en raquis coordinado entre instituciones de investigación clínica y básica sobre terapia celular con utilización de BMP y células troncales (células madre) capacitadas a la línea osteogénica, al

amparo del programa de centros de investigación en red sobre bioingeniería, biomateriales y nanotecnología (CIBER-BBN) y la Red de Terapia Celular (Red TerCel) del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España⁶. Aquí se presta especial atención a los estudios clínicos con BMP-7 (Osigraft®).

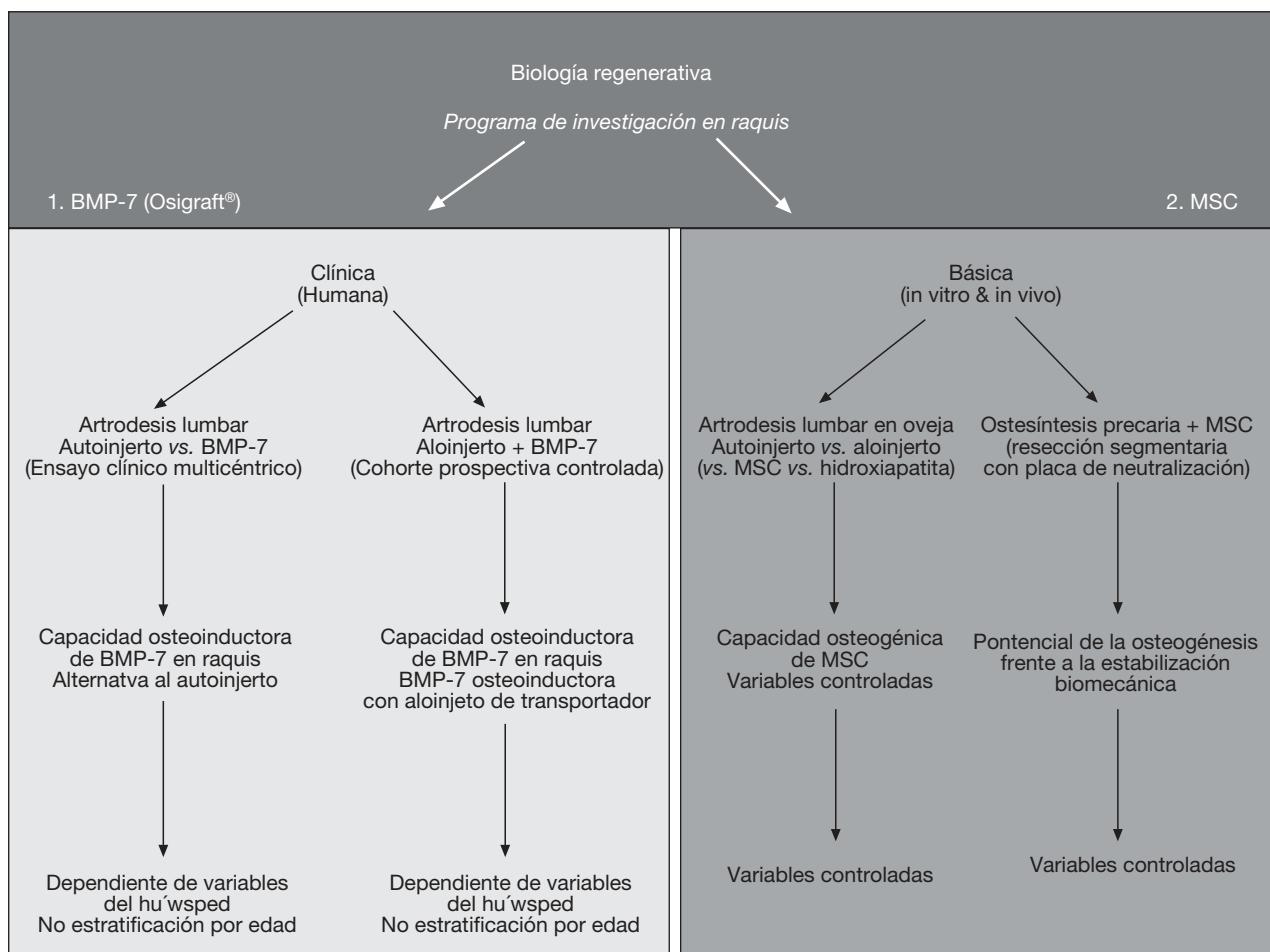
Diseño del programa

Durante los últimos 12 años, nuestro grupo ha estado trabajando en un programa de investigación básica y clínica con la creación de equipos mixtos que ha posibilitado el diseño de proyectos financiados entre cuyos objetivos específicos la pregunta de investigación tenía la aplicabilidad de resultados. Ello ha hecho que se hayan desarrollado programas exclusivamente básicos (*ex vivo*), programas exclusivamente clínicos (*in vivo*) y programas de experimentación en animales mayores como modelos preclínicos para un ensayo clínico de fase I, en los que la técnica quirúrgica reprodujo exactamente lo que se hace en humanos, llevada a cabo por los cirujanos de nuestro equipo en íntima relación con los investigadores básicos tanto en el quirófano experimental como en el laboratorio. Con estas premisas, se diseñaron dos brazos fundamentales de investigación: uno clínico y otro básico (algoritmo 1). Muchos de los resultados detallados de estas investigaciones, que aún continúan, ya han sido publicados^{4,7-18}.

Brazo de investigación clínica

Durante los últimos 5 años se han realizado dos programas sobre artrodesis lumbar y lumbosacra con la utilización de BMP-7 (Osigraft®, Stryker, Kalamazoo, Estados Unidos).

1. *Ensayo clínico aleatorizado.* En un estudio multicéntrico, se intervino quirúrgicamente una cohorte prospectiva de pacientes a los que se les practicó una artrodesis lumbar con una misma instrumentación pedicular (Xia®, Stryker, Kalamazoo, Estados Unidos). Se aplicó aleatoriamente a un grupo de pacientes autoinjerto de cresta ilíaca con el objetivo de promover la osteogénesis, mientras que en otro se aplicó BMP-7. Los resultados mostraron que ésta



Algoritmo 1 Programa de investigación en raquis.

consiguió una formación de hueso similar a la del autoinjerto, si bien este estudio tenía como objetivo comparar los efectos de ambos elementos (autoinjerto y BMP-7) en condiciones similares, pero en un segmento reducido (L4-L5) de fijación, sin obviar condicionantes como la necesidad de fusión en segmentos mayores¹⁹.

2. *Estudio de intervención en una cohorte prospectiva*. Paralelamente, nuestro grupo clínico también llevó a cabo un estudio de intervención sobre una cohorte prospectiva consecutiva y controlada. La técnica quirúrgica fue estandarizada para una artrodesis posterolateral de raquis lumbar con el mismo sistema de instrumentación pedicular (Xia®). Todos los pacientes fueron intervenidos por el cirujano senior (EG), y en todos los casos participaron los cirujanos coautores de este trabajo como miembros del equipo quirúrgico. Tras la descortización de los elementos posteriores, se colocó aloinjerto triturado a 5 mm de grosor, que se compactó en el lecho. En el lado derecho, el aloinjerto se había mezclado previamente con una dosis de BMP-7 (3,3 mg de epitelial alfa Osigraft®). Se operó a un total de 78 pacientes, número muy superior al tamaño de la muestra calculada mediante distribuciones binomiales (*binomial distribution 2-sample arcsine approximation*)²⁰ para prevenir la merma por posibles exclusiones del estudio, con una po-

tencia de 0,8 y unas diferencias esperadas del 35% entre uno y otro lado²¹. Se siguió a todos los pacientes clínica y radiográficamente durante 3, 6, 12 y 24 meses, al cabo de los cuales se les practicó una tomografía computarizada (TC) planar y tridimensional (figs. 1-3). De acuerdo con Tan et al²², se clasificó a los pacientes según tuvieran fusión completa, fusión parcial, falta de fusión unipolar y falta de fusión bipolar. Los resultados, estudiados a ciegas por tres observadores, mostraron reproducibilidades en el observador y entre observadores muy altas ($\kappa > 0,95$). Objetivamente, en el lado derecho se observó mayor formación de hueso, así como consolidación de la artrodesis ($p < 0,05$). En ningún paciente se observaron efectos secundarios.

Variables de discusión

Se conocen más de veinte tipos distintos de BMP, pero parece que solamente las BMP 2, 4, 6, 7 y 9 tienen propiedades osteogénicas²³, y se han comercializado dos tipos distintos de BMP con éxito demostrado en ensayos preclínicos y clínicos. La rhBMP-2 es la proteína morfógena ósea humana recombinante 2, (Infuse®; Medtronic Sofamor Danek, Memphis, Tennessee, Estados Unidos), aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense en 2002 para su uso en artrodesis intersomática lumbar anterior unisegmentaria con



Figura 1 Tomografía computarizada de un paciente tratado mediante artrodesis lumbosacra instrumentada con aloinjerto en el lado izquierdo y aloinjerto con BMP-7 en el derecho. Proyección sagital. Se aprecia la instrumentación, pero no la consolidación lumbar.



Figura 2 Tomografía computarizada en proyección sagital del mismo paciente. Se aprecia fusión lumbar pero no sacra.

caja de titanio. La rhBMP-7 (Osigraft®), utilizada por nosotros, tiene aprobado su uso por la FDA en 2004 para cirugía de revisión de artrodesis posterolateral lumbar. En España está aprobada en caso de falta de consolidación de fracturas de tibia, si bien se puede utilizar en raquis como uso compasivo, a propuesta ante el Ministerio de Sanidad y Consumo.

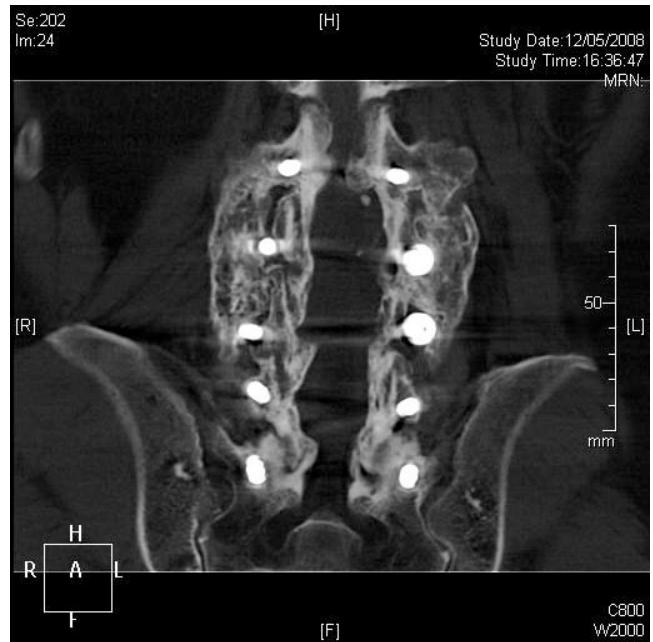


Figura 3 Tomografía computarizada coronal con fusión lumbosacra, pero no en algunos niveles lumbares. Estos tres cortes, en proyección sagital las dos primeras y coronal las siguientes, muestran la necesidad de estudiar todos los cortes para saber si hay fusión. En este caso la fusión es completa, pero no visible en una sola proyección, debido a la morfología irregular del callo.

Efectividad

Vaccaro et al²⁴, en un estudio multicéntrico prospectivo y aleatorizado, utilizando BMP-7 obtuvieron resultados superiores que con autoinjerto, mientras que Furlan et al²⁵, en un estudio de cohortes prospectivo en el que se evaluó la seguridad y la eficacia de BMP-7 en pacientes considerados con alto riesgo de desarrollo de seudoartrosis después de la cirugía reconstructiva de la columna vertebral, concluyeron que el uso de BMP-7 es seguro y puede contribuir a aumentar las tasas de fusión. Otros autores como Keith et al²⁶ encontraron, sin embargo, que BMP-7 aún no está al nivel del autoinjerto. En la bibliografía también encontramos ya estudios que tratan del comportamiento de la BMP-7 ante circunstancias adversas. Lu et al²⁷ concluyeron que la proteína BMP-7, administrada en un soporte compuesto, es capaz de superar los efectos negativos que la deficiencia de estrógenos supone para la fusión espinal posterolateral y generar una fusión relativamente robusta, con un efecto dependiente de la dosis. También se ha analizado que, si bien las tasas de fusión proporcionadas por las BMP son superiores en no fumadores que en fumadores, estas diferencias no son significativas²⁸.

Seguridad

Se han llevado a cabo múltiples estudios que evalúan la seguridad del uso de las BMP. Pocos efectos adversos se atribuyen a estas proteínas, aunque se han descrito radiculitis, osteólisis vertebral, edema y formación de hueso ectópico; sin embargo, estudios experimentales con aplicación de

BMP-7 en el espacio epidural han mostrado que es segura basándose en medidas de comportamiento y de observación macroscópica para determinar la formación de hueso ectópico 21 días después de la cirugía^{29,30}.

Costes

Según la bibliografía, el mayor coste de las BMP respecto al autoinjerto se compensa con la disminución de efectos secundarios adversos por la obtención del injerto autólogo, la disminución de cirugías fallidas y, por consiguiente, la reducción del número de cirugías de revisión de raquis³¹. Papakostidis et al³² publicaron en 2008 un metaanálisis de ensayos controlados y aleatorizados cuyo objetivo fue evaluar la eficacia clínica y radiográfica de la BMP en el contexto de la fusión posterolateral de la columna lumbar. Se eligieron los estudios que presentaban informes de resultados comparativos sobre la fusión posterolateral para el tratamiento de la enfermedad degenerativa en los que se establecían dos grupos de tratamiento, ya sea injerto de hueso de cresta ilíaca (grupo control) o BMP (grupo experimental). Los pacientes tratados con BMP tenían una hospitalización más corta que los tratados con injerto óseo de cresta ilíaca; también las BMP parecían más eficientes en fusiones posterolaterales instrumentadas que en fusiones no instrumentadas.

Combinación con osteoconductores

Para que sean efectivas, las BMP deben mantenerse en el lugar de la fusión hasta que se inicie la cascada de diferenciación osteogénica. Para ello se han usado distintos transportadores³³. En la fusión posterolateral se necesita un transportador con capacidad de soportar las fuerzas de la musculatura paravertebral y proveer un lugar para que se desarrolle la barra ósea de fusión. Aunque se ha mostrado la sinergia de potenciación osteogénica y la seguridad de la rhBMP-7 en combinación con autoinjerto para artrodesis vertebral posterolateral, esta estrategia no elimina los inconvenientes de la extracción de autoinjerto. El aloinjerto aporta ventajas³⁴: su cantidad es pequeña, anula la morbilidad de la obtención del hueso autólogo y es seguro, con un riesgo de transmisión de enfermedad de aproximadamente 1:1.667.000.

Conclusiones sobre los diseños

Los estudios sobre BMP en raquis tienen problemas metodológicos. Los ensayos clínicos son, efectivamente, aleatorizados, pero sus variables no están bien controladas, sobre todo la edad de los pacientes. Los pacientes ancianos tienen una tasa de células osteoprogenitoras menor que los jóvenes³⁵ y, por lo tanto, menor posibilidad de osteogénesis. Incluir unos y otros en el estudio lo sesga hacia un extremo u otro, al igual que los grupos control. Por ello, el papel exacto de las BMP como uso clínico (en relación con tipos, dosis o conductor) y el coste-efectividad no están del todo claros, pero la experiencia clínica actual en el raquis muestra ya resultados prometedores.

Características de nuestro estudio sobre estas variables

En nuestro estudio de cohorte prospectiva se ha utilizado la BMP-7 (Osigraft®) como uso compasivo; además, esta indicación está validada por la FDA para artrodesis posterolateral. Se ha hecho un seguimiento de seguridad en los pacientes, y no se ha encontrado efectos adversos, aunque sí

complicaciones de la propia cirugía dentro de los límites esperables. La utilización de monodosis ha supuesto en nuestro estudio el mínimo coste posible, si bien en el ensayo clínico la proteína fue suministrada, como en cualquier ensayo, por la empresa fabricante sin coste alguno. Por último, el diseño ha controlado variables como la edad mediante estratificación por intervalos, exclusión de pacientes cuando había enfermedades o tratamientos con probabilidad de que interfirieran en la osteogénesis y acotamiento de los segmentos tratados. La utilización de aloinjerto se ha mostrado segura y efectiva.

Brazo de investigación básica

Nuestro grupo ha realizado otros dos proyectos *ad-hoc* para el mismo objetivo. Estos proyectos se han basado en una larga trayectoria del grupo de investigadores básicos.

Generación de células madre mesenquimáticas capacitadas *in vitro* para promoción de la osteogénesis terapéutica

La reparación ósea precisa células osteocompetentes en el lugar de la lesión. Puesto que en ciertas enfermedades y en edades avanzadas el número de células osteoprogenitoras es bajo y abundan los fracasos reparativos por los métodos tradicionales, cabe esperar que la suplementación con células osteocompetentes en cantidad suficiente (terapia celular) en las distintas lesiones mejore la reparación. La efectividad de la terapia celular debe ser mayor que la de los injertos óseos autólogos o la de los injertos homólogos en la osteogénesis terapéutica. Los objetivos de nuestro trabajo de investigación básica estaban dirigidos a obtener células madre mesenquimales y conseguir su multiplicación y su diferenciación osteogénica *in vitro* para aplicarlas a lesiones esqueléticas en modelos animales experimentales, con el objetivo de inferir sus resultados en humanos. Se utilizaron ovejas adultas de iguales raza y sexo, distribuidas en dos grupos.

—*Grupo experimental.* En el lado derecho se realizó una artrodesis con los mismos procedimiento quirúrgico y material empleados en humanos señalados antes, añadiendo células capacitadas con hidroxiapatita porosa. En el lado izquierdo se realizó el mismo procedimiento quirúrgico pero con hidroxiapatita sola.

—*Grupo control.* En el lado derecho se realizó el procedimiento quirúrgico añadiendo injerto autólogo de cresta ilíaca —extraído en el mismo tiempo quirúrgico— en las láminas, las apófisis articulares, las apófisis espinosas y las apófisis transversas. En el lado izquierdo se realizó el mismo procedimiento quirúrgico, pero colocando aloinjerto. Se realizaron radiografías de todos los elementos a nivel del segmento artrodesado, así como TC e histología. Los resultados mostraron mayor formación ósea cuando se introdujeron células osteocompetentes que en el grupo control (figs. 4-6).

Estudio de la osteogénesis mediante células troncales capacitadas en un modelo adverso de osteosíntesis diafisaria

Se practicó a un grupo de ratas adultas una resección segmentaria de diafisis de fémur, se añadió un cilindro de hi-

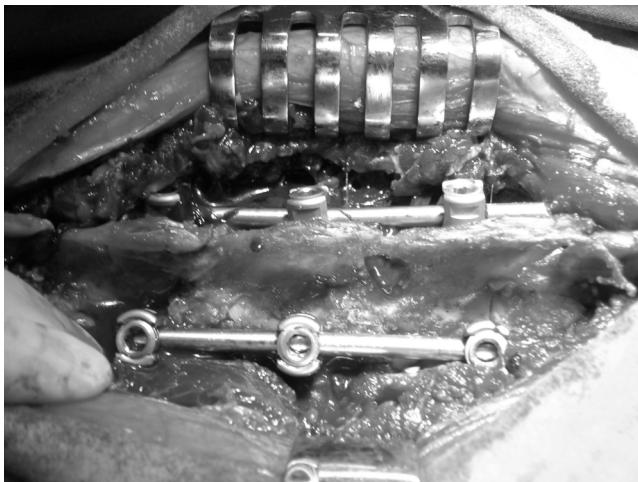


Figura 4 Técnica quirúrgica en una oveja. La técnica se reproduce exactamente en seres humanos.

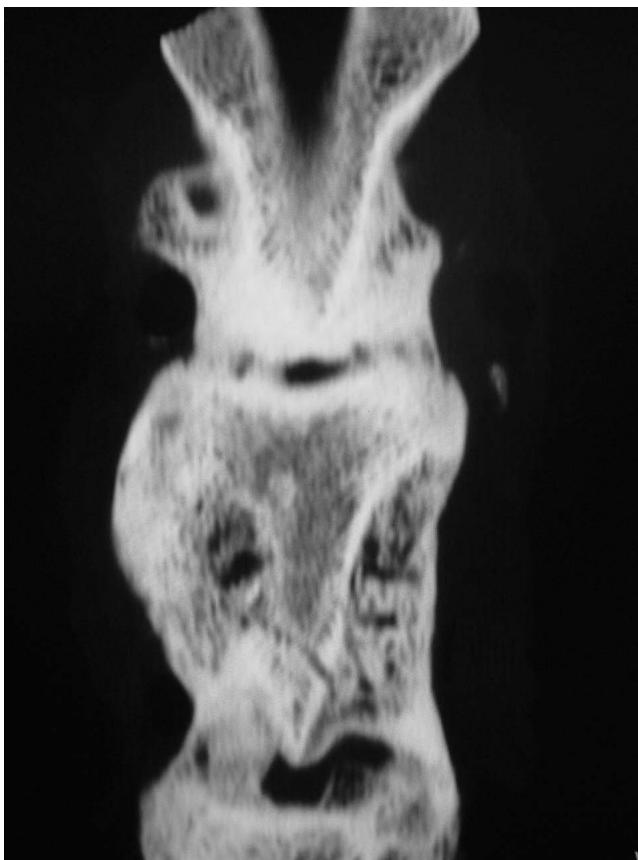


Figura 5 Tomografía computarizada de la misma oveja tras retirar la instrumentación, en proyección coronal. Se aprecia fusión.

droxiapatita embebida en células osteocompetentes y se practicó tras ello una osteosíntesis con placa; en un grupo control el cilindro no tenía células. En este estudio *ad-hoc*, se mostró que en este montaje para resección segmentaria, con placa de neutralización sin compresión ni efecto tirante, las células osteocompetentes no consiguen reparar una fractura cuando hay un montaje biomecánico deficiente.

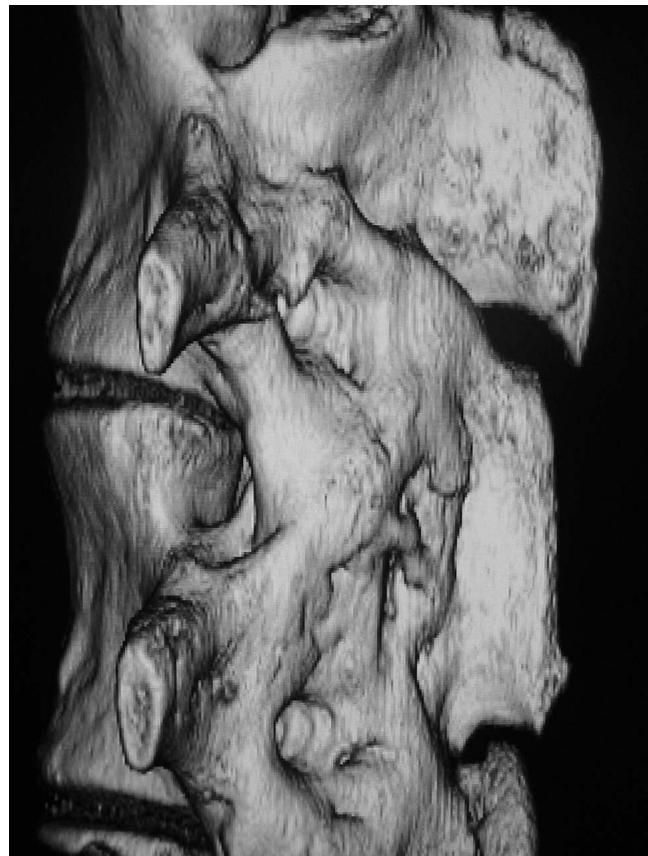


Figura 6 Tomografía computarizada de la misma oveja tras retirar la instrumentación. Reconstrucción tridimensional. Se aprecia fusión.

Conclusiones generales

Biomecánica

Es un hecho comprobado por cualquier cirujano que no sólo en raquis, sino en cualquier localización, un planteamiento biomecánico erróneo en una fractura o en una artrodesis lleva a fracaso de la cirugía. Efectivamente, nosotros lo hemos comprobado en nuestro estudio sobre osteosíntesis en defecto segmentario con osteosíntesis con placa de neutralización sin compresión ni efecto tirante. Las células, humanas o animales, ya sea en la práctica clínica o en la experimental, precisan de un entorno biomecánico adecuado. Esto es aplicable a la utilización terapéutica de cualquier agente osteogénico, osteoconductor u osteoinductor.

BMP

Las BMP precisan, además del entorno biomecánico adecuado ya referido, una cantidad mínima productiva de células osteocompetentes o diferenciables a la línea osteogénica. Si en estas dos condiciones, las BMP carecen de valor terapéutico. Para ello es fácil pensar que, además de una osteosíntesis adecuada, se precisa una vascularización de la zona donde se quiera promover la osteogénesis. Prueba de ello es la preparación meticulosa que precisa el lecho de artro-

desis hasta hueso sanguíneo en cualquier fusión vertebral, para posibilitar que las células y los metabolitos necesarios para la consolidación lleguen al foco. Del mismo modo, debe pensarse que la edad de los pacientes puede ser un condicionante para el uso de BMP. Los pacientes jóvenes responderán, ante planteamiento biomecánico adecuado y lecho sanguíneo, de forma excelente, mientras que en los pacientes ancianos en iguales circunstancias los resultados serán más inciertos.

Células

Las células son las únicas capaces de formar hueso. Si células no hay osteogénesis, aun cuando el montaje biomecánico de la artrodesis sea el adecuado, el lecho de artrodesis esté bien vascularizado o haya suficientes BMP. En definitiva, las BMP no son sino moléculas que inducen diferenciación en las células hacia la línea osteogénica. Pero no sólo debe haber células: debe haber células en cantidad suficiente ya que, de lo contrario, puede haber formación de hueso pero no lo suficiente para que haya artrodesis o ésta tenga robustez.

Metodología de estudio

Un pensamiento rápido sobre las características de los estudios puede ser: los estudios experimentales en animales deben realizarse en animales mayores (como la oveja), practicando exactamente los procedimientos y seguimientos que se realizan en humanos: artrodesis instrumentada con preparación del lecho y aposición del agente osteogénico, osteoconductor y osteoinductor con seguimientos radiográficos y mediante TC. Estos experimentos tienen la ventaja —a diferencia de los humanos— de que se pueden realizar estudios histológicos. Inferir conclusiones clínicas de estudios en conejo o rata carece de validez externa; la capacidad osteogénica de estos animales es muy alta respecto a la oveja y, sobre todo, el ser humano, y su tamaño no permite la instrumentación. Los estudios en humanos también presentan problemas metodológicos importantes. El hecho de que en un estudio haya una intervención sobre una cohorte de pacientes y que esta intervención se haga de forma aleatorizada lo cataloga como ensayo clínico aleatorizado; más aún, basta con que esta cohorte tenga algunas variables controladas (un mismo grado de fusión lumbar) para denominarlo ya ensayo clínico aleatorizado y controlado, cuando las variables osteogénicas en cuanto a celularidad no se han controlado: una de ellas, como ya se ha expuesto, es la edad. Por consiguiente, no es inconveniente que las cohortes sean consecutivas, puesto que los pacientes ya acuden aleatoriamente, sino que todas las variables “osteogénicas” estén controladas.

Agradecimientos

Las siguientes personas participaron durante estos años como coordinadores de parte del programa, como colaboradores o miembros de un programa de formación. Del Hospital Universitario Costa del Sol: Francisco Aguiar García (Jefe de Sección de Cirugía Ortopédica y Traumatología), María

Luisa Bertrand García (Jefa de Sección de Cirugía Ortopédica y Traumatología), Manuel Godino Izquierdo (FEA COT), José María García Herrera (FEA COT), Carlos González Hermoso (Director AIG de Biotecnología), Emilio Perea-Milla (responsable de la Unidad de Investigación), Antonio Lara Blanquer (responsable de Unidad de Documentación Clínica); del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga: Manuel Cifuentes Rueda (Prof. Titular de Fisiología), Jesús A. Santamaría García (Prof. Titular de Biología Celular), Pilar Arrabal García (becaria posdoctoral, FIS), Rick Visser (becario posdoctoral, MECD), Silvia Claros Gil (becaria predoctoral, PAI), Julia Collantes Ocón (becaria predoctoral).

Financiación

Los autores agradecen a la financiación pública y privada que ha sufragado este programa de investigación. Especialmente al Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2006-03599, BIO2009-13903-C02-01, PLE2009-0163), Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS PI06/ 1855; RD06/ 0010/ 0014), Red TerCel (Instituto de Salud Carlos III), Junta de Andalucía (P07-CVI-2781, PAIDI BIO-217, 53/ 00; TCRM 0012/ 2006), Fundación Mapfre Medicina, Fina Biotech y Unión Europea (EU 101 EUDRACT CT nº 2004-000675-34).

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Deyo RA, Cherkin D, Conrad D, Volinn E. Cost, controversy, crisis: low back pain and the health of the public. *Annu Rev Public Health*. 1991;12:141-56.
2. NPHS Public Use Microdata Documentation. Ottawa: Statistics Canada; 1995.
3. Burdorf A, Sorock G. Positive and negative evidence of risk factors for back disorders. *Scand J Work Environ Health*. 1997;23: 243-56.
4. Guerado E. Osteogénesis terapéutica en cirugía del raquis. Bases científicas de la artrodesis vertebral. I: Fundamentos biomecánicos. *Rev Ortop Traumatol*. 2005;49:29-45.
5. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor site. *J Orthop Trauma*. 1989;3:192-5.
6. Programa de centros de investigación en red sobre bioingeniería, biomateriales y nanotecnología (CIBER-bbn) y La Red de Terapia Celular (Red TerCel) del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España. Disponible en: <http://www.ciber-bbn.es> y <http://www.red-tercel.com>
7. Cuenca-López MD, Zamora-Navas P, García-Herrera JM, Godino M, López-Puertas JM, Guerado E, et al. Adult stem cells applied to tissue engineering and regenerative medicine. *Cell Mol Biol* (Noisy-le-grand). 2008;54:40-51.
8. Marí-Beffa M, Santamaría JA, Murciano C, Santos-Ruiz L, Andrade JA, Guerado E, et al. Zebrafish fins as a model system for skeletal human studies. *Scientific World J*. 2007;7:1114-27.
9. Bécerra J, Guerado E, Claros S, Alonso M, Bertrand ML, González C, et al. Autologous human-derived bone marrow cells ex-

posed to a novel TGF-beta1 fusion protein for the treatment of critically sized tibial defect. *Regen Med.* 2006;1:267-78.

10. Becerra J, Andrades JA, Santamaría JA, Cifuentes M, Guerado E. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería de tejidos. *Med Clin (Barc).* 2001;116:23-34.
11. Visser R, Arrabal PM, Becerra J, Rinas U, Cifuentes M. The effect of an rhBMP-2 absorbable collagen sponge-targeted system on bone formation in vivo. *Biomaterials.* 2009;30:2032-7.
12. Claros S, Alonso M, Becerra J, Andrades JA. Selection and induction of rat skeletal muscle-derived cells to the chondro-osteogenic lineage. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2008;54:1-10.
13. Alonso M, Claros S, Becerra J, Andrades JA. The effect of type I collagen on osteochondrogenic differentiation in adipose-derived stromal cells in vivo. *Cytotherapy.* 2008;10:597-610.
14. Guerado E, Díaz-Martín A, Arrabal MP, Cifuentes M, Andrades JA, Becerra J. Células madre e ingeniería tisular ósea. Bases celulares y perspectivas terapéuticas. *Rev Ortop Traumatol.* 2003;47:362-74.
15. Andrades JA, Han B, Nimni ME, Ertl DC, Simpkins RJ, Arrabal MP, et al. A modified rhTGF-beta1 and rhBMP-2 are effective in initiating a chondro-osseous differentiation pathway in bone marrow cells cultured in vitro. *Connect Tissue Res.* 2003;44:188-97.
16. Andrades JA, Santamaría JA, Wu LT, Hall FL, Nimni ME, Becerra J. Production of a recombinant human basic fibroblast growth factor with a collagen binding domain. *Protoplasma.* 2001;218:95-103.
17. Andrades JA, Wu LT, Hall FL, Nimni ME, Becerra J. Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. *Growth Factors.* 2001;18:261-75.
18. Andrades JA, Santamaría JA, Nimni ME, Becerra J. Selection and amplification of a bone marrow cell population and its induction to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1: an in vitro and in vivo study. *Int J Dev Biol.* 2001;45:689-93.
19. Delawi D, Dhert WJA, Rillardon L, Gay E, Prestamburgo D, García-Fernández C, et al. A prospective, randomized, controlled, multi-center, study of OP-1 in instrumented posterolateral fusions. Report on safety and feasibility. *Spine.* 2010 [en prensa].
20. Binomial distribution 2-sample arcsine approximation. Disponible en: <http://ebook.stat.ucla.edu/calcula/b-2-arcsine/b-2-arcsine-samp.html>
21. Marchesi DG. Spinal fusions: bone and bone substitutes. *Eur Spine J.* 2000;9:372-8.
22. Tan GH, Boss BG, Thorpe PJ, Williams RP. CT-based classification of long spinal allograft fusion. *Eur Spine J.* 2007;16:1875-81.
23. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg (Am).* 2003;85:A1544-52.
24. Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz HN, et al. A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 putty (rh-BMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine.* 2004;29:1885-92.
25. Furlan JC, Perrin RG, Govender PV, Petrenko Y, Massicotte EM, Rampersaud YR, et al. Use of osteogenic protein-1 in patients at high risk for spinal pseudarthrosis: a prospective cohort study assessing safety, health-related quality of life, and radiographic fusion. *Spine.* 2007;7:486-95.
26. Bridwell KH, Anderson PA, Boden SD, Vaccaro AR, Wang JC. What's new in spine surgery. *J Bone Joint Surg (Am).* 2007;89: A1654-63.
27. Lu J, Bhargav D, Wei AQ, Diwan A. Posterolateral intertransverse spinal fusion possible in osteoporotic rats with BMP-7 in a higher dose delivered on a composite carrier. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008;33:242-9.
28. Glassman SD, Dimar JR 3rd, Burkus K, Hardacker JW, Pryor W, Boden SD, et al. The efficacy of rhBMP-2 for posterolateral lumbar fusion in smokers. *Spine.* 2007;32:1693-8.
29. Kawakami M, Hashizume H, Matsumoto T, Enyo Y, Okada M, Yoshida M, et al. Safety of epidural administration of Osteogenic Protein-1 (OP-1/ BMP-7): Behavioral and macroscopic observation. *Spine.* 2007;32:1388-93.
30. Vaccaro AR, Lawrence JP, Patel T, Katz LD, Anderson DG, Fischgrund JS, et al. The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis: A long-term (>4 years) pivotal study. *Spine.* 2008; 33:2850-62.
31. Ackerman SJ, Mafilius MS, Polly DW Jr. Economic evaluation of bone morphogenetic protein versus autogenous iliac crest bone graft in single-level anterior lumbar fusion: an evidence-based modeling approach. *Spine.* 2002;27 Suppl:S94-9.
32. Papakostidis C, Kontakis G, Bhandari M, Giannoudis PV. Efficacy of autologous iliac crest bone graft and bone morphogenetic proteins for posterolateral fusion of lumbar spine: a meta-analysis of the results. *Spine.* 2008;33:680-92.
33. Boden SD, Martin GJ, Morone M, Ugbo JL, Titus L, Hutton WC. The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion. *Spine.* 1999;24:320-7.
34. Mroz TE, Joyce MJ, Steinmetz MP, Lieberman IH, Wang JC. Musculoskeletal allograft risks and recalls in the United States. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16:559-65.
35. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9:641-50.