

# Osteogénesis terapéutica en cirugía del raquis. Bases científicas de la artrodesis vertebral. II: fundamentos biológicos

E. Guerado Parra<sup>a</sup>, M. Godino Izquierdo<sup>a</sup>, J. Andrades Gómez<sup>b</sup> y J. Becerra Ratia<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Hospital Costa del Sol. Departamento de Cirugía.

Universidad de Málaga. Marbella. Málaga. <sup>b</sup>Departamento de Biología Celular y Fisiología. Universidad de Málaga. Málaga.

**Introducción.** Una artrodesis sobre raquis tiene dos pasos claramente diferenciados: la colocación de un sistema de fijación y la adición de una sustancia osteogénica, generalmente tejido óseo, que pretende estimular la formación de hueso entre los niveles deseados.

**Biología molecular de las BMP.** Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) participan en la multiplicación, diferenciación, muerte programada (apoptosis) y morfogénesis.

**Sustitutos óseos.** El sustituto óseo ideal siempre ha sido el injerto autólogo, que provee células vivas del propio individuo y factores de crecimiento (FC), además de hueso propiamente dicho. Todos los nuevos sustitutos que han ido apareciendo deben cumplir con las condiciones fundamentales del autoinjerto, pero no con sus inconvenientes, entre los que se encuentran la morbilidad de la zona donante y la cantidad limitada de la que se dispone.

**Factores de crecimiento.** Aunque actualmente existen publicaciones donde se muestra que la administración de FC en la artrodesis vertebral estimula la osteogénesis, se desconoce la forma de administración con relación a la dosis, transportadores o momento de administrar cada factor.

**Terapia génica.** La ingeniería genética, aun siendo una apuesta de futuro importante, necesita todavía mucho camino para ser una realidad en la aplicación para la promoción de la osteogénesis terapéutica.

**Palabras clave:** raquis, cirugía, osteogénesis, biología.

## Therapeutic osteogenesis in spinal surgery. Scientific basis of vertebral fusion. II: Biological principles

**Introduction.** Spinal fusion has two clearly differentiated steps: a fixation system and addition of an osteogenic substance, generally bone tissue, intended to stimulate bone formation between levels.

**Molecular biology of BMP.** BMPs participate in multiplication, differentiation, programmed death (apoptosis), and morphogenesis.

**Bone substitutes.** The ideal bone substitute has always been an autologous graft, which supplies living cells and GF from the host, in addition to bone. Any new substitute should meet the basic conditions of an autograft without its drawbacks, which include damage to the harvest area and a limited harvest.

**Growth factors.** Although it has been reported that the administration of growth factors stimulates osteogenesis during spinal fusion, the specifics of administration such as optimal dose and suitable transporters and timing are unknown for each factor.

**Gene therapy.** Genetic engineering, although an important option for the future, still requires work to become a reality in therapeutic osteogenesis.

**Key words:** spine, surgery, osteogenesis, biology.

El objetivo de cualquier osteosíntesis sobre el raquis consiste en propiciar las condiciones estáticas adecuadas hasta que se forme hueso, el cual se estimula mediante la

aportación de las sustancias osteogénicas que se añaden durante la cirugía. Así pues una artrodesis sobre raquis tiene dos pasos claramente diferenciados: la colocación de un sistema de fijación y la adición de una sustancia osteogénica, generalmente tejido óseo, que pretende estimular la formación de hueso entre los niveles deseados.

El tejido óseo tiene unas funciones esenciales en la homeostasis del calcio y otros electrolitos; el hueso, como órgano, constituye una combinación de numerosos tipos celu-

*Correspondencia:*

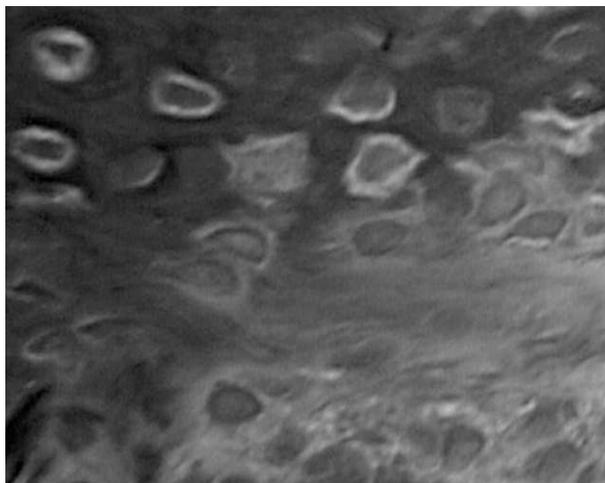
E. Guerado Parra.  
Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología.  
Hospital Costa del Sol. Universidad de Málaga.  
29600. Marbella (Málaga).  
correo electrónico: eguerado@hcs.es

lares que sintetizan y destruyen los componentes de su matriz. Esta función es realizada principalmente por los osteoblastos que dan lugar a elementos estructurales de la matriz ósea extracelular y los osteoclastos que la destruyen. Ciertas proteínas de síntesis local, como los factores de crecimiento (FC), se segregan por otras células presentes en la médula (fibroblastos, células hematopoyéticas, células endoteliales, etc.) o pueden ser depositadas por el propio sistema circulatorio. El resultado es un entramado que no solamente confiere una adecuada configuración mecánica que satisface las demandas esqueléticas, sino que también permite una continua remodelación ósea a lo largo de toda la vida.

El proceso de reparación de fracturas o de incorporación de injertos, ambos englobados dentro del concepto de osteogénesis (formación de hueso), constituye una recapitulación de los eventos embrionarios que incluye una compleja interacción de los factores reguladores con las células y la matriz. La osteogénesis da lugar a la regeneración de una estructura ósea que fisiológica y biomecánicamente es idéntica al hueso original.

## FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS

La osteogénesis está constituida por 5 fases: inflamación, vascularización, osteoinducción, osteoconducción y remodelación. La inflamación dura alrededor de dos semanas en el caso de los autoinjertos y mucho más en los aloinjertos. La vascularización se caracteriza por la aparición de blastemas vasculares que desde el lecho invaden el injerto. En esta fase pueden aparecer los fenómenos antigénicos de sensibilización en el caso de los aloinjertos, además de verse interrumpido el proceso de vascularización debido a infección, inflamación excesiva u otras causas<sup>1</sup>. Con la vascularización, llegan las células pluripotenciales (CM) que se diferencian a osteoblastos y representan el tercer estadio, la osteoinducción, que aparece por encima de las tres semanas. La diferenciación de las CM a osteoblastos se estimula mediante unas proteínas conocidas como proteínas morfogenéticas de hueso (*Bone morphogenetic protein* [BMP]), responsables de la osteoinducción. Estas proteínas entran dentro del gran grupo conocido como FC. Las CM antes de diferenciarse se multiplican, consiguiendo de este modo que haya más cantidad de osteoblastos (fig. 1). Los osteoblastos se depositan en la superficie de las trabéculas, a la vez que los osteoclastos, que no proceden de las CM, sino de los monocitos que vienen con la vascularización, y reabsorben el hueso necrótico (remodelación). Tanto la osteoinducción como la remodelación duran varios meses en el autoinjerto esponjoso pero pueden durar varios años en el hueso cortical y, sobre todo, en el aloinjerto. Esto hace que las artrodesis mediante aloinjerto puedan fracasar pasados años de la intervención, cuando el



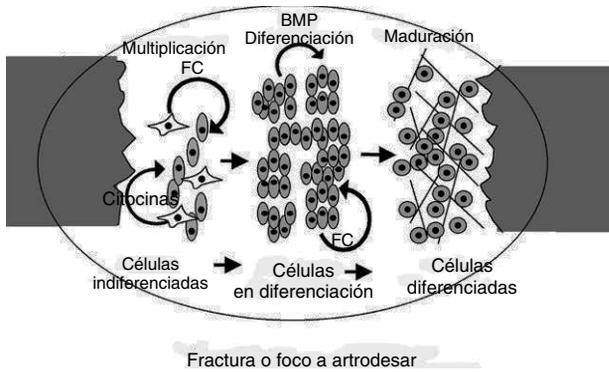
**Figura 1.** Las células mesenquimáticas indiferenciadas se diferencian a la línea osteogénica, aponiéndose en las trabéculas formadas, sintetizando hueso y quedando rodeado del mismo, circunstancia que les hace cambiar de denominación a osteocitos. Así, una misma célula al ir cambiando de fenotipo cambia de función y de denominación (picrosirio  $\times 100$ ).

hueso se ha reabsorbido y la instrumentación ha fracasado. Cuanto mejor estén aplicados los principios de la instrumentación más durará el implante pero al final, probablemente, acabará por fracasar.

Todo este ciclo de regeneración se encuentra acoplado y depende parcialmente de la actividad de las proteínas morfogenéticas de hueso, las BMP, anteriormente enunciadas.

Cuando se precisa una regeneración esquelética como la reparación de una fractura, la respuesta inflamatoria activa unas reacciones en cadena de tal manera que la lesión vascular en la zona de fractura provoca la extravasación y una serie de señales celulares. Estirpes celulares sanguíneas, del tejido conectivo y diferentes factores de crecimiento segregados o inducidos por unos u otros tipos celulares (PDGF, TGF- $\beta$  y bFGF) participan en el proceso<sup>2-3</sup> (fig. 2).

A los 3-5 días de haberse producido la fractura se desarrolla un blastema que consiste en un conjunto de nuevos vasos sanguíneos, células (madre mesenquimáticas, fibroblastos y macrófagos) e isotipos de colágeno. La adhesión selectiva de los factores de crecimiento a los distintos tipos de colágeno pueden localizar, proteger y posicionar temporalmente a estos factores con el fin de optimizar las interacciones celulares<sup>4</sup>. De esta manera, el componente colágeno del tejido en reparación constituye un sustrato clave que permite la adhesión de los factores de crecimiento y las BMP a las células receptoras. Conviene repetir que las BMP son FC, aunque al referirse a ellas siempre se traten como a un grupo aparte, ya que su función fundamental no es la multiplicación celular sino la diferenciación. Las células indiferenciadas que aportan los vasos o que proceden del estroma medular, así como las células osteoprogenitoras loca-



**Figura 2.** Acontecimientos en un foco de osteogénesis. Tras producirse una fractura o, en este caso, extirpar el hueso cortical de los segmentos a artrodesar, se liberan unos mediadores (factores de crecimiento [FC]) que estimulan a las células indiferenciadas a multiplicarse; una vez que se multiplican, las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) las diferencian al linaje osteogénico, madurando y sintetizando la sustancia osteoide que, tras mineralizarse, constituye el hueso. Estas etapas distintas coexisten al mismo tiempo en campos distintos.

lizadas en el periostio y endostio se unen al colágeno del tejido de granulación, permitiendo su diferenciación en condroblastos y osteoblastos al amparo de moléculas de señalización, principalmente BMP<sup>4,5</sup>. La influencia biológica de las BMP en la diferenciación celular es de particular interés en relación con la formación de tejido óseo. El proceso final de remodelación ósea posterior a la reparación es dirigido por los osteoblastos y osteoclastos.

La relevancia clínica de las BMP y su influencia sobre ciertas poblaciones celulares representa la ruta final común de los numerosos elementos que intervienen a lo largo del proceso de reparación de fracturas. Las células deben ser capaces de responder a la señal de las BMP y, a su vez, es necesario que exista la suficiente cantidad y diversidad de BMP biológicamente activas que den lugar al efecto deseado, la regeneración anatómica y funcional del hueso. Tanto las BMP como sus correspondientes receptores actúan en el proceso de consolidación ósea como elementos auxiliares absolutamente indispensables modulando la secuencia de eventos<sup>6,7</sup>.

Este grupo de proteínas está directamente relacionado con los fenómenos de condrogénesis y osteogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. En la actualidad son numerosos los inconvenientes que se van resolviendo en relación con las mismas, y entre ellos destacan los relacionados con las fuentes de síntesis y con los materiales transportadores, naturales o sintéticos a los que deben adherirse.

## BIOLOGÍA MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DEL HUESO

Las BMP son citoquinas multifuncionales que están incluidas dentro del gran grupo de los factores transformado-

res del crecimiento (*transforming growth factor* [TGF] y, por ello, a este gran grupo se le denomina vulgarmente «factores de crecimiento», constituido por 43 proteínas distintas. Las TGF inducen la diferenciación celular (como la de células mesenquimáticas indiferenciadas, o células madre, a osteoblastos), pero también, y sobre todo, la multiplicación. El efecto de estas moléculas se realiza mediante unos receptores en la membrana celular que una vez activados, activan a su vez a unas proteínas intracelulares (proteínas Smad) que desempeñan un papel fundamental en las actividades osteogénicas de las células inducidas por las BMP. Se conocen tres tipos de receptores para los TGF (los tipo I y II son responsables de la actividad de señalización de las BMP). Ambos receptores poseen características de receptores serina-treonina quinasa e interaccionan con las proteínas Smad (fig. 3). El tipo de activación de las proteínas Smad depende del tipo de receptor para BMP activado y del tipo de BMP que se une al receptor<sup>8-11</sup>.

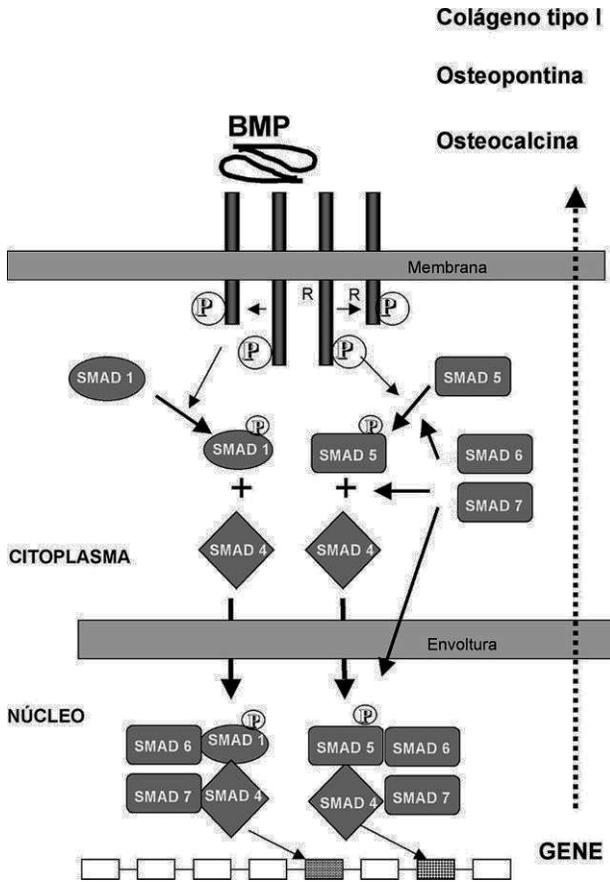
Hasta el momento se han descrito más de una veintena de BMP, donde se incluyen factores de secuencia homóloga, responsables de inducir hueso ectópico, formación condroblástica o desarrollo visceral. Así pues las BMP participan en la multiplicación, diferenciación, muerte programada (apoptosis) y morfogénesis. Las BMP suelen tener 30-38kDa que son sintetizados como prepropéptidos, consistentes en 400-525 aminoácidos, variando en los sitios de glucosilación ligada al nitrógeno. De este modo las BMP se clasifican según la secuencia de sus aminoácidos en los 6 grupos siguientes<sup>12-14</sup>:

- 1) Grupo I. BMP-2; BMP-4.
- 2) Grupo II. BMP-3; BMP-3b.
- 3) Grupo III. BMP-5; BMP-6; BMP-7; BMP-8; BMP-8b (en ratón).
- 4) Grupo IV. BMP-9; BMP-10.
- 5) Grupo V. BMP-12; BMP-13; BMP-14.
- 6) Grupo VI. BMP-11 y GDF-8 (myostatin).

## GÉNESIS DE LA ARTRODESIS VERTEBRAL

La artrodesis vertebral no es más que un proceso de osteogénesis que une segmentos vertebrales con tejido óseo, al que se ayuda mediante un sistema mecánico que inmovilice la columna vertebral (fig. 4). La osteogénesis consiste en la formación de hueso, basada en la diferenciación de las células mesenquimáticas indiferenciadas (células madre o troncales [CM]) a osteoblastos. Estas CM son capaces de diferenciarse a cualquier estirpe celular de características mesenquimáticas. Cuando lo hacen a osteoblastos, éstos producen la sustancia osteoide que posteriormente se mineraliza constituyendo, junto con las propias células, el tejido óseo.

El que las CM se diferencien a osteoblastos (linaje osteogénico) se ve condicionado y modulado por la secreción lo-



**Figura 3.** El efecto de los factores de crecimiento (FC) se realiza mediante unos receptores en la membrana celular que, una vez activados, activan a su vez a unas proteínas intracelulares (proteínas Smad) que desempeñan un papel fundamental en las actividades osteogénicas de las células inducidas por las BMP. Se conocen tres tipos de receptores para los Transforming growth factor (TGF) (los tipo I y II son responsables de la actividad de señalización de las proteínas morfogenéticas de hueso [BMP]). Ambos receptores poseen características de receptores serina-treonina quinasa e interaccionan con las proteínas Smad. El tipo de activación de las proteínas Smad depende del tipo de receptor para BMP activado y del tipo de BMP que se une al receptor.

cal de las moléculas polipeptídicas que se fijan en los receptores de membrana de las CM (FC). Los FC, como se ha visto anteriormente, no están relacionados con el crecimiento propiamente dicho, sino que deben su denominación al estímulo que algunos proporcionan sobre la multiplicación celular (crecimiento celular), aunque no todos actúan sobre el crecimiento celular, sino que hay factores que propician diferenciación. El porqué las CM se diferencian a osteoblastos, a condroblastos o a fibroblastos se debe a que se segreguen unos factores u otros, los cuales dependen, a su vez, de variables diversas, entre las que están fundamentalmente la inmovilización del foco y su vascularización.

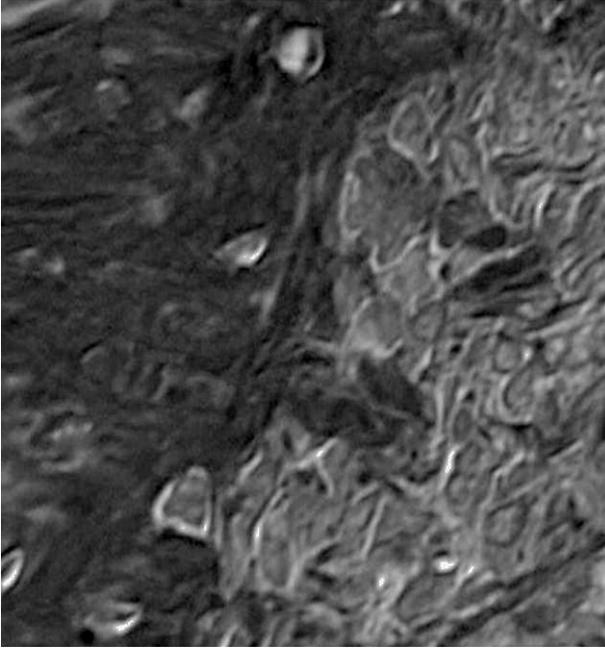
Cuando un foco de fractura o artrodesis está sometido a movimiento y pobremente vascularizado, la población celular de CM recibirá una señal mediante unos mediadores (FC) que las inducirán a una diferenciación fibroblástica y,



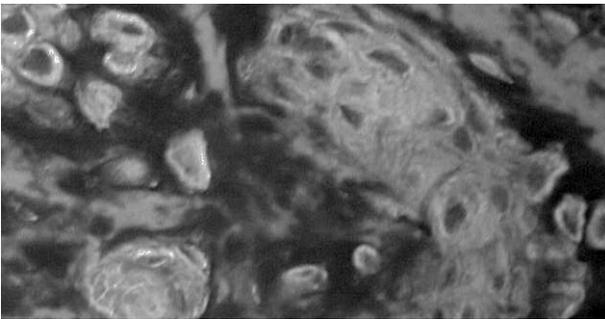
**Figura 4.** Las artrodesis se estabilizan como ocurre con las artroplastias no cementadas. Se coloca un sistema de osteosíntesis que estabiliza los segmentos (estabilidad primaria) para que el sustituto óseo una los segmentos a artrodesar y la estabilización sea a través de hueso (estabilidad secundaria). Si no se consigue la estabilidad secundaria (mediante hueso) la osteosíntesis puede acabar fracasando (sistema pedicular Xia® Stryker más autoinjerto).

con ello, el foco se caracterizará por el relleno de un tejido fibroso que fracasa en consolidar los extremos fracturarios. Este acontecimiento, que se denomina clínicamente no unión o pseudoartrosis atrófica, permanecerá aun cuando el foco sea inmovilizado ulteriormente o reciba vascularización (fig. 5). Para que un foco de pseudoartrosis atrófica sea viable y produzca fusión de los fragmentos es necesario volver a comenzar el proceso de osteogénesis mediante la extirpación del foco fibroso, dejando los extremos libres del mismo y con tejido óseo, revascularizando el foco e inmovilizando propiamente. Por supuesto es necesario que llegue una población de CM y de FC que las multiplique y diferencie al linaje osteogénico.

Cuando un foco de fractura o artrodesis está sometido a movimiento y bien vascularizado la población de CM recibirá otros mediadores distintos y, en este caso, la multiplicación celular se verá seguida de una diferenciación condrogénica. Este acontecimiento, conocido como no unión o pseudoartrosis hipertrofica, permanecerá igualmente, aunque si el foco es inmovilizado de forma adecuada el fenotipo cambiará a la formación de tejido óseo y, por tanto, el foco de fractura consolidará ambos fragmentos (fig. 6). También aquí se liberarán, tras la inmovilización, unos FC que induzcan al linaje osteogénico.

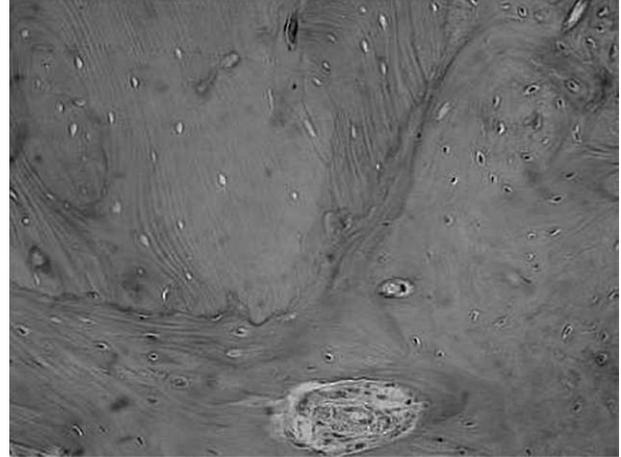


**Figura 5.** Cuando un foco de fractura o artrodesis está sometido a movimiento y pobremente vascularizado, la población celular de células pluripotenciales (CM) recibirá una señal, mediante unos mediadores (factores de crecimiento [FC]) que las inducirán a una diferenciación fibroblástica y, con ello, el foco se caracterizará por el relleno de un tejido fibroso que fracasa en consolidar los extremos fracturarios. Este acontecimiento, que se denomina clínicamente no unión o pseudoartrosis atrófica, permanecerá aun cuando el foco sea inmovilizado ulteriormente o reciba vascularización (picrosirio  $\times 100$ ).



**Figura 6.** Cuando un foco de fractura o artrodesis está sometido a movimiento y bien vascularizado, la población de células pluripotenciales (CM) recibirá unos mediadores distintos a cuando no está vascularizado o sin movimiento y, en este caso, la multiplicación celular se verá seguida de una diferenciación condrogénica. Este acontecimiento, conocido como no unión o pseudoartrosis hipertrófica, permanecerá igualmente, aunque si el foco es inmovilizado de forma adecuada el fenotipo cambiará a la formación de tejido óseo y, por tanto, el foco de fractura consolidará ambos fragmentos. También aquí se liberarán, tras la inmovilización, unos factores de crecimiento (FC) que induzcan el linaje osteogénico (picrosirio  $\times 100$ ).

La última eventualidad aparece cuando un foco fracturario o de artrodesis está bien vascularizado y sometido a inmovilización. En este caso, las CM se multiplicarán y diferenciarán a osteoblastos provocando la consolidación del foco de fractura y la unión de los fragmentos. Sin embargo,



**Figura 7.** Cuando un foco fracturario o de artrodesis está bien vascularizado y sometido a inmovilización las células pluripotenciales (CM) se multiplicarán y diferenciarán a osteoblastos provocando la consolidación del foco de fractura y la unión de los fragmentos. Sin embargo, ya que la inmovilización absoluta mediante métodos mecánicos es utópica, el callo óseo coexistirá al inicio con áreas de tejido cartilaginoso, como ocurre cuando hay movimiento con vascularización adecuada en el caso de la osificación endocranal fisiológica. En esta imagen se aprecia la consolidación de un aloinjerto (hueso muerto con lagunas osteocitarias vacías) sobre un lecho óseo normal vivo (lagunas osteocitarias con osteocito) y bien vascularizado (véase un vaso con células indiferenciadas) (H & E  $\times 40$ ).

ya que la inmovilización absoluta mediante métodos mecánicos es utópica, el callo óseo, coexistirá al inicio con áreas de tejido cartilaginoso, como ocurre cuando hay movimiento con vascularización adecuada en el caso de la osificación endocranal fisiológica (fig. 7). En los tres procesos referidos se liberarán FC diferentes.

En los hechos biomecánicos y biológicos expuestos se basa la instrumentación vertebral para realizar una artrodesis posterolateral o anterior. La instrumentación vertebral pretende fijar el foco una vez que éste se ha preparado dejando al descubierto el tejido óseo, desnudándolo del músculo y decorticándolo de forma que haya apertura de la microvascularización del hueso al foco, para así permitir que lleguen las CM y los FC desde la médula ósea. En la artrodesis vertebral posterolateral, la más frecuentemente realizada, sin embargo, el problema no es la falta de vascularización, sino la distancia que han de recorrer las células entre las apófisis transversas o la falta de hueso esponjoso rico en médula ósea entre las láminas de los niveles a artrodesar.

En el fracaso de una artrodesis, que va desde la no visión radiográfica del puente óseo a la ulterior rotura, por fracaso ya del implante, intervienen diversos hechos, fundamentalmente biomecánicos y biológicos. El foco de artrodesis requiere que esté estable, que el lecho esté bien vascularizado, pero que, además, la médula ósea tenga riqueza de CM, así como que estén cercanos los lechos a artrodesar. Por ejemplo, es fácil conseguir que en un individuo joven una articulación interfacetaria se consolide cuando sus carillas se desnudan e inmovilizan adecuadamente. Sin embargo, en un

individuo anciano, donde la población de CM es muy escasa, es difícil que se forme un puente óseo intertransverso.

Así pues, hay diferencias en el éxito de la artrodesis, según sea anterior o posterior y, más aún, si se trata de uno o varios niveles, individuo joven o viejo, la técnica quirúrgica, etc. Cuanto más joven sea el paciente, menor el número de niveles, en una artrodesis intersomática anterior y la técnica quirúrgica proporcione un lecho de tejido esponjoso, más éxito tendrá la artrodesis; por ello se ha recomendado el aloinjerto para la artrodesis cervical anterior, si bien en la artrodesis intersomática anterior de la columna lumbar los resultados pueden ser igualmente satisfactorios<sup>15-18</sup>. Sin embargo, la artrodesis posterolateral es una zona cuyo hueso es fundamentalmente cortical, con menos superficie para la fusión y un plano submuscular que puede dejar cavidades no bien vascularizadas<sup>19</sup>, y por ello los resultados son peores.

Influyen también el número de niveles fusionados, ya que las sollicitaciones mecánicas son mayores cuantos más segmentos hay, por lo que se ha introducido la utilización de instrumentación segmentaria<sup>20-23</sup>.

Aunque el microambiente es diferente entre un foco de fractura en un hueso largo y en una artrodesis vertebral, lo es incluso entre los distintos tipos de artrodesis vertebral intersomática o posterolateral; la utilización de los avances en biología molecular para investigar la secuencia característica de la expresión génica que acontece en la artrodesis posterolateral del raquis<sup>24,25</sup> han mostrado que el patrón de agentes osteoinductivos, como las BMP, son similares. Igual que ocurre en las fracturas donde la introducción de osteosíntesis ha mejorado la incidencia de consolidaciones, en el raquis la introducción de instrumentaciones ha aumentado la probabilidad de éxito de una artrodesis vertebral. Sin embargo, a la fijación interna también se le ha achacado que puede ocasionar *stress shielding* o distribución anormal de las cargas que pueda llevar a no unión, fracaso potencial de la instrumentación y, por tanto, reintervención<sup>26,27</sup>. El conocimiento de los aspectos biomecánicos requiere mayor profundización y su relación con los biológicos se trata con más profundidad en otro artículo de esta revista<sup>28</sup>.

## SUSTITUTOS ÓSEOS

Según se ha expuesto anteriormente, una artrodesis consiste en la colocación de un sistema de instrumentación y el aporte de hueso o un sustituto de hueso que promueva la osteogénesis.

El sustituto óseo ideal siempre ha sido el injerto autólogo, que provee células vivas del propio individuo y FC, además de hueso propiamente dicho. Todos los nuevos sustitutos que han ido apareciendo deben cumplir con las condiciones fundamentales del autoinjerto, pero no con sus inconvenientes, entre los que se encuentran la morbilidad de la zona donante y la cantidad limitada de la que se dispone.

El sustituto óseo ideal debe poseer gran potencial osteogénico, al menos como el autoinjerto, ausencia de capacidad antigénica o morbilidad local, cantidad no limitada, no necesitar aumento del tiempo de cirugía, aplicación fácil y costes razonables.

Los sustitutos óseos se pueden dividir en tres grupos:

1) Materiales osteoformadores. Forman hueso *per se* y al fusionarse constituyen hueso de la propia artrodesis. Un ejemplo es el autoinjerto. Es el fenómeno más activo, ya que se provee tanto el andamiaje del tejido óseo (por ello el hueso esponjoso es mejor que el cortical), como factores y células.

2) Materiales osteoconductores. Son materiales que no poseen ninguna capacidad osteogénica ni osteoinductora, simplemente sirven de andamiaje para que el hueso pueda crecer a través de ellos. Un ejemplo es la hidroxiapatita porosa. La osteoconducción es un fenómeno pasivo, ya que el material osteoconductor no provee células ni factores de crecimiento.

3) Materiales osteoinductores. Poseen capacidad de estimular al lecho donde está rodeado para que produzca hueso. Mezclado con autoinjerto pueden proporcionar mayor cantidad de hueso que si el autoinjerto actuara solo. Un ejemplo es la matriz ósea desmineralizada. La osteoinducción es un fenómeno dinámico que se caracteriza por la presencia de factores procedentes del injerto que estimulan activamente la función osteogénica<sup>29</sup>. En la osteoinducción no se proveen células.

## AUTOINJERTO

El autoinjerto es osteoconductor (permite que las células osteoformadoras se desarrollen a través de él), osteoinductor (estimula la formación de nuevo hueso) y osteogénico (él mismo provee células y al fusionarse es hueso en la artrodesis). El aporte de autoinjerto al foco de artrodesis vertebral es el estándar sobre el que se comparan todas las sustancias osteoinductores que se utilizan para promover la osteogénesis y llegar así a la fusión de los segmentos deseados. Sin embargo, presenta varios problemas; a pesar de ser el estándar se puede llegar a una no consolidación que se sitúa entre cifras tan altas que llegan al 15%-45%<sup>30,31</sup>, incluso utilizando un sistema de osteosíntesis adecuado. Además de ello, la alta morbilidad de complicaciones llega a una incidencia tal que uno de cada tres casos presenta una complicación, donde se incluye infección, fractura ilíaca, herniación abdominal, hemorragia y dolor indeleble, entre otras. Aunque el aloinjerto sea el estándar no es el ideal, ya que, además, se dispone de una cantidad limitada, muchas veces insuficiente.

## ALOINJERTO

El aloinjerto consiste en hueso congelado procedente de un donante humano y su ventaja potencial consiste en evitar

la morbilidad del autoinjerto. El resultado del aloinjerto depende de la situación de la artrodesis. Mientras que en la vía anterior como injerto funcional se comporta muy bien, la sustitución del autoinjerto por aloinjerto en la artrodesis posterolateral ha mostrado resultados muy pobres. La esterilización y conservación elimina las células, así como altera muchas de las proteínas que la constituyen. Su capacidad se considera, por tanto, más osteoinductiva que osteogénica. Sin embargo, su capacidad como injerto estructural en la vía cervical anterior parece ser tan importante que se alcanzan niveles de fusión similares al uso de autoinjerto, cercanos al 95% de los casos. También se observan buenos resultados cuando se utilizan como soporte estructural en casos de corporectomía parcial o total. Los resultados pueden mejorar aún más cuando se mezcla con autoinjerto y el defecto óseo se acompaña de relleno de autoinjerto compactado.

Los resultados de su utilización en la artrodesis posterolateral son muy pobres, si bien en artrodesis sobre escoliosis idiopática cuando se mezcla con autoinjerto también se mejoran los resultados, llegando a equipararse a los casos en los que se utiliza autoinjerto exclusivamente. Su utilización como sustituto aislado del autoinjerto en la artrodesis posterolateral parece que no está avalada por los resultados clínicos<sup>32</sup>, sin embargo, recientes estudios por otros autores han encontrado, en un ensayo clínico aleatorizado y controlado, que los resultados en la artrodesis posterolateral instrumentada son similares al autoinjerto, con la diferencia de no producir morbilidad<sup>33</sup>. No obstante, a pesar de tan alto nivel de evidencia, no parece que estos resultados estén corroborados por la experiencia de la mayoría de los autores y el riesgo de transmisión de enfermedades, la baja capacidad osteogénica y la demora en la consolidación de la artrodesis hacen del autoinjerto un mal material osteogénico cuando hay que fusionar varios niveles<sup>34</sup>.

## SULFATO CÁLCICO

La aparición del sulfato cálcico surgió en el siglo XIX y, desde entonces, se ha trabajado en él. El sulfato cálcico presenta poca capacidad antigénica, además de que la reabsorción osteoclástica es similar a la fisiológica; sin embargo, su capacidad osteogénica es muy escasa y sirve más como relleno de cavidades para permitir el crecimiento óseo (osteoconductor) que como elemento osteoformador. Realmente su uso es empírico y, probablemente, acabará por desaparecer dentro de los sustitutos óseos.

## CORALINA

El coral, exoesqueleto de algunos animales marinos, comenzó a utilizarse en la década de los setenta. La coralina es un término que engloba todos los derivados del coral uti-

lizados con la intención de promover la osteogénesis. Está constituida de carbonato cálcico, que puede aplicarse directamente tras eliminar su materia orgánica y comercializada con el nombre de Biocoral, o tras un proceso hidrotérmico hasta convertirlo en hidroxiapatita, comercializada con el nombre de Pro-Osteon® o hidroxiapatita porosa Interpore®. La coralina presenta una biocompatibilidad excelente, con una gran capacidad de atracción sobre los osteoblastos y el tejido vascular; también presenta la ventaja de reabsorberse hasta reemplazarse por tejido óseo mediante un proceso osteoclástico similar al fisiológico. Sus resultados como sustituto óseo no son, sin embargo, buenos, actuando más como transportador (*carrier*) de células en ingeniería tisular que sustituyendo al autoinjerto. Su precio para la cantidad que hay que utilizar en una artrodesis vertebral, aunque fuera de un solo nivel, tampoco es muy sugestivo.

## CERÁMICAS

Las cerámicas de fosfato cálcico se forman mediante calentamiento y presurización. Su biocompatibilidad es excelente, pero su reabsorción puede llegar a ser un problema porque pueden hacerlo tan lentamente que pueden permanecer dentro de la masa ósea de fusión creando un foco de estrés mecánico similar al que hace una burbuja de aire en la cementación de un vástago femoral, llevando a fracaso mecánico del hueso neoformado, con rotura ulterior de los implantes. Otras cerámicas se absorben tan rápidamente que propician la creación de tejido fibroso en vez de hueso, instaurándose una verdadera no unión fibrosa y con escasa vascularización en su interior (pseudoartrosis atrófica). El fosfato tricálcico se disuelve en 6 semanas aproximadamente, un tiempo muy corto en experimentos realizados en primates.

## COLÁGENO

Ya que el colágeno tipo I es un constituyente del hueso normal, se comenzó a utilizar como sustituto del autoinjerto cosechando fracasos al hacerlo de ese modo, pero observándose en él potenciación de los efectos osteoinductivos y osteoconductivos de la médula ósea y de las acciones osteoconductivas del fosfato tricálcico y la hidroxiapatita. La utilización presente y, al parecer, futura del colágeno, se centra en sus propiedades para transportar factores de crecimiento y células.

## MATRIZ ÓSEA DESMINERALIZADA

La matriz ósea desmineralizada (MOD) (sus siglas en inglés DBM [*Demineralized Bone Matrix*]) fue el inicio de

la biología del desarrollo aplicada a la regeneración ósea, tras los trabajos de Urist en 1965. La MOD, que posee colágeno tipo I, proteínas no estructurales y factores de crecimiento, tiene capacidad osteoinductora. Los factores que posee, sobre todo las BMP que constituyen el 0,1% del peso total de las proteínas, son los responsables de esta capacidad. La MOD no tiene propiedades estructurales y a su acción osteoinductora hay que añadirle la osteoconductor. Los estudios se basan, sobre todo, en animales de experimentación pequeños, fundamentalmente roedores; las experiencias con artrodesis posterolateral en perros han mostrado una tasa muy alta de fracasos<sup>35</sup>, así como en conejos<sup>36</sup>. Los resultados obtenidos como osteoconductor y osteoinductor han sido mejores que el aloinjerto mineralizado, pero muy inferiores al autoinjerto.

### OSTEOGÉNESIS MEDIANTE UTILIZACIÓN DE LA BIOLOGÍA REGENERATIVA

La aplicabilidad de la ingeniería tisular a la cirugía ortopédica y traumatología del raquis se centra en la consecución de artrodesis. La artrodesis posterolateral intertransversa (API) es el tipo de fijación intervertebral más frecuente para la columna lumbar degenerativa, fenómeno que suele ocurrir en edades avanzadas de la vida, según se ha expuesto anteriormente. El fracaso de la fusión alcanza el 35% de no consolidaciones, y en la morbilidad de la zona donante cuando se utiliza autoinjerto, lo cual llega a ocurrir, de media, en el 30% de los pacientes<sup>37,38</sup>.

Como alternativas al autoinjerto y aloinjerto<sup>1</sup> se han probado experimentalmente las BMP<sup>37,39</sup>. La combinación de un material osteoconductor, como el hueso desmineralizado con un osteoinductor, como las BMP, se está configurando hoy como la base de esta nueva forma de estimular la osteogénesis en el caso de la artrodesis posterolateral<sup>24</sup>. El osteoconductor ideal debe ser un material biocompatible, de fácil disponibilidad, que no produzca compresión muscular debido a su tamaño, amoldable a la zona posterolateral de la columna y capaz de permitir la rápida invasión de células mesenquimáticas, reabsorbiéndose y remodelándose a medida que el hueso neoformado va madurando<sup>37</sup>, entre otras razones por el referido problema de espacio. En clínica, para obviar este último problema, una alternativa consiste en instrumentar solamente un lado e introducir el material promotor de la osteogénesis sin provocar así compresión musculocutánea. La instrumentación unilateral, sin embargo, presenta serios inconvenientes, como la tendencia de la barra a romperse<sup>40,41</sup>. Pero además del problema de espacio, los modelos experimentales actuales son muy incompletos y con diseños metodológicos de escasa calidad<sup>24,42,43</sup>. Los estudios en conejos no utilizan instrumentación de osteosíntesis, además realizan la fusión en un solo nivel, lo cual es excesivamente favorable dada la facilidad del conejo para la

osteogénesis. La baja edad del conejo y, por tanto, su proclividad a la osteogénesis tampoco sitúa el experimento en condiciones de inferir conclusiones<sup>42</sup>. No obstante, los estudios más recientes sobre experimentación animal siguen esta línea<sup>44</sup>.

Los trabajos en primates<sup>45</sup> para estudiar la eficacia de la rhBMP-2 administrada mediante un transportador se realizan sobre muestras muy pequeñas. Por último, los estudios en humanos<sup>46</sup> añadiendo cerámica como osteotransportador no tienen en cuenta las variables para un tamaño muestral adecuado, no diseñan los grupos experimentales adecuadamente y se utiliza una combinación de hueso autólogo con aloinjerto a los que se añade bloques de cerámica. Los autores, a pesar de ello, concluyen que no es necesario añadir injerto de cresta ilíaca cuando se dispone de un transportador como la cerámica de fosfato cálcico bifásico.

La estrategia más adecuada debe ser añadir FC al foco de fusión y células madre en cantidad suficiente, capacitadas *in vitro* con FC que las induzcan a diferenciarse en células osteoprogenitoras con estabilidad primaria lo más rígida posible (fig. 8). La experiencia quirúrgica ha mostrado que las células fabrican hueso sobre hueso, por lo cual es fundamental la preparación meticulosa del lecho receptor. La posibilidad de transferir las células capacitadas en una suspensión de colágeno líquido, poco inmunogénico, que gelifica a la temperatura corporal, mezclado con fragmentos de material osteoconductor reabsorbible, previamente infiltrado también de las mismas células, parece interesante *a priori*.

Sin embargo, ni los osteoinductores ni los osteoconductores son capaces *per se* de formar hueso, dejando la formación del mismo a expensas exclusivamente de la respuesta celular local del huésped, que en muchos casos de lesiones degenerativas del raquis suelen ser, además, de edad avanzada. Aunque el hueso de animales viejos puede regenerar, lo hace más lentamente<sup>47,48</sup>. Caplan ha demostrado en humanos que, mientras el número de células madre hematopo-

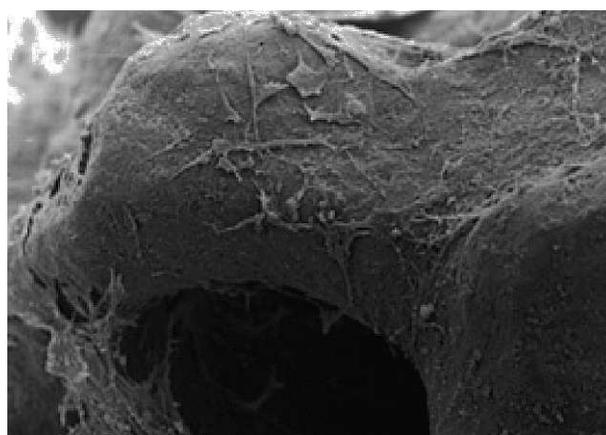


Figura 8. Trabécula de hidroapatita con células mesenquimáticas diferenciadas ex vivo al linaje osteogénico (microfotografía  $\times 200$ ).

yéticas varía muy poco con la edad, el de CM lo hace enormemente; si en el recién nacido se encuentra una CM por cada 10.000 células de médula ósea (MO), a los 80 años de edad sólo se puede encontrar una por cada dos millones<sup>48</sup>. Nimni ha demostrado que la respuesta a la implantación de matriz ósea desmineralizada (MOD) decrece en ratas viejas, siendo estimulada por la administración de células osteoprogenitoras singénicas<sup>49</sup>. El descenso de la actividad anabólica observada en huesos de individuos más viejos no puede ser debido solamente a la incapacidad de los osteoblastos y sus progenitores a progresar, puesto que éstos lo hacen en cultivo<sup>50</sup>, es decir, con la edad disminuye enormemente el número de células susceptibles de diferenciación osteoblástica, además de apreciarse una cierta dificultad de progreso por falta de «factores» o por incapacidad de las propias células.

Así pues, idealmente el implante *in situ* debe ser de células vivas capaces de producir hueso, siendo, en este sentido, la línea de investigación más activa actualmente la que trata de conocer el procedimiento de reclutamiento de células progenitoras a partir de células madre pluripotenciales y su posterior amplificación y diferenciación *in vitro* hacia el linaje osteoblástico. Si bien existe la posibilidad de cultivar directamente células cartilaginosas u óseas que, a su vez, podrían ser usadas para reparaciones de hueso, la estrategia experimental más extendida trata de buscar las células madre mesenquimáticas (CM)<sup>51,52</sup>, susceptibles de diferenciarse en los distintos tipos celulares de origen mesodérmico, que son: osteoblastos, condroblastos, adipocitos, células musculares y los distintos tipos de fibroblastos pobladores de los diferentes tejidos conectivos, tendones y ligamentos. Este proceso diferenciador, denominado frecuentemente mesengénesis, es poco conocido, siendo la mayoría de la información disponible referida a la osteogénesis, sin que se conozca, ni siquiera medianamente, si cada línea de diferenciación mantiene tipos celulares precursores independientes, o si son muchos los precursores compartidos.

## ADMINISTRACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO

Actualmente se dispone de materiales osteoconductores que liberan los FC lentamente, y que tienen capacidad estructural temporal hasta desaparecer sustituidos por hueso.

### Fuentes de proteínas morfogenéticas de hueso

Antes del desarrollo de técnicas de ingeniería genética la purificación de BMP se realizaba a partir de diversas fuentes: osteosarcoma humano, osteosarcoma de Dunn (múridos), matriz ósea desmineralizada y hueso bovino<sup>53-55</sup>. En los últimos años los avances en el campo de la biología molecular han permitido obtener estas proteínas a partir de técnicas de ADN recombinante.

El material osteogénico obtenido a partir de ADN recombinante presenta dos importantes ventajas<sup>56</sup>: la proteína que se obtiene es mucho más pura que los extractos, ya que éstos suelen presentar una mezcla indeterminada de BMP y la tecnología recombinante permite obtener un volumen suficiente de material osteoinductivo capaz de reparar defectos óseos de grandes dimensiones.

En la actualidad existen nuevas aproximaciones que persiguen la construcción de proteínas de fusión que incluyen un factor de crecimiento y dominios específicos de unión a la matriz extracelular o a células<sup>57</sup>. Bajo este planteamiento se han construido las siguientes proteínas relacionadas con el proceso regenerativo: 4 formas quiméricas de bFGF con un dominio de unión al colágeno de la colagenasa de *Clostridium histoliticum*<sup>58</sup>; TGF-β1, TGF-β2, bFGF y BMP3 con el dominio de unión al colágeno I/gelatina del factor de von Willebrand, que es un decapeptido<sup>59</sup>; TGF-β1 con el dominio de unión a la fibronectina de la trombospondina, que es un hexapeptido<sup>57</sup>.

Salvo una de las quimera de EGF, que fue producida en un sistema eucariótico, las demás proteínas de fusión se obtuvieron en un sistema de expresión procariótico. Todas estas construcciones resultaron poseer la actividad propia del factor y una alta afinidad por el colágeno, la fibronectina o células, según el caso.

La mayoría de los sistemas procarióticos de expresión de proteínas conllevan que éstas se acumulen en cuerpos de inclusión en el interior de la célula, los cuales han de ser extraídos y procesados para poder recuperar la actividad biológica. Además, como las proteínas han de ser purificadas de entre una masa de proteínas celulares no deseadas, es necesario que lleven dominios de purificación que, para el fin terapéutico que se pretende, no son muy deseables. Por tanto, si bien estos sistemas son sencillos, económicos y fácilmente escalables, presentan el problema de la alta manipulación de las proteínas de fusión producidas. Nuestro grupo de la Universidad de Málaga (UMA) ha elegido un sistema de expresión en células de insecto/baculovirus, ya que realizan la mayoría de los procesamientos postraduccionales y se obtienen importantes cantidades de proteínas. Además empleamos uno que coexpresa una chaperona como la isomerasa de puentes disulfuro (protein disulfide isomerase [PDI]) y nuestro gen de interés con una señal para que la proteína se excrete al medio de cultivo sin suero, con lo cual con un simple paso de purificación por intercambio iónico o de afinidad podremos tener las moléculas en forma nativa y sin procesamiento *in vitro*.

El grupo de trabajo de la UMA tiene experiencia en la producción de proteínas de fusión formadas por bFGF o TGF-β1 con un dominio de unión al colágeno I de alta afinidad (rhTGF-β1-F2, rhbFGF-F2, respectivamente)<sup>59-61</sup>. Por otra parte, en los últimos meses el grupo ha estado produciendo rhbFGF-F2 en eucarióticas de insecto/baculovirus, con buenos resultados, e incluso se tiene muy avanzado la de otras BMP.

Si bien la liberación local de factores osteoinductores es una de las estrategias terapéuticas que se están aplicando actualmente, es cierto que en ocasiones no es suficiente, debido a que faltan células que respondan a dichas señales y pongan en marcha la maquinaria reparativa explicada al principio de este artículo. Este déficit de células puede darse, como hemos dicho, por varias causas entre las que se encuentran el deficiente reclutamiento de células mesenquimáticas osteoprogenitoras o, simplemente, un menor número de células disponibles como consecuencia del envejecimiento<sup>48</sup>. Por todo ello, obtener células madre mesenquimáticas del paciente y amplificarlas e inducir las *in vitro* hacia células osteoprogenitoras, para posteriormente reimplantarlas en defectos óseos de difícil reparación, se ha convertido en uno de los objetivos a lograr tanto por el grupo de la UMA<sup>62-64</sup>, como por otros investigadores<sup>65,66</sup>. Concretamente, el grupo de trabajo de Málaga ha desarrollado un método de cultivo de células de médula ósea en geles de colágeno en presencia de factores de crecimiento con un dominio de alta afinidad por éste, que permite seleccionar, amplificar e inducir una población celular hacia el linaje osteoblástico, con capacidad de formar hueso *in vitro* e *in vivo*<sup>67</sup>. Este modelo de capacitación tiene grandes expectativas de aplicación, pero es susceptible de ser mejorado mediante el uso combinado de varios factores osteoinductores para utilizarlo como modelo *in vitro* de aplicación de las BMP obtenidas.

Aunque actualmente existen publicaciones donde se muestra que la administración de factores de crecimiento en la artrodesis vertebral estimula la osteogénesis, se desconoce la forma de administración con relación a dosis, transportadores o momento de administrar cada factor. Por ejemplo, la proteína bovina Ne-Osteo no induce hueso en humanos, así como la BMP-2 recombinante (rBMP-2) requiere dosis muy altas y mayor tiempo en primates que en mamíferos pequeños. Esto añade ciertas dudas sobre la posibilidad de inferencia al humano de los hallazgos encontrados en roedores y lagomorfos (ratas y conejos). Por tanto, antes de la administración humana hay que perfeccionar el sistema de la administración y también avanzar en el conocimiento de la dosis. Hasta ahora se han diseñado modelos que pretenden que haya una liberación lenta de los factores a partir de polímeros biorreabsorbibles, si bien parece que el colágeno es un buen transportador para que se produzca dicha liberación de forma prolongada. La acción de los factores de crecimiento está muy en relación, además de con la dosis, con la edad, siendo más fácil en individuos más jóvenes, con la especie donde los animales más pequeños responden con mayor facilidad y con variabilidad individual. De este modo se puede deducir la dificultad de la aplicación terapéutica, ya que la edad más frecuente con la que se realiza una artrodesis vertebral es elevada y el humano no es un animal pequeño, sino grande. Además de ello, las condiciones biomecánicas ideales para conseguir una artrodesis no están aún del todo claras<sup>28</sup>.

## PROTEÍNA OSTEOGÉNICA 1 RECOMBINANTE

La proteína osteogénica 1 recombinante (rhOP-1), también llamada rhBMP-7 se ha estudiado con detalle en defectos diafisarios de huesos largos, así como en artrodesis vertebral intersomática en oveja<sup>68</sup> y posterolateral en perros<sup>69</sup>, con resultados muy positivos, que la equiparan al autoinjerto. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que si bien su efectividad en humanos en defectos de huesos largos es muy buena cuando se administra en un transportador de colágeno<sup>70</sup>, no es la misma en cirugía raquídea cuando se pretende inyectar en artrodesis de un espacio; además la validez de estos estudios queda en entredicho, puesto que la preparación del lecho es fundamental para conseguir una buena artrodesis, habiéndose llegado a dudar de su efectividad en la artrodesis vertebral humana al utilizarla en pacientes afectados de artritis reumatoide, lo cual invalida el estudio. Aunque está en curso un ensayo clínico controlado de la aplicación de la rhOP-1 en la artrodesis vertebral humana, todavía no hay ninguna evidencia disponible sobre si la efectividad demostrada en los huesos largos es similar o no (comunicación personal). Clínicamente nuestro grupo de la UMA trabaja sobre la OP-1 en dos líneas. Un ensayo clínico multicéntrico aleatorizado y controlado sobre la aplicación de OP-1 (Osigraft® Stryker) con autoinjerto en la API y otro de las mismas características aplicando aloinjerto en el lado izquierdo y aloinjerto más OP-1 en el derecho con resultados aparentemente satisfactorios.

## rhBMP-2

Desde que a principios de los noventa, se demostró que la BMP-2 inducía hueso heterotópico en ratas, a lo largo de dicha década se han realizado muchos experimentos sobre modelos animales de artrodesis raquídea, utilizando conejos, perros, cabras y monos, con resultados muy esperanzadores. Evidentemente los resultados sobre el *macacus rhesus* son los más interesantes por la posibilidad de inferir sus resultados al humano.

En la artrodesis vertebral intersomática en *macacus rhesus*, se han realizado estudios comparativos entre el aloinjerto desecado y congelado relleno bien de autoinjerto, bien de rhBMP-2, siendo este último grupo el que mostró mejores resultados, llegando al 100% de fusiones a los 6 meses con sustitución del autoinjerto por nuevo hueso aposicional<sup>71</sup>. Los estudios utilizando cajas de titanio han mostrado resultados similares<sup>72</sup>. Estudios en humanos realizando artrodesis intersomática por vía anterior de un solo nivel han mostrado también excelentes resultados. En estos estudios se trataron 14 pacientes aleatorizados de forma prospectiva en dos grupos, uno tratado mediante cajas cilíndricas roscadas rellenas de autoinjerto procedente de cresta ilíaca y otro con cajas rellenas de rhBMP-2 embebidas en

colágeno; sin embargo, la conclusión final del trabajo recae sobre la necesidad de realizar un ensayo clínico aleatorizado<sup>73</sup>, con lo cual su validez está por precisar.

## MATERIALES TRANSPORTADORES PARA CÉLULAS Y PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO

Uno de los problemas que presenta la utilización experimental y clínica de las BMP o la terapia celular autóloga es la necesidad de disponer de un transportador adecuado para las proteínas o las células. Mientras Urist et al asocian las BMP a proteínas no colágenas (NCP), Takaoaka et al<sup>74</sup> han empleado como transportador el colágeno puro, que presenta una clara ventaja frente a los tradicionales transportadores de matriz ósea descalcificada, que contienen numerosas sustancias no identificadas. Saito et al han utilizado como transportador de las BMP obtenidas a partir de osteosarcoma de rata un polímero biodegradable de ácido poliláctico-polietilén glicol (PLA-PEG)<sup>75</sup>. Previamente, determinaron que un homopolímero de ácido poliláctico (PLA) no constituía un adecuado transportador, ya que producía reacciones frente a cuerpo extraño e inflamación crónica y su absorción y sustitución por hueso nuevo era demasiado lenta, pero por el contrario, Wheeler et al<sup>76</sup> lo consideran un transportador correcto.

Algunos autores utilizan como transportador hueso sintetizado o cerámica ósea<sup>77</sup> que actúa como un material poroso con una estructura similar al hueso trabecular y a la hidroxiapatita comercial, pero con importantes diferencias relativas al contenido en magnesio, sílice y nitrógeno.

Recientemente Kokubo et al<sup>78</sup> han introducido un nuevo transportador de esponja de colágeno recubierta con una capa de un copolímero de ácido poliláctico-glicólico (PGS) en el tratamiento de defectos óseos en cúbito de conejo, observándose resultados satisfactorios.

## TERAPIA GÉNICA

Los vectores para la administración de genes en las células, el tipo de células transfectadas y el control de la expresión de los genes son caminos que están aún muy vírgenes.

Los genes que codifican para la cascada de factores osteogénicos se introducen en las células del propio paciente situadas en el lugar deseado (*in vivo*), o bien se extraen las células, se introducen los genes y se vuelven a implantar (*ex vivo*)<sup>79</sup>. Estas células serán las encargadas de producir las proteínas osteogénicas. De este modo la vida media de la célula o del gen intracelular, no de la glucoproteína, es el tiempo necesario para la función de la proteína osteogénica. Este experimento no existe en humanos, sino en ensayos de artrodesis posterolateral de raquis en ratas con excelentes resultados. Una nueva proteína cuya función es muy precoz

en la cascada osteogénica, la proteína de mineralización LIM (proteína LIM-1), se ha transfectado *ex vivo* en células de médula ósea de rata, implantándose para artrodesis posterolateral de raquis. Los resultados mostraron que en el lugar donde se habían implantado estas células se produjo una sólida fusión, mientras que no ocurrió donde las células no se implantaron<sup>80</sup>. Otro experimento consistió en inyectar directamente un adenovirus vector que contenía la rhBMP-9 directamente sobre la musculatura raquídea de ratones, que también respondieron como el caso anterior<sup>81</sup>.

En cualquier caso la ingeniería genética, aun siendo una apuesta de futuro importante, necesita todavía mucho camino para ser una realidad en la aplicación para la promoción de la osteogénesis terapéutica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ehler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop*. 2000;371:38-45.
2. Clark RAF. The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press; 1996.
3. Hollinger J, Wong ME. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg*, 1996;85:594-606.
4. Reddi AH. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1992;4:850-5.
5. Reddi AH. Bone and cartilage morphogenesis: cell biology to clinical applications. *Curr Opin Genet Dev*. 1994;4:737-44.
6. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone*. 1998;22:591-603.
7. Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone*. 1998;22:605-12.
8. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390:465-71.
9. Hoffmann A, Gross G. BMP signalling pathways in cartilage and bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2001;11:23-45.
10. Walker DH, Wright NM. Bone morphogenetic protein in spinal fusion. *Neurosurg Focus*. 2002;13:A-3.
11. Guerado Parra E, Díaz Martín A, Arrabal García MP, Cifuentes Rueda M, Andrades Gómez JA, Becerra Ratia J. Células madre e ingeniería tisular ósea. Bases celulares y perspectivas terapéuticas. *Rev Ortop Traumatol*. 2003;47:362-74.
12. Samartzis D, Khanna N, Shen FH, An HS. Update on Bone Morphogenetic Proteins and Their Application in Spine Surgery. *J Am Coll Surg*. 2005;200:236-48.
13. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*. 1996;10:1580-94.
14. Yamashita H, Dijke P, Heldin CH, Miyazako K. Bone morphogenetic protein receptors. *Bone*. 1996;19:569-74.
15. Bishop RC, Moore KA, Hadley MN. Anterior cervical interbody fusion using autogenic and allogeneic bone graft substrate: a prospective comparative analysis. *J Neurosurg*. 1996; 85:206-10.

16. Cauthen JC, Kinard RE, Vogler JB, Jackson DE, DePaz OB, Hunter OL, et al. Outcome analysis of noninstrumented anterior cervical discectomy and interbody fusion in 348 patients. *Spine*. 1998;23:188-92.
17. Samartzis D, Shen H, Goldberg EJ, An HS. Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with rigid plate fixation. *Spine*. 2005;30:1756-61.
18. Wimmer C, Krismer M, Gluch H, Ogou M, Stockl B, et al. Autogenic versus allogenic bone grafts in anterior lumbar interbody fusion. *Clin Orthop* 1999;360:122-6.
19. Jorgenson S, Lowe T, France J, Sabin J. A prospective analysis of autograft in posterolateral lumbar fusion in the same patient: A minimum of 1 year follow-up in 144 patients. *Spine*. 1994;19:2048-53.
20. Wang JC, Mc Donough PW, Endow KK, Delamarter RB. Increased fusion rates with cervical plating for two-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine*. 2001;25:41-5.
21. Wang JC, Mc Donough PW, Kanim LEA, Endow KK, Delamarter RB. Increased fusion rates with cervical plating for three-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine*. 2000;26:643-7.
22. Bolesta MJ, Rehtine GR, Chrin AM. Three and four level anterior cervical discectomy and fusion with plate fixation: a prospective study. *Spine*. 2000;25:2040-4.
23. Bose B. Anterior cervical instrumentation enhances fusion rates in multilevel reconstruction in smokers. *J Spinal Disord*. 2001;14:3-9.
24. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC, Chen MI. The use of an osteoinductive growth for lumbar spinal fusion: Part I. Biology of spinal fusion. *Spine*. 1995;20:2626-32.
25. Morone MA, Boden SD, Hair G, Martin GJ Jr., Racine M, Titus L, et al. Gene expression during autograft lumbar spine fusion and the effect of bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop*. 1998;351:252-65.
26. Lowery GL, Mc Donough RF. The significance of hardware failure in anterior cervical plate fixation. Patients with 2-to 7-year follow-up. *Spine*. 1998;23:181-7.
27. Paramore CG, Dickman CA, Sonntag VK. Radiographic and clinical follow-up review of Caspar plates in 49 patients. *J Neurosurg*. 1996;84:957-61.
28. Guerado E. Osteogénesis terapéutica en cirugía de raquis. Bases científicas de la artrodesis vertebral. I. Aspectos biomecánicos. *Rev Ortop Traumatol*. 2005;49 Supl 1:
29. Friedlaender GE. Current concepts review. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 1987;69A:786-90.
30. Steinman JC, Herkowitz HN. Pseudoarthrosis of the spine. *Clin Orthop*. 1992;284:80-90.
31. Zdeblick TA. A prospective, randomized study of lumbar fusion. *Spine*. 1993;18:983-91.
32. Boatright KC, Boden SD. Biologic Enhancement of Spinal Arthrodesis: Past, Present, and Future. En: Fardon DF, Garfin SR, Abitbol JJ, Boden SD, Herkowitz HN, Mayer TG, editors. *Orthopaedic Knowledge Update. Spine 2*. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2002.
33. Gibson S, McLeod I, Wardlaw D, Urbaniak S. Allograft versus Autograft in Instrumented Posterolateral Lumbar Spinal Fusion. A Randomized Control Trial. *Spine*. 2002;27:1599-603.
34. Back B, Malinin T. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. *Clin Orthop*. 1989;240:129-36.
35. Cook SD, Dalton JE, Prewett AB, Whitecloud TS III. In vivo evaluation of demineralized bone matrix as a bone graft substitute for posterior spinal fusion. *Spine*. 1995;20:877-86.
36. Morone MA, Boden SD. Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix. *Spine*. 1998;23:159-67.
37. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC, Damien CJ, Benedict JJ, Baranowski C, et al. In Vivo Evaluation of a Resorbable Osteoinductive Composite as a Graft Substitute for Lumbar Spinal Fusion. *J Spinal Disord*. 1997;10:1-11.
38. Fernyhough JC, Schimandle JH, Weigel MC, Edwards CC, Levine AM. Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine*. 1992;17:1474-80.
39. Damien CJ, Christel PS, Benedict JJ, Patat JL, Guillemin G. A composite of natural coral, collagen, bone protein, and basic fibroblast growth factor tested in a rat subcutaneous model. *Ann Chir Gynaecol*. 1993;82:117-28.
40. Albers H, Hresko MT, Carlson J, Hall JE. Comparison of Single and Dual Rod Techniques for Posterior Spinal Instrumentation in the Treatment of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine*. 2000;25:1944-9.
41. Wattenberger JM, Richards BS, Herring JA. A Comparison of Single-Rod Instrumentation with Double-Rod Instrumentation in Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine*. 2000;25:1680-8.
42. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. Lumbar intertransverse process spine arthrodesis using a bovine-derived osteoinductive bone protein. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77A:1404-17.
43. Martin G, Boden S, Titus L, Scarborough N. New Formulations of Demineralized Bone Matrix as a More Effective Graft Alternative in Experimental Posterolateral Lumbar Spine Arthrodesis. *Spine*. 1999;24:637-45.
44. Suh DY, Boden SD, Louis-Ugbo J, Mayr M, Murakami H, Kim HS, et al. Delivery of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Using a Compression-Resistant Matrix in Posterolateral Spine Fusion in the Rabbit and in the Non-Human Primate. *Spine*. 2002;27:353-60.
45. Hecht B, Fisxhgrund J, Herkowitz H, Penman L, Toth J, Shirkhoda A. The Use of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2) to Promote Spinal Fusion in a Nonhuman Primate Anterior Interbody Fusion Model. *Spine*. 1999;24:629-36.
46. Delecrin J, Takahashi S, Gouin F, Passuti N. A synthetic porous ceramic as a bone graft substitute in the scoliosis: a prospective, randomized study. *Spine*. 2000;25:563-9.
47. Meunier PJ. Assessment of bone turnover by histomorphometry in osteoporosis. En: Riggs BL, Melton LJ III, editors. *Osteoporosis, Etiology, Diagnosis and Management*. New York: Raven Press; 1988. p. 317-32.
48. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994;21:429-35.
49. Nimni ME, Bernick S, Ertl DC, Nishimoto SK, Strates B, Villanueva J. Ectopic bone formation in senescent animals implanted with embryonic calvaria cells. *Clin Orthop*. 1988; 234:255-66.
50. Termine JD. Cellular activity, matrix proteins and aging bone. *Exper Gerontol*. 1990;25:217-21.
51. Owen ME. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci*. 1988;10 (Supl): 63-76.
52. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9: 641-50.
53. Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz, MJ, Luxenberg DP. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85:9484-8.
54. Katoh T, Sato K, Kawamura M, Iwata H, Miura T. Osteogenesis in sintered bone combined with bovine bone morphogenetic protein. *Clin Orthop*. 1993;287:266-75.

55. Lindholm TC, Lindholm TS, Marttinen A, Urist MR. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP/NCP)-induced repair of skull trephine defects in pigs. *Clin Orthop*. 1994;301:263-70.
56. Ellingsworth LR, Brennan JE, Fok K, Rosen DM, Bentz H, Piez KA, et al. Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor-A and transforming growth factor  $\beta$ . *J Biol Chem*. 1986;261:12362-7.
57. Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials*. 1997;18:1201-25.
58. Nishi N, Matsushita O, Yuube K, Miyanaka H, Okabe A, Wada F. Collagen-binding growth factors: production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:7018-23.
59. 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.
60. Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME. A Recombinant Human TGF-beta1 Fusion Protein with Collagen-Binding Domain Promotes Migration, Growth, and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Cells. *Exp Cell Res*. 1999;250:485-98.
61. Andrades JA, Santamaría JA, Wu LT, Hall FL, Nimni ME, Becerra J. Production of a recombinant human bFGF with a collagen-binding domain. *Protoplasma*. 2001;218:95-103.
62. Becerra J, Andrades JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res*. 1996;11:1703-14.
63. Becerra J, Andrades JA, Santamaría JA, Cifuentes M, Guerrero E. Regeneración ósea, terapia celular e ingeniería tisular. *Med Clin (Barc)*. 2001;116:23-34.
64. Becerra J, Andrades JA, Claros, S, Bertrand ML, González C, Guerrero E. Marrow Cells In Vitro Committed by a Novel TGF- $\beta$ 1 for Bone Repair Cell Therapy. A Case Report. *J Bone Joint Surg Br* (en evaluación).
65. Bianco P, Riminucci M. Stem cells in medicine. *Recenti Prog Med*. 2001;92:251-6.
66. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001;414:118-21.
67. Andrades JA, Santamaría JA, Nimni ME, Becerra J. Selection, amplification and induction of a bone marrow cell population to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1. An in vitro and in vivo study. *Int J Dev Biol*. 2001;45:689-93.
68. Cunningham BW, Janayama M, Parker LM, Weis JC, Sefler JC, Fedder JL, et al. Osteogenic protein versus autologous interbody arthrodesis in the sheep thoracic spine: A comparative endoscopic study using the Bagby and Kulisch interbody fusion device. *Spine*. 1999;24:509-18.
69. Cook SD, Dalton JE, Tan EH, Whitecloud TS III, Rueger DC. In vivo evaluation of recombinant human osteogenic protein (rhOP-1) implants as a bone graft substitute for spinal fusions. *Spine*. 1994;19:1655-63.
70. Geesink RG, Hoefnagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a fibular defect. *J Bone Joint Surg Br*. 1999;81B:710-8.
71. Hecht BP, Fischgrund JS, Herkowitz HN, Penman L, Toth JM, Shirkhoda A. The use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) to promote spinal fusion in a nonhuman primate anterior interbody fusion model. *Spine*. 1999;24:629-36.
72. Boden SD, Martin GJ, Horton WC, Truss TL, Sandhu HS. Laparoscopic anterior spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a titanium interbody threaded cage. *J Spinal Disord*. 1998;11:95-101.
73. Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages: Definitive evidence of osteoinduction in humans. A preliminary report. *Spine*. 2000;25:376-81.
74. Takaoka K, Yoshikawa H, Hashimoto J, Miyamoto S, Masuhara K, Nakahara H, et al. Purification and characterization of a bone-inducing protein from a murine osteosarcoma (Dunn type). *Clin Orthop*. 1993;292:329-36.
75. Saito N, Okada T, Horiuchi H, Ota H, Takahashi J, Murakami N, et al. Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers. *Bone*. 2003;32:381-6.
76. Wheeler DL, Chamberland DL, Schmitt JM, Buck DC, Brekke JH, Hollinger JO, et al. Radiomorphometry and biomechanical assessment of recombinant human bone morphogenetic protein 2 and polymer in rabbit radius osteotomy model. *J Biomed Mater Res*. 1998;43:365-73.
77. Ueno Y, Shima Y, Ueyoshi A, Harada M, Sakata H, Maeda T. An experimental study of sintered bone implants. *Bessatsu Seikeigeka*. 1985;8:85-8.
78. Kokubo S, Fujimoto R, Yokota S, Fukushima S, Nozaki K, Takahashi K, et al. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model. *Biomaterials*. 2003;24:1643-51.
79. Scaduto AA, Lieberman JR. Gene therapy for osteoinduction. *Orthop Clin North Am*. 1999;30:625-3.
80. Boden SD, Titus L, Hair G, Liu Y, Viggewasapu M, Nanes MS, et al. Lumbar spine fusion by local gene therapy with a cDNA encoding a novel osteoinductive protein (LMP-1). *Spine*. 1998;23:2486-92.
81. Helm GA, Alden TD, Beres EJ, Hudson SB, Das S, Engh JA, et al. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent. *J Neurosurg*. 2000;91 Supl 2:191-6.

**Conflicto de intereses.** Los autores no han recibido ayuda económica para la realización de este trabajo. Tampoco han firmado ningún acuerdo por el que vayan a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial por la realización de este trabajo. Por otra parte ninguna entidad ha pagado ni pagará a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estén afiliados.