

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**INGENIERÍA TISULAR EN
APARATO LOCOMOTOR**



DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Victoria Gómez Ruiz



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

El profesor Dr. D. Javier Montero Martín, director del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la presente memoria de tesis doctoral, elaborada por Doña Victoria Gómez Ruiz para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, con el título **“Ingeniería Tisular en Aparato Locomotor”** realizada bajo la dirección de los profesores Juan Francisco Blanco Blanco y David Pescador Hernández, reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador para poder optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, expide y firma la presente certificación

Salamanca, a 8 de Mayo de 2023

Fdo. Prof. Dr. Javier Montero Martín



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Juan Francisco Blanco Blanco, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Salamanca y Profesor titular del departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.

David Pescador Hernández, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Salamanca y Profesor asociado del departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que la de tesis doctoral que presenta al superior juicio del Tribunal, que designe la Universidad de Salamanca, Doña Victoria Gómez Ruiz y titulada **“Ingeniería Tisular en Aparato Locomotor”** ha sido realizada bajo nuestra supervisión, siendo expresión de la capacidad científica de su autor, que le hacen acreedor del título de Doctor, siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Salamanca, a 8 de Mayo de 2023

Fdo.: Prof. Dr. Juan F. Blanco Blanco

Fdo.: Prof. Dr. David Pescador Hernández

ABREVIATURAS

AP: Anteroposterior.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

MO: Médula ósea.

DBM: Matriz ósea desmineralizada.

BMP: Proteína morfogenética ósea.

VIH: Virus inmunodeficiencia humana.

VHB: Virus hepatitis B.

VHC: Virus hepatitis C.

CSM: Célula stem mesenquimal.

ESC: Célula madre embrionaria.

CPH: Célula progenitora hematopoyética.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

MAPC: "Multipotent Adult Progenitor Cells".

MIAMI: "Human marrow isolated adult multilineage inducible cells".

VSEL: "Very small embryonic-like stem cells".

CFU-F: Unidad formadora de colonias fibroblásticas.

CMN: Células mononucleadas.

3D: Tres dimensiones.

2D: Dos dimensiones.

TGF: Factor de crecimiento transformante.

IGF: Factor de crecimiento insulínico.

HA: Hidroxiapatita.

TCP: Fosfato tricálcico.

SIS: Matriz derivada de la submucosa intestinal porcina.

BSM: Matriz derivada de la submucosa de la vejiga.

PGA: Ácido poliglicólico.

PLA: Ácido poliláctico.

PLGA: Ácido poliláctico co-glicólico.

rhBMP: Proteína morfogenética ósea recombinante.

EC: Ensayo clínico.

HUS: Hospital universitario de Salamanca.

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos.

WMA: Asambleas Generales Mundiales.

CEIC: Comité ético de investigación clínica.

CRD: Cuaderno de recogida de datos.

EVA: Escala visual analógica.

ODI: "Owestry disability index".

SF-36: "Short Form-36 Health Survey".

GMP: "Good Manufacturer Practice".

DDD: "Degenerative disk disease".

ASA: "American Society of Anesthesiologist".

OMS: Organización Mundial de la Salud.

IMPDP: "The Investigational Medicinal Product Dossier".

α-MEM: "Minimum essential médium eagle- alpha".

CEE: Comunidad Económica Europea.

EMEA: Agencia Europea del Medicamento.

FDA: Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos de EEUU.

TAC: Tomografía axial computerizada.

AAG: Acontecimiento adverso grave.

TLIF: "Transforaminal Lumbar Interbody Fusion"

PLF: "Posterior Lumbar Fusion"

PLIF: "Posterior Lumbar Interbody Fusion"

ELR: Elastina recombinante.

EICH: Enfermedad de injerto contra huésped.

ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular.

FVS: Fracción vascular estromal.

ATMP: Productos medicinales de terapia avanzada.

ÍNDICES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Enfermedad degenerativa lumbar.....	2
1.1.1. Epidemiología	2
1.1.2. Discopatía degenerativa Intervertebral.....	3
1.1.2.1. Etiología y Fisiopatología.....	4
1.1.2.2. Características clínicas.....	5
1.1.2.3. Diagnóstico por imagen.....	6
1.1.2.4. Tratamiento	8
1.2. Tratamiento quirúrgico: Fusión del segmento vertebral	9
1.2.1. Historia	9
1.2.2. Abordaje Posterolateral en fusión lumbar: “Gold Standard”	11
1.3. Técnicas de regeneración ósea.....	13
1.3.1. Técnicas clásicas: El uso de injerto óseo	13
1.3.1.1. Propiedades y características de los injertos óseos.....	14
1.3.1.2. Función de los injertos y sustitutos óseos.....	15
1.3.1.3. Tipos de injertos óseos.....	16
1.3.2. Ingeniería Tisular: Nuevas técnicas de regeneración ósea	19
1.3.2.1. Ingeniería Tisular Ortopédica	19
1.3.2.1.1. Concepto	19
1.3.2.1.2. Aplicaciones ortopédicas.....	20
1.3.2.1.3. Aplicaciones de la ingeniería tisular en fusión lumbar	20
1.3.2.2. Células madre en ingeniería tisular	21
1.3.2.2.1. Trabajos con células madre: Obtención	23
1.3.2.2.2. Tipos celulares de células madre	26
1.3.2.2.3. Células progenitoras mesenquimales (CSM)	27
1.3.2.3. Uso de Biomateriales	32
1.3.2.3.1. Propiedades ideales de los Biomateriales.....	33
1.3.2.3.2. Tipos de Biomateriales: Sustitutos óseos.....	33
1.3.2.3.3. Avances en el uso de los biomateriales	36
1.3.2.4. Factores de crecimiento	37
1.3.2.4.1. Proteínas morfogenéticas óseas (BMP) en cirugía del raquis	38
2. HIPÓTESIS.....	41

3. OBJETIVOS.....	41
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
4.1. Diseño del estudio.....	43
4.1.1. Consideraciones éticas.....	43
4.1.2. Consentimiento informado.....	44
4.1.3. Protección de datos.....	44
4.2. Fases del estudio.....	45
4.2.1. Fase Selección.....	45
4.2.1.1. Población estudiada y evaluación pre-tratamiento.....	46
- Criterios de inclusión y exclusión.....	46
- Criterios de retirada y abandono.....	48
- Interrupción del ensayo clínico.....	50
- Evaluación pretratamiento.....	50
4.2.1.2. Producción celular.....	51
4.2.1.2.1. Extracción de médula ósea.....	52
4.2.1.2.2. Obtención del lisado plaquetario.....	53
4.2.1.2.3. Transportador o carrier.....	54
4.2.1.2.4. Preparación del producto celular: Obtención del compuesto de células mesenquimales.....	55
4.2.2. Fase Tratamiento.....	58
4.2.2.1. Procedimiento quirúrgico.....	58
4.2.2.2. Tratamientos concomitantes.....	59
4.2.3. Fase seguimiento.....	60
4.2.3.1. Procedimientos realizados durante el seguimiento.....	61
- Variables analizadas en cada visita.....	62
- Acontecimientos adversos registrados en cada visita.....	62
5. RESULTADOS.....	66
5.1. Análisis estadístico.....	68
5.1.1. Métodos estadísticos.....	68
5.2. Resultado final.....	68
5.2.1. Resultados clínicos y funcionales.....	68
5.2.2. Resultados radiológicos.....	75
5.2.3. Análisis de eficacia y seguridad del estudio.....	77
5.2.3.1. Complicaciones y efectos adversos.....	79
5.2.4. Análisis de variables clínicas y radiológicas a los 10 años.....	81
6. DISCUSIÓN.....	83
6.1 Terapia celular en fusión espinal.....	83

6.2. Injerto óseo para regeneración tisular.....	84
6.3. Sustitutos en la regeneración ósea para fusión espinal	85
6.4. Terapia celular en la regeneración ósea.....	87
6.4.1. Modelo animal.....	91
6.4.2. Aplicación de terapia celular para fusión espinal en humanos	94
6.4.3. Derivados de las CSM: Alternativas terapéuticas.....	95
6.5. Comparación con el presente estudio.....	97
7. CONCLUSIONES	100
8. BIBLIOGRAFÍA.....	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Causas de lumbalgia.....	5
Tabla 2. Clasificación de Modic de los cambios de señal en la médula ósea.....	7
Tabla 3. Capacidades o propiedades de los injertos y sustitutos óseos.....	16
Tabla 4. Características de los pacientes.....	48
Tabla 5. Cronograma de la valoración en consulta.....	61
Tabla 6. Características de los pacientes en número y porcentaje.....	66
Tabla 7. Características del producto celular de CSM tras la expansión.....	67
Tabla 8. Puntuación EVA para dolor radicular y dolor lumbar.....	69
Tabla 9. Índice de discapacidad Owestry/ ODI.....	71
Tabla 10. Valores de ODI en la población a estudio.....	72
Tabla 11. Correlación entre el valor de ODI y el grado de discapacidad.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de clasificación de Pfirrmann.....	6
Figura 2. Esquema de las fases del estudio.....	45
Figura 3. Obtención y cultivo de CSM.....	56
Figura 4. Procedimiento de aplicación de las CSM en el lecho de fusión.....	59
Figura 5. Modelo de EVA.....	68
Figura 6. Evolución del dolor lumbar y radicular según la EVA.....	70
Figura 7. Diagrama de barras del cuestionario SF-36.....	73
Figura 8. Evolución de la Rx AP de la fusión espinal L5-S1 tras una intervención de artrodesis posterolateral.....	75
Figura 9. Rx AP de la fusión espinal L4-L5 tras una intervención de artrodesis posterolateral, Paciente 3.....	76
Figura 10. Sistema de recogida de los efectos adversos en los CRD.....	78
Figura 11. Imagen histológica del paciente 5 que muestra formación de tejido óseo.....	80

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Enfermedad degenerativa lumbar*

Los trastornos degenerativos de la columna lumbar son prevalentes, afectan a la calidad de vida y constituyen un problema sanitario relevante para la población general.

Esta patología produce síntomas incapacitantes en la columna y en los miembros inferiores que provocan pérdida de días de trabajo, discapacidad permanente y secuelas psicológicas. La evolución científica ha proporcionado a los cirujanos ortopédicos algoritmos para prescribir un tratamiento quirúrgico o no quirúrgico en patologías frecuentes como la hernia discal, la estenosis de canal vertebral y el dolor discógeno, responsables de la mayoría de los casos de dolor lumbar.

1.1.1. Epidemiología

La osteoartrosis es responsable del 50% de las enfermedades crónicas en la población envejecida y en los próximos años se espera que su incidencia sea mayor¹.

El proceso degenerativo del raquis es un problema de salud frecuente, que en muchas ocasiones evoluciona a la cronicidad con un difícil tratamiento, que genera en el paciente frustración y que puede llegar a afectar a sus actividades basales de la vida diaria y a su independencia.

Esta patología se manifiesta como dolor lumbar y se estima que entre el 70-85% de toda la población estadounidense sufren algún episodio de lumbalgia en algún momento de su vida, aunque solo el 1% precisa tratamiento a largo plazo. La incidencia anual del dolor lumbar en los adultos es del 15%, aunque la prevalencia puntual es del 30%.

Así mismo, la lumbalgia afecta con la misma frecuencia a ambos sexos y puede presentarse en todos los grupos de edad. No obstante es más frecuente en las personas de 35 a 50 años de edad y constituye la causa principal de discapacidad en menores de 50 años. Los cambios degenerativos en la columna vertebral son prevalentes en todos los grupos de edad y están presentes en más del 75% de las personas mayores de 60 años².

El 40% del dolor lumbar crónico está originado en el disco intervertebral, y se incrementa con la edad (3% en pacientes menores de 30 años y 80% en mayores de 40 años).

1.1.2. Discopatía degenerativa Intervertebral

La discopatía degenerativa lumbar es un proceso progresivo e irreversible que produce dolor lumbar y/o radicular, siendo una de las causas más frecuentes de incapacidad laboral transitoria en la sociedad actualmente.

El proceso de degeneración discal comienza habitualmente en la tercera década de la vida. Dicha degeneración discal se caracteriza por un descenso de la concentración de proteoglicanos que conlleva una pérdida de la hidratación, una disminución del número de células viables, una disminución de los enlaces cruzados de piridinolina y un aumento de los enlaces cruzados de pentosidina en el interior del disco intervertebral.

En la discopatía degenerativa, el tamaño del anillo fibroso exterior permanece constante, pero las capas fibrocartilaginosas internas del anillo se lesionan y expanden. Al avanzar la degeneración, la altura discal disminuye produciendo un pinzamiento de espacio discal, desgarros anulares, y en última instancia, anquilosis a través del segmento lumbar.

El dolor discógeno se refiere clásicamente a la lumbalgia en la línea media axial sin síntomas radiculares, atribuible a la patología discal degenerativa, aunque en algunos pacientes el dolor radicular irradiado puede estar presente.

Sin embargo, existe una gran controversia en el diagnóstico y el tratamiento de este trastorno.

1.1.2.1. Etiología y Fisiopatología

Las principales causas de lumbalgia se detallan en la tabla 1.

Las causas exactas de la degeneración discal no se conocen con precisión, existiendo varios factores contribuyentes posibles. Algunas comorbilidades como la Diabetes Mellitus, la insuficiencia vascular y el tabaquismo, pueden estar relacionadas con este proceso. Se cree también que la degeneración discal tiene un componente genético, pero no se conocen el gen o genes implicados ni los cambios fisiopatológicos que la justifiquen.

Por lo tanto, esta afección se considera una patología multifactorial, influenciada por una cierta predisposición genética³ y relacionada con diversos factores de riesgo como el soporte de cargas⁴, alteraciones autoinmunes⁵, nutricionales⁶, moleculares y celulares⁷, que llevan a la pérdida celular y a la deshidratación del disco y a alteraciones estructurales del mismo comprometiendo su biomecánica.

Los discos que habitualmente presentan los primeros cambios degenerativos son L4-L5 y L5-S1. La cascada degenerativa de *Kirkaldy-Willis*⁸ describe tres fases generales de degeneración discal después de una lesión por torsión:

- Fase I (fase disfuncional): Disfunción considerable causada por la lumbalgia aguda después de la lesión.
- Fase II (fase inestable): Periodo prolongado de inestabilidad relativa en el segmento vertebral concreto, que hace que el paciente sea propenso a crisis intermitentes de lumbalgia.
- Fase III (fase de estabilización): Se produce una estabilización segmentaria y se presentan con menos frecuencia episodios de dolor lumbar.

Al disminuir la altura del disco, cambian las características de carga de las articulaciones facetarias, deteriorándose la capacidad funcional de las cápsulas

articulares facetarias y produciéndose un movimiento anómalo que provoca degeneración e hipertrofia de la articulación facetaria y por consiguiente dolor en la zona posterior de la columna, el cual es denominado dolor facetario.

Tabla 1. Causas de lumbalgia

Vertebrales	Estructurales	Dolor discógeno, desgarros anulares Artropatía facetaria Distensión muscular, esguince Inestabilidad segmentaria Espondilolistesis Estenosis vertebral Fractura Infección (discitis, osteomielitis) Enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide, espondilitis anquilosante) Tumores
	Endocrinas	Osteoporosis Osteomalacia
	Hematológicas	Drepanocitosis
Extravertebrales	Viscerales	Litiasis renal, pielonefritis Litiasis biliar Úlcera duodenal Pancreatitis Aneurisma de aorta Neoplasia retroperitoneal Endometriosis
	Musculoesqueléticas	Artropatía sacroiliaca Coxalgia
	Otras	Fármacos Psicógenas Laborales

1.1.2.2. Características clínicas

El dolor discal o discógeno se describe clásicamente como un dolor profundo en la zona lumbar baja, de naturaleza mecánica. Los síntomas empeoran con la carga axial, mientras que el reposo y el decúbito supino pueden provocar alivio de los mismos. El dolor suele presentarse tanto en flexión como en extensión del tronco (siendo más frecuente y característico en flexión), y los pacientes tienen disminuidos la amplitud de movimiento en comparación con los pacientes asintomáticos. Se cree que debido a la inestabilidad en un segmento producida por la micromovilidad que causa la degeneración discal, se produce dolor axial y lumbalgia en estos pacientes, pudiéndose además asociar clínica radicular hacia miembros inferiores.

1.1.2.3. Diagnóstico por imagen

Los primeros estudios de imagen para evaluar el dolor discógeno son las radiografías simples anteroposterior (AP) y lateral de la columna lumbar. Estas imágenes pueden mostrar distintos signos de espondiloartrosis, como pinzamiento del espacio discal, esclerosis de los platillos, osteofitos marginales, inestabilidad y degeneración facetaria.

Las radiografías de la columna lumbar dinámicas, en flexión y extensión, pueden también demostrar signos de inestabilidad o movilidad adicional en un segmento lumbar, aunque el uso sistemático de estas proyecciones ha sido cuestionado por el balance riesgo-beneficio que existe entre la radiación adicional y la utilidad clínica⁹.

La resonancia magnética nuclear (RMN) ofrece una imagen más detallada de la patología del disco intervertebral y es muy sensible a los cambios degenerativos. La alteración discal interna, que no suele apreciarse en las radiografías simples, puede diagnosticarse en la RMN por una disminución de la intensidad de la señal en T2, que indica disminución del contenido del agua, y puede clasificarse según la clasificación de Pfirrmann¹⁰ detallada en la Figura 1.

Figura 1. Sistema de clasificación de Pfirrmann A, B, C, D, E.¹⁰



Con esta técnica de imagen también es posible ver desgarros anulares en forma de zonas de hiperseñal, que es otro signo de alteración discal interna, y cambios en el platillo vertebral asociados también a discopatía intervertebral. Estos cambios se han clasificado en tres tipos según el tiempo de evolución de la degeneración con la clasificación de Modic¹¹ como se muestra en la Tabla 2. De acuerdo a esta clasificación existen tres tipos de lesiones:

- Tipo I: fisuración temprana del platillo vertebral cartilaginoso y vascularización aguda en el interior del hueso subcondral.
- Tipo II: Degeneración grasa de la medula adyacente
- Tipo III: Forma avanzada de artrosis asociada a esclerosis del hueso subcondral con pérdida de hueso trabecular.

A pesar de que esta técnica de imagen es muy sensible a los cambios discógenos, es difícil determinar la repercusión clínica de estos signos^{12, 13}, ya que no existe una correlación entre los hallazgos radiológicos y las características e intensidad de la clínica presentada por los distintos tipos de pacientes.

Estudios epidemiológicos sobre la relación entre la espondiloartrosis lumbar y la lumbalgia, señalan numerosos factores de confusión, que influyen en los resultados, como el tabaquismo, pruebas psicométricas anómalas, trastornos de la personalidad, reclamaciones de compensación laboral, reclamaciones judiciales, satisfacción laboral y hábito corporal. Además, varios estudios han intentado correlacionar la presencia de cambios Modic con los síntomas clínicos, siendo los resultados controvertidos.

Un estudio reciente ha demostrado, que tanto los cambios Modic Tipo I, como los cambios observados en el segmento L5-S1 están relacionados, con más probabilidad, con síntomas de dolor significativos¹⁴. Estos resultados sugieren que los cambios de tipo I pueden representar una fase de alteración inicial o aguda de un trastorno doloroso y que más adelante se estabiliza al progresar la discopatía degenerativa.

Tabla 2. Clasificación de Modic de los cambios de señal en la médula ósea¹¹

Tipos	Cambios en el cuerpo vertebral
Tipo I	Hiposeñal en T1. Hiperseñal en T2
Tipo II	Hiperseñal en T1. Hiperseñal en T2
Tipo III	Hiposeñal en T1. Hiposeñal en T2

Por último, la discografía de provocación se ha utilizado clásicamente para confirmar el diagnóstico de dolor discógeno, sin embargo existe bastante controversia, relacionada con la evaluación de la discografía como técnica diagnóstica debido a su naturaleza dependiente del operador, a la heterogeneidad de los pacientes estudiados y a la variabilidad de síntomas clínicos contradictorios.

1.1.2.4. Tratamiento

Los tratamientos desarrollados para la patología discal degenerativa, son medidas paliativas que se basan en el método conservador (terapia física, analgésicos o modificadores de la conducta) y en el tratamiento quirúrgico (discectomía, descompresión de estructuras nerviosas, artroplastia, artrodesis vertebral, etc).

El tratamiento considerado “gold estándar” para tratar la patología degenerativa del disco, es la artrodesis vertebral cuyo objetivo es eliminar el movimiento del segmento vertebral afecto¹⁵ y más concretamente, la artrodesis posterolateral con el uso de injerto óseo autólogo.

El tratamiento de primera línea de la lumbalgia discógena sigue siendo un conjunto de medidas no quirúrgicas, como uso de antiinflamatorios, programas de acondicionamiento físico, pérdida de peso y rehabilitación funcional. En la mayoría de los pacientes dichas medidas suelen ser efectivas en cuanto a la mejora de los síntomas. La estimulación nerviosa eléctrica transcutánea, los protocolos de estimulación muscular, la tracción y el tratamiento quiropráctico, no han demostrado eficacia al largo plazo en el tratamiento de esta patología¹⁶.

El tratamiento quirúrgico se considera una opción de último recurso en el paciente que presenta síntomas resistentes al tratamiento conservador durante un periodo de 6 meses. Sin embargo, existen distintas opiniones entre los expertos respecto a las indicaciones quirúrgicas concretas en el tratamiento de la discopatía. El tratamiento quirúrgico clásico, como ya se ha apuntado, es la fusión lumbar instrumentada o artrodesis vertebral.

1.2. Tratamiento quirúrgico: Fusión del segmento vertebral

La artrodesis o fusión vertebral es la técnica quirúrgica que pretende eliminar la movilidad intersegmentaria vertebral para contribuir a disminuir el dolor generado por los micromovimientos en los pacientes que presentan dolor mecánico producido por patología degenerativa de las articulaciones intervertebrales o del disco intervertebral.

1.2.1. Historia

El inicio del empleo de técnicas de fusión vertebral similares a las actuales comenzó a principios del siglo XX y se atribuye habitualmente a *Fred Albee*¹⁷ y *Rusell Hibbs*¹⁸, ambos en Nueva York, cuyos resultados fueron publicados en 1911. Los procedimientos quirúrgicos que realizaban se basaban en el empleo de injertos óseos autólogos tomados de la tibia y otros huesos, para lograr la fusión vertebral en el tratamiento de la deformidad progresiva en casos de tuberculosis espinal.

La técnica de *Albee*¹⁷ consistía en realizar unas hendiduras sagitales en las apófisis espinosas y aplicar un injerto cortical de tibia longitudinalmente en ellas. *Hibbs*¹⁸ por su parte, realizaba una decorticación de las láminas con el objetivo de preparar un lecho de fusión y aplicaba sobre dicho lecho las apófisis espinosas fracturadas en su base, formando un puente entre dos láminas consecutivas decorticadas. Esta técnica presentaba altas tasas de pseudoartrosis en adultos. Años más tarde *Hibbs*, incorporó a su método la adición de injerto óseo obtenido a distancia.

En 1920, *Willis Campbell*⁹, describió el método de fusión trisacra (del sacro con la quinta vértebra lumbar y con ambos iliacos) para obtener la fusión sacroiliaca en el tratamiento de la artritis tuberculosa. Se introdujo por primera vez la utilización de injerto óseo sobre las apófisis transversas vertebrales, obtenido de tiras de la cresa iliaca.

En los años 30, el uso sistemático de injerto de cresta iliaca para la fusión fue introducido por *Ghormley*²⁰, convirtiéndose así en el procedimiento habitual. *Mercer*²¹ puso en práctica su utilización para llevar a cabo la fusión intersomática anterior. Posteriormente, *Cleveland y Bosworth*²², introdujeron la técnica de injerto autólogo sobre las apófisis transversas de un solo lado con el objetivo de reparar la pseudoartrosis vertebral y poco a poco, más tarde, se extendió dicha técnica a ambos lados de la línea media vertebral.

En 1953, *Melvin Watkins*²³ describió el abordaje de las apófisis transversas por un abordaje lateral a la línea media, a través de la musculatura erectora del raquis.

Hasta la década de 1930, los cirujanos ortopédicos estuvieron buscando diversos materiales para llevar a cabo la fijación ósea. En 1939, *Venable y Stuck*²⁴ publicaron su trabajo sobre el uso del vitalio (una aleación de cromo y cobalto) para la fijación interna del raquis. Previamente *Wilson*²⁵ había desarrollado el uso de una placa atornillada a las apófisis espinosas como método de fijación. En 1944, *King*²⁶, publicó la utilización de tornillos facetarios como método de fijación vertebral, observando que esta técnica incrementaba las tasas de fusión.

Pero sin duda, el gran avance en la fijación vertebral se debió a *Harrington*²⁷ en 1974, para el tratamiento de las deformidades vertebrales, su método, desarrollado en la década de los 70, se basó en el uso de tallos con alambres sublaminares. Los cirujanos franceses *Judet*²⁸, *Roy-Camille*²⁹ y *Louis*³⁰ entre los años 1964 y 1972 desarrollaron la fijación pedicular con tornillos y placas. A partir de entonces, se han multiplicado los diseños de implantes que utilizan tornillos pediculares.

1.2.2. Abordaje Posterolateral en fusión lumbar: “Gold Standard”

El abordaje más utilizado para la fusión vertebral ha sido el abordaje posterior. Este abordaje presenta una serie de ventajas que justifican que sea la vía de acceso más utilizada y practicada por los cirujanos de raquis, como la simplicidad de su técnica, el que no se asocie a riesgos significativos en relación con vísceras abdominales o grandes vasos y el que permita la descompresión simultánea de las estructuras nerviosas. Además, es fácilmente ampliable y permite el abordaje simultáneo de todo el raquis, desde el occipital hasta el sacro, así como el uso de métodos de fijación interna muy variados y versátiles.

Para llevarla a cabo, se realiza una incisión longitudinal en la línea media, sobre las apófisis espinosas. Después de disecar el tejido celular subcutáneo y la fascia, se lleva a cabo la disección subperióstica de la musculatura erectora del raquis, accediendo al arco vertebral posterior y las apófisis articulares. La disección se amplía lateralmente para colocar el injerto entre las apófisis transversas exponiendo éstas tras curetar su superficie.

La descripción de la técnica de artrodesis posterolateral se caracteriza por el uso de autoinjerto de hueso tricortical de cresta iliaca depositado en el espacio intertransverso, que por sus propiedades confiere estabilidad mecánica, debido al hueso cortical, y propiedades osteoconductoras y osteonductoras debido al hueso esponjoso. Pero esta práctica presenta una serie de complicaciones o inconvenientes³¹ como son la morbilidad en la zona donante (dolor agudo o crónico y repercusiones funcionales), la falta de disponibilidad en el momento de la cirugía, las altas tasas de pseudoartrosis y las posibles complicaciones de la herida quirúrgica (infección, hematoma, seroma, dehiscencia, etc).

Los resultados de la artrodesis lumbar en la discopatía degenerativa varían en función de la fuente, los criterios de selección de los pacientes, los criterios de valoración empleados y las enfermedades concurrentes. Sin embargo, los estudios publicados en la última década han aumentado el reconocimiento de la importancia de la buena selección del paciente y de las expectativas del mismo ante una intervención quirúrgica.

Una revisión sistemática reciente³² recopiló la bibliografía sobre resultados de la artrodesis en los distintos diagnósticos causantes de dolor lumbar. Los autores de dichos estudios, llegaron a la conclusión de que los mejores resultados corresponden a los pacientes con un diagnóstico de espondilolistesis, aunque los pacientes con un diagnóstico de discopatía degenerativa pueden conseguir también buenos resultados clínicos³².

1.3. Técnicas de regeneración ósea

La reparación de un tejido biológico es la restauración de dicho tejido sin que éste conserve su arquitectura original ni tampoco su función, debido a esto, sus propiedades mecánicas y físicas son inferiores, siendo el resultado final la cicatrización, proceso que ocurre de forma espontánea. La regeneración, en cambio, es el proceso de restauración de dicho tejido y por lo tanto, el tejido neoformado posee propiedades indistinguibles del original.

En la actualidad, se está produciendo un incremento considerable en la utilización de tejidos y células humanas con el objetivo de conseguir la regeneración tisular en la práctica clínica habitual, además de en programas de investigación clínica. Estos procedimientos constituyen lo que denominamos ingeniería tisular.

Existen varios factores en la capacidad de regeneración del tejido óseo, entre los que destaca la edad, ya que los individuos más jóvenes poseen células madre mesenquimales en Médula ósea en una proporción aproximada de 1:10.000, mientras que los ancianos poseen una proporción menor (1:100.000)³³.

1.3.1. Técnicas clásicas: El uso de injerto óseo

En EEUU se realizan anualmente más de 500.000 procedimientos con injerto óseo y alrededor de 2.2 millones en todo el mundo con el fin de reparar defectos óseos en neurocirugía, odontología y ortopedia³⁴.

Las técnicas de regeneración ósea son importantes en procedimientos quirúrgicos traumatológicos para el tratamiento de diversas patologías, y concretamente, en la patología del raquis se usan en procedimientos como la fusión espinal o para el tratamiento de tumores óseos y deformidades congénitas.

El hueso esponjoso o trabecular está constituido por una red tridimensional de trabéculas orientadas según las cargas soportadas. Tiene un metabolismo óseo ocho veces superior al del hueso cortical reaccionando más rápido que éste a los cambios de cargas recibidas a pesar de que el hueso cortical presente mejores propiedades mecánicas y de soporte.

El hueso esponjoso integra las mejores propiedades en cuanto a favorecer la formación ósea constituyendo un injerto seguro y fácil de obtener, pero presenta ciertos inconvenientes como la morbilidad del sitio donante y la disponibilidad limitada de su stock óseo. Se usa para rellenar defectos óseos y para favorecer el crecimiento y formación ósea.

Para reunir las características y propiedades del hueso esponjoso (rellenando rápidamente un defecto óseo o generando tejido óseo) y las del hueso cortical (actuando como soporte estructural) ha surgido para su uso como injerto el hueso corticoesponjoso.

Actualmente, el patrón oro en la terapia de la fusión espinal es la utilización de **hueso corticoesponjoso autólogo** de cresta iliaca. La obtención de este tipo de injerto presenta los inconvenientes ya citados previamente en relación a la obtención de hueso esponjoso como injerto; y debido a estas limitaciones, se han propiciado el desarrollo de nuevas técnicas de regeneración ósea a través de injerto homólogo, sustitutos naturales o sintéticos, moléculas inductoras (proteínas morfogenéticas óseas) y/o células con capacidad osteogénica como las células mesenquimales, desarrollándose así un nuevo enfoque: la ingeniería tisular ortopédica³⁵.

1.3.1.1. Propiedades y características de los injertos óseos:

Un buen injerto debe favorecer la adherencia, crecimiento y diferenciación celular, la angiogénesis³⁶ y la osteointegración, siendo sustituido progresivamente por hueso del huésped³⁷. De esta manera favorece la formación de un hueso mecánicamente competente.

Para ello, el injerto utilizado debe poseer las siguientes características ideales^{35, 38, 39}:

- a. Alto potencial osteoconductor y angiogénico
- b. Seguridad biológica
- c. Fácil acceso y obtención
- d. Escasa morbilidad en el sitio donante
- e. Diferentes tamaños
- f. Durabilidad
- g. Bajo coste, etc.

1.3.1.2 Función de los injertos y sustitutos óseos

La función de los injertos óseos y sustitutos es actuar como vehículo conductor de la formación de nuevo hueso a partir de células del huésped. También es necesario que tengan una función oteloinductora liberando sustancias inductoras y factores de crecimiento, capaces de atraer a células precursoras al lecho donde se formará el nuevo tejido óseo. Para obtener una función osteogénica (formadora de hueso) se siembra el injerto con células (osteoblastos o células madre mesenquimales) que se encargan de la producción de hueso nuevo.

Todos los sustitutos óseos incluyendo el injerto óseo y los biomateriales, deben poseer las siguientes capacidades que se detallan en la Tabla 3: ^{40, 41}

- a) Osteogénesis: es la capacidad para producir nuevo hueso.
- b) Osteoinducción: es la estimulación y activación de las células progenitoras por parte de mediadores que se incorporan en el injerto óseo o sustito.
- c) Osteoconducción: es la capacidad de actuar como andamiaje o soporte para favorecer el crecimiento de una red vascular y la invasión de células osteoprogenitoras.
- d) Osteointegración: capacidad para quedar incluido formando parte del hueso nativo o huésped.

Tabla 3. Capacidades o propiedades de los injertos y sustitutos óseos

	OSTEOGÉNESIS	OSTEOINDUCCIÓN	OSTEOCONDUCCIÓN
CAPACIDAD	Formación ósea	Transformación de células progenitoras en osteoblastos	Soporte mecánico para el crecimiento y proliferación celular
INJERTOS/ SUSTITUTOS	Hueso esponjoso Células viables (osteocitos, osteoblastos)	Citocinas Factores de crecimiento	Matriz extracelular
EJEMPLOS	Aspirado de médula ósea	Matriz ósea desmineralizada, BMP	Hidroxiapatita Fosfato tricálcico Cristales bioactivos

1.3.1.3. Tipos de injertos óseos

a) Autoinjerto

El **hueso autólogo** se ha establecido como el sustituto más adecuado (“gold estándar”) para la regeneración ósea en caso de defectos óseos o técnicas que requieran formación ósea, ya que posee una propiedades óptimas de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción⁴¹ propiciadas por su componente de hueso esponjoso, que también le confiere capacidad para revascularizarse rápidamente e integrarse fácilmente en el huésped.

En la cirugía del raquis, el sitio donante más utilizado es la cresta iliaca⁴¹ del paciente, ya que supone una zona de fácil extracción de hueso esponjoso en grandes cantidades y además posee las ventajas del hueso cortical en relación a su función de soporte mecánico. La obtención de este injerto autólogo no está exenta de complicaciones, como el alargamiento del tiempo quirúrgico o la disponibilidad limitada de hueso, además de poder producir morbilidad en el sitio donante⁴²⁻⁴⁴. Algunas de las morbilidades causadas se detallan a continuación:

- Dolor crónico en el sitio donante
- Pérdida sanguínea excesiva
- Hematoma

- Infección
- Herniaciones
- Lesión ureteral
- Lesión arterial o nerviosa
- Defectos estéticos

El uso de sustitutos óseos se ha popularizado para minimizar o evitar todas estas complicaciones.

b) Aloinjerto

Como alternativa al hueso autólogo o autoinjerto, ha surgido la utilización del hueso homólogo de donantes (hueso heterólogo o aloinjerto). En este tipo de injerto, las células son destruidas durante el procesado y almacenamiento en los bancos de hueso, reduciéndose así el riesgo de transmisión de enfermedades y reacciones inmunológicas pero tiene mayores limitaciones en cuanto a las características esenciales ya que no posee las propiedades osteogénicas propias del hueso autólogo, y sólo posee propiedades osteoconductoras y osteoinductoras.

Por lo tanto, este tipo de injerto es habitualmente la segunda opción utilizada para las cirugías de regeneración ósea. Presenta una mayor disponibilidad y permite su utilización con varias formas de presentación en injertos preformados o customizados como chips, tiras, etc.

Las formas de presentación del aloinjerto, de las cuales depende su estabilidad mecánica y sus propiedades osteoconductoras, son las siguientes:

- Fresco: Poco usado por el riesgo de generar respuestas inmunes y transmitir enfermedades infecciosas como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el de la hepatitis C (VHC), bacteriemias, tumores o toxemias⁴⁵.
- Congelado: Conservado durante un año a -20°C y posteriormente 5 años a -70°C. Tiene menos potencial de antigenicidad pero más poder de osteoinducción porque conserva los factores de crecimiento.

- Congelado en seco o liofilizado: Se realiza un doble lavado con una solución antibiótica, luego se esteriliza con óxido de etileno o radiación gamma. Posteriormente se congela a -70°C y se deshidrata hasta el 5%. Este injerto es el menos inmunogénico por lo que disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, aunque también es el menos osteoinductor y el que presenta las peores propiedades mecánicas^{46, 47}.

El aloinjerto se somete a una serie de procesos para evitar el riesgo de transmitir enfermedades (disminuye su inmunogenicidad), lo que puede debilitar sus propiedades biológicas y sus propiedades mecánicas. La probabilidad de contagio de VIH se estima en 1 caso por cada 1.6 millones, comparado con 1 por cada 450.000 en la transfusión de derivados hematológicos⁴⁸⁻⁵⁰.

Hay datos polémicos sobre la eficacia de los aloinjertos empleados solos, ya que algunos estudios⁵¹ muestran bajas tasas de fusión debido a que poseen propiedades osteoconductoras y osteoinductoras medias, pero otros autores han demostrado resultados similares a los de los autoinjertos, con menos efectos adversos⁵².

En muchas ocasiones para solventar estos inconvenientes, se suelen combinar ambos tipos de hueso (autólogo y heterólogo) y así mejorar la capacidad de formación ósea.

1.3.2. Ingeniería Tisular: Nuevas técnicas de regeneración ósea

En relación a las limitaciones del uso de injertos autólogos y heterólogos en el tratamiento de patologías traumatológicas u ortopédicas, ha sido necesario desarrollar nuevas técnicas de regeneración ósea basadas en sustitutos naturales o sintéticos, moléculas inductoras y células con capacidad osteogénica. Por ello, la terapia celular está creciendo en interés en los últimos años, debido a la capacidad, al menos potencial, que presentan las células madre mesenquimales (CSM) para diferenciarse en diversas líneas celulares. Uno de las capacidades que despierta gran interés es la potencialidad de las CSM para producir o regenerar tejido óseo.

1.3.2.1. Ingeniería Tisular Ortopédica

1.3.2.1.1. Concepto

El objetivo de la ingeniería tisular ortopédica es favorecer o potenciar la diferenciación de las células precursoras (células madre) hacia una línea celular concreta, dentro de un soporte tridimensional. En el caso del tejido óseo, la finalidad es obtener tejido óseo in vitro aplicable a la práctica clínica⁵³, aportando un injerto que cumple las propiedades biomecánicas del hueso normal.

Para lograr este fin, se utilizan diferentes técnicas encaminadas hacia la regeneración de tejido óseo dinámico con sus diferentes tipos celulares, matriz extracelular y fracción mineral⁵⁴.

En primer lugar, se estudia la respuesta celular ante los biomateriales utilizados en medios de cultivo in vitro. Posteriormente se comprueba si existe regeneración satisfactoria en modelos in vivo, y el último paso se procede al estudio sobre humanos^{36, 55}.

1.3.2.1.2. Aplicaciones ortopédicas

El tratamiento de patologías óseas traumáticas (como la pseudoartrosis, retardos de consolidación, etc.) u ortopédicas, suponen actualmente un reto importante para los profesionales sanitarios y más concretamente para los cirujanos ortopédicos y traumatológicos.

Para ello, se pretende lograr un tejido óseo con integridad estructural, con un balance adecuado entre formación y reabsorción ósea y que sea capaz de permanecer en el lecho celular.

1.3.2.1.3. Aplicaciones de la ingeniería tisular en fusión lumbar

El uso de auto o aloinjerto en el tratamiento de patología vertebral, ha demostrado mejorar la capacidad de producir fusión espinal en mayor o menos medida.

El autoinjerto de cresta iliaca ha demostrado tasas de fusión superiores al 90% en algunos casos⁵⁶, pudiendo ser una material ideal para la fusión de la columna vertebral debido a su capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora.

Los injertos óseos recuperados del sitio quirúrgico también pueden ser una buena opción y han demostrado tasas de fusión similares a las de los injertos de cresta iliaca, pero su principal limitación es la disponibilidad de cantidad suficiente.

La ingeniería tisular pretende combinar los avances en los biomateriales y de la biología celular, para conseguir reunir la mayoría de las características ideales en un injerto^{57, 58} (potencial osteoinductor y angiogénico, fácil obtención, escasa morbilidad en zona donante, seguridad, durabilidad y bajo coste) y poder aplicarlo a la práctica clínica habitual y en este caso, a la patología de la columna vertebral lumbar mediante la técnica quirúrgica de fusión lumbar.

1.3.2.2. Células madre en ingeniería tisular

Las células madre son células capaces de diferenciarse en diferentes estirpes celulares, cuyo objetivo es favorecer la regeneración tisular. Son obtenidas de diferentes fuentes como la médula ósea⁵⁹, la sangre periférica⁶⁰, el tejido adiposo⁶¹ y la sangre de cordón umbilical⁶².

Las células madre poseen tres características fundamentales⁶³:

1. Capacidad de proliferación a largo plazo
2. Capacidad de diferenciación hacia distintos tipos celulares (hacia una o varias células maduras con función especializada)
3. Capacidad de autorrenovación o de formar durante su división al menos una copia idéntica de la célula inicial

Estas células juegan un papel importante en la organogénesis durante el crecimiento embrionario y en la regeneración tisular posteriormente⁶⁴.

Varios ensayos clínicos han demostrado que la combinación de cultivos de células madre progenitoras con polímeros biodegradables⁶⁵ o cerámicas⁶⁶ y factores de crecimiento, es eficaz para tratar de obtener propiedades de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción en un injerto. Las células pueden secretar proteínas y moléculas que pueden influir sobre el microambiente del injerto para inducir la adhesión, proliferación y diferenciación celular además de producir matriz ósea⁶⁷.

- Antecedentes:

Desde los años 60, se han llevado a cabo experimentos con el objetivo de producir distintos tipos de células y tejidos. *Till* y *MCulloch*⁶⁸, desarrollaron estudios basados en el transplante de células mononucleadas de médula ósea en ratones letalmente irradiados, con ello, demostraron por primera vez la existencia en la MO de células con esta capacidad de generar tejidos, las células madre hematopoyéticas⁶⁸.

Desde entonces, existe un interés creciente en el aislamiento y expansión de estos tipos celulares por su potencial empleo como herramienta terapéutica en distintos programas de terapia celular⁶⁹.

- Clasificación de las células madre:

Según la capacidad de diferenciación, las células madre se clasifican en los siguientes tipos⁶⁴:

- a. Células totipotenciales: Pueden producir células de todos los tejidos embrionarios y la placenta. Ejemplo: El cigoto.
- b. Células pluripotenciales: Pueden formar células de distintos tejidos embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo). Ejemplo: Células madre embrionarias (ESC).
- c. Células multipotenciales: Sólo se diferencian hacia células de una única línea embrionaria o tejido concreto. Ejemplo: células mesenquimales (CSM) y la célula madre hematopoyética (CPH)

Las células madre adultas se diferencian de las célula embrionarias (ESC) en que no produce neoplasias (teratomas) como las anteriores, y se obtienen en cantidades adecuadas para la terapia regenerativa autóloga o alogénica, sin embargo, presentan una capacidad de diferenciación y proliferación limitada⁷⁰.

- Localización de las células madre

Las células madre se localizan en un microambiente denominado “nicho”, que participa en el comportamiento de estas células y en la homeostasis de diversos tejidos. La hematopoyesis durante la vida fetal y la diferenciación hacia las células sanguíneas en la vida adulta depende de la existencia de ese microambiente que aporta las señales necesarias a través de factores solubles e interacciones celulares. Este microambiente donde ocurre dicho proceso se denomina nicho hematopoyético.

En la medula ósea (MO), el nicho hematopoyético contiene diferentes células de línea osteoblástica⁷¹, en diferentes fases de desarrollo (preosteoblastos,

osteoblastos y osteocitos), fibras de colágeno y minerales como el calcio y el fosfato⁷². Este nicho también contiene células endoteliales, adipocitos y macrófagos.

Existen dos tipos de nichos en la MO que intervienen en la regulación de las células madre hematopoyéticas: nicho osteoblástico y nicho vascular^{73, 74}. La células más diferenciadas se localizan en el nicho vascular, donde existe mayor cantidad de oxígeno y las más indiferenciadas se encuentran cercanas al endostio en contacto con los osteoblastos (nicho osteoblástico) donde existe menor presencia de oxígeno. Los osteoblastos desempeñan un papel crucial en la hematopoyesis y en la formación y resorción de tejido óseo y producen citocinas regulando a su vez la función de las células madre.

Además, existen otros compartimentos o nichos que intervienen también en el desarrollo hematopoyético: el estroma medular que contiene las células reticulares que proporcionan el soporte físico del nicho hematopoyético⁷⁵, los fibroblastos que constituyen una matriz de apoyo induciendo la hematopoyesis pero sin mantener la proliferación de las células madre hematopoyéticas, las células endoteliales que por su capacidad endocítica constituyen una barrera de entrada y salida de agentes químicos y partículas del espacio hematopoyético⁷⁶ y los macrófagos que están implicados en la diferenciación granulopoyética y en la maduración de la línea eritroide produciendo factores reguladores. Por otro lado, el nicho de adipocitos constituye el espacio no hematopoyético dentro de los huesos largos⁷⁷ y se usan como marcador de actividad y productividad hematopoyética en un cultivo^{78, 79}.

1.3.2.2.1. Trabajos con células madre: Obtención

- Cultivos in vitro

a) Cultivos estáticos

La capacidad de las Células Madre Mesenquimales para producir tejidos similares al hueso, fue ensayada en condiciones estáticas in vitro inicialmente^{80, 81}. Gracias a estos estudios se ha revelado, que los sistemas de andamiaje en 3D son necesarios para favorecer la comunicación intercelular y

estimular la osteogénesis. La desventaja de estos tipo de cultivos estáticos es que se produce una menor difusión de nutrientes y oxígeno.

b) Cultivos dinámicos

Se han desarrollado equipos de cultivo dinámicos usando biorreactores. En ellos, se pueden controlar las condiciones de distintos procesos biológicos y bioquímicos como por ejemplo la temperatura, el pH, la presión, el aporte de nutrientes y la eliminación de detritus⁸².

La distribución de las células tras la adición de éstas a un injerto estructural en condiciones estáticas se realiza en la periferia⁸³, para evitar este fenómeno y lograr una proliferación homogénea y un crecimiento tisular en sistemas de andamiaje de gran tamaño, se han introducido estos medios de cultivo dinámicos. Además de lograrse distribuciones celulares más homogéneas, se ha observado que la formación ósea es mayor en los biorreactores⁸⁴⁻⁹⁰ y que la aplicación de cargas mecánicas en ellos favorece la diferenciación celular y la expresión de fosfatasa alcalina, colágeno tipo I y marcadores osteoblásticos.

- Modelos in vivo y ensayos clínicos

Para la ingeniería tisular es importante predecir la reproductibilidad in vivo de los resultados obtenidos in vitro. Se debe evaluar la capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora del propio injerto implantado en un lugar donde recibirá señales sistémicas y vascularización procedente de tejidos vecinos, por ejemplo del tejido celular subcutáneo.

a) Modelos murinos

Se han utilizado modelos animales de roedores inmunodeprimidos⁹¹⁻⁹⁴ para evaluar los injertos compuestos con células madre humanas, comprobándose que estas células tienen capacidad osteogénica interespecie y observando diferencias en la formación ósea de distintas especies⁹⁵. En estos modelos, se determinó que el número de células madre implantadas se correlaciona con el potencial osteoformador del injerto⁹⁶.

La principal ventaja de utilizar ratones como modelo animal es el pequeño tamaño del injerto necesario para el estudio, y que se pueden usar células madre humanas a diferencia de animales de mayor tamaño en los que es necesario utilizar células autólogas de la misma especie animal.

b) Ensayos en humanos

Los ensayos en humanos en su mayoría se limitan a pequeños ensayos en fase I y II^{97, 98} en los que se usan injertos obtenidos por ingeniería genética, en su mayoría compuestos por cerámicas bioabsorbibles combinados con células madre obtenidas de médula ósea. Los resultados confirman la factibilidad y seguridad del procedimiento y la capacidad de integración de los injertos. En los ensayos clínicos aleatorizados en fase III se obtendrá más información sobre dichos procedimientos.

La **vascularización** del injerto después del implante es de vital importancia para la supervivencia, integración y funcionalidad del mismo⁹⁹. Para ello, se puede llevar a cabo una pre-vascularización de la zona de implantación:

- In vivo: Los injertos óseos deben ser implantados en zonas con un rico aporte vascular (tejido celular subcutáneo, músculo, etc.), pero la red vascular formada presenta un patrón desorganizado y puede lesionarse al extraer el injerto para implantarlo en la superficie de interés. Para evitar esto también se han realizado vías alternativas como por ejemplo utilizar un vaso sanguíneo (arteria o vena) para la pre-vascularización¹⁰⁰.

También se puede acelerar la vascularización del injerto implantado mediante la liberación de factores angiogénicos (VEGF, FGF, PDGF)¹⁰¹. Estos factores son combinados con factores osteoinductores (BMP4) y con células estromales de médula ósea para promover la osteogénesis en lugares ectópicos e incrementar la cantidad de hueso neoformado, comparando con cualquiera de los factores aislados o en combinación de dos de ellos¹⁰².

- In vitro: Consiste en el co-cultivo de dos tipos celulares (células angiogénicas y osteogénicas). Como fuente de células angiogénicas se utilizan células endoteliales adultas o células madre mesenquimales¹⁰³⁻¹⁰⁵ que generan

una trama vascular dentro del injerto. La combinación de ambas células alarga la vida de las células endoteliales¹⁰⁶ y acelera la expresión de un fenotipo osteogénico en las células osteoprogenitoras^{107, 108}; pero aún hacen falta más estudios para asegurar esta afirmación.

1.3.2.2.2. Tipos celulares de células madre

En la Médula Ósea podemos encontrar distintos tipos celulares:

- Las MAPC (“Multipotent Adult Progenitor Cells”) constituyen un grupo de células versátiles, descritas por la *Dra. Verfaillie y col*^{63, 109-112}, que poseen capacidad de diferenciación in vitro hacia tipos celulares derivados de las tres líneas embrionarias.
- El hemangioblasto posee capacidad en el periodo embrionario y en el adulto, de diferenciación hacia la línea hematopoyética y la endotelial¹¹³⁻¹¹⁶.
- Las células MIAMI (“human marrow isolated adult multilineage inducible cells”) y las células VSEL (“very small embryonic-like stem cells”).
- Las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) y las células stem mesenquimales (CSM). Estas células son células madre con una capacidad de diferenciación más restringida.

Las CPH son las encargadas de la regeneración del tejido hematopoyético, y pueden diferenciarse hacia cualquier línea hematopoyética¹¹⁷⁻¹²¹. La forma más habitual de reconocer esta célula es mediante la caracterización de la citometría de flujo, y el marcador CD34 es el más usado para identificarla¹²²⁻¹²⁴.

1.3.2.2.3. Células progenitoras mesenquimales (CSM)

Las células madre mesenquimales son las precursoras de la mayoría de las células que forman el nicho hematopoyético. Además de encontrarse en la médula ósea, están presentes en otros órganos y tejidos como el tejido adiposo, tejido muscular, sangre del cordón umbilical y órganos como la placenta, el hígado, el pulmón, etc.

Las CSM fueron estudiadas por primera vez por *Friedenstein*¹²⁰ y col. En sus estudios las denominaron inicialmente CFU-F (Unidad formadora de colonias fibroblásticas)¹²⁵. Estas células presentan propiedades únicas aplicables a la regeneración de tejidos¹²⁶, y su interés ha ido creciendo debido a su actividad inmunorreguladora⁷⁷ y a su multipotencialidad, siendo capaces de diferenciarse hacia distintas estirpes celulares y teniendo un papel importante en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH).

En los estudios iniciales¹¹⁷⁻¹²¹ se observó que estas células tenían capacidad para formar colonias de aspecto fibroblástico in vitro presentando morfología fusiforme¹²⁰, además de cuantificar su presencia entre las células mononucleadas (CMN) de la MO. También se demostró su capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares y de generar el microambiente hematopoyético¹²⁷⁻¹³¹.

- Características de las CSM

Las CSM comparten características inmunofenotípicas con células endoteliales, epiteliales y musculares¹³²⁻¹⁴⁰. Carecen de marcadores específicos que sí tienen otros tipos celulares presentes en MO o en sangre periférica como el CD19 presente en los linfocitos B o el CD14 presente en los monocitos. Debido a que no se conoce ningún marcador específico que las defina se han propuesto unos criterios para definir las:

- Criterios mínimos para definir a las CSM basados en características fenotípicas y funcionales según el *Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular*¹⁴¹:

a) Deben mostrar adherencia a plásticos cuando son cultivadas in vitro en condiciones estándar.

b) Han de ser negativas para marcadores hematopoyéticos: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA tipo II, y deben ser positivas, es decir, expresar los antígenos de superficie CD105, CD73 y CD90.

c) Deben demostrar, en condiciones estándar in vitro, capacidad de diferenciación multilineal hacia osteocitos, adipocitos y condrocitos.

Estas células además, presentan otra característica interesante que es la capacidad de secretar citocinas en reposo y tras estimulación. Las citocinas incluyen tanto factores de crecimiento hematopoyético como no hematopoyético que intervienen en el desarrollo de las células mesenquimales por mecanismos autocrinos. Además las CSM presentan receptores para citocinas y factores de crecimiento, lo que indica que las CSM están implicadas activamente en el mantenimiento del microambiente celular¹⁴².

El soporte estructural y funcional en el nicho medular lo forman las células estromales y la matriz extracelular. Dicho nicho está configurado como un sistema tridimensional donde se regula la proliferación, diferenciación y migración celular a través de interacciones célula-célula o célula-sustrato¹⁴³.

Por lo tanto, el empleo de sistemas de cultivo 3D puede inducir un mayor contacto entre las células madre y las estromales, favoreciendo así un mayor crecimiento y capacidad de diferenciación celular en comparación con sistemas 2D^{41, 144, 145}.

- Obtención de CSM

Las CSM pueden aislarse de múltiples especies, las más conocidas son humanos, ratón y rata^{50, 146}, aunque pueden aislarse de otras especies como ovejas, perros, vacas, cerdos y caballos, lo que aporta una mayor oportunidad para comprobar sus efectos terapéuticos en los mamíferos¹⁴⁷.

Como ya se ha comentado, en cuanto a localizaciones, la fuente mejor estudiada y la de más fácil accesibilidad es la médula ósea humana, estando presentes las CSM en un 0,01-0,0001% de entre todas las células que constituyen la MO. También, se han conseguido aislar CSM de sangre periférica movilizada¹⁴⁸ (constituyendo este método en la actualidad la técnica de obtención de progenitores hematopoyéticos más usada); de muestras fetales obtenidas durante el primer trimestre del embarazo (de sangre, hígado, MO, pulmón fetal, de las vellosidades coriogénicas de la placenta y del líquido amniótico)¹⁴⁹⁻¹⁵², de sangre procedente del cordón umbilical y de sangre de mujeres sanas durante el embarazo¹⁵³⁻¹⁵⁵.

Otros estudios han propuesto como fuente de CSM, la grasa, el tejido del cuero cabelludo, los folículos pilosos y los ligamentos periodontales.

- Diferenciación de CSM

Las CSM se han convertido en objetivo de un gran interés científico debido a su capacidad para diferenciarse hacia múltiples líneas celulares, entre ellas en células de estirpe mesodérmica, incluyendo osteoblastos, fibroblastos, condroblastos y adipocitos¹⁵⁶, además son capaces de expandirse in vitro sin comprometer su estabilidad genética¹⁵⁷ y poseen una fuerte actividad inmunomoduladora in vivo e in vitro^{158, 159}.

Su actividad inmunomoduladora se debe a que son capaces de escapar a la respuesta inmune del huésped, y esto parece ser debido a su escasa inmunogenicidad (característica que presenta porque expresa unos niveles muy bajos de moléculas tipo 2 del complejo mayor de histocompatibilidad), a que no expresan moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 o CD86 (las cuales están implicadas en la activación de los linfocitos T) y a que liberan moléculas bioactivas que se ha demostrado que inhiben a los linfocitos T, B, células NK o células dendríticas derivadas de los monocitos⁷⁷.

En cuanto a la capacidad de diferenciación, estas células tienen capacidad para diferenciarse in vitro hacia hueso, grasa y cartílago¹²⁵, y pueden

diferenciarse hacia otros tejidos como tenocitos, miocitos esqueléticos, células del mesodermo, del ectodermo y del endodermo^{50, 160, 161}.

En algunos casos su capacidad para generar nuevas células y tejidos depende de la programación de expresión génica mientras que en otros casos depende probablemente de la presencia o ausencia de ciertos factores favorecedores solubles⁷⁷.

El proceso de diferenciación de las CSM a los distintos tejidos mesenquimales se conoce como mesogénesis. Así, durante la vida adulta, los vertebrados conservan la capacidad de reparar sus tejidos (huesos, tendones, músculos, cartílagos, el propio estroma medular, el tejido adiposo y cualquier otro tejido conectivo¹⁶²).

Algunas de las células en las que las células mesenquimales son capaces de diferenciarse y que forman parte de la estructura de los tejidos musculoesqueléticos son las siguientes:

-Diferenciación a osteocito:

Las células en el proceso de diferenciación adquieren morfología osteoblástica y expresan fosfatasa alcalina, apareciendo depósitos de calcio, lo que contribuye a la formación de tejido óseo. Este proceso requiere la presencia de beta-glicerolfosfato, ácido ascóric-2-fosfato, dexametasona y suero bovino fetal.

-Diferenciación a condrocito:

La diferenciación de las CSM a células cartilaginosas se realiza en un tubo Falcon para que se pueda expandir en tres dimensiones, donde se mantienen las células sin suero y en presencia de TGF- β ^{147, 163, 164}, hasta que pierden su morfología fibroblástica y comienzan a expresar componentes cartilaginosos específicos. Estudios recientes con médulas de origen bovino, han demostrado que existen resultados similares en presencia y ausencia de TGF- β .

-Diferenciación a adipocito:

En el interior de las células mesenquimales se forman vacuolas y expresan en su superficie el receptor PPAR γ ¹⁶⁵, lipoproteinlipasa y la proteína ácida P2⁵⁰. El gen PPAR γ 2 contribuye al mecanismo de conversión de las CSM en adipocitos activando la diferenciación hacia esta línea celular e inhibiendo a la vez la diferenciación hacia la línea osteoblástica ¹⁶⁵. Para este proceso deben incubarse las CSM con dexametasona, insulina, isobutilmetilxantina, e indometacina.

- Aplicaciones de las CSM en fusión lumbar

En la patología degenerativa del raquis lumbar, la terapia celular mediante la implantación de CSM, constituye una estrategia atractiva para promover la fusión espinal, eliminando la morbilidad y complicaciones del autoinjerto.

Se ha estudiado la efectividad de estas células para conseguir la fusión vertebral en modelos animales (conejo)¹⁶⁶ y en otros estudios se ha demostrado la utilidad de combinar las CSM con carriers constituidos por cerámicas porosas (hidroxiapatita y fosfato tricálcico) para permitir la localización de las células en el sitio específico para realizar su función, obteniendo la fusión vertebral¹⁶⁷, además de ejercer un efecto antiinflamatorio en el sitio¹⁶⁸.

Una vez demostrado el potencial osteogénico de las CSM en varios estudios previos realizados por Cogle¹¹³ y Sigüira¹⁶⁹, y la capacidad de dichas células, gracias a este potencial, de conseguir la fusión espinal en modelos animales como el conejo¹⁶⁶, es necesario que se estudie y demuestre el potencial osteogénico y la seguridad de esta terapia en patologías que requieran fusión vertebral en humanos.

1.3.2.3. Uso de Biomateriales

Los biomateriales son materiales de origen natural o sintético o la combinación de ambos (materiales naturales, metales, cerámicas y polímeros sintéticos) esenciales en la ingeniería tisular y la terapia celular, ya que son componentes necesarios para formar una matriz de sostén y juegan un papel importante en la regeneración de los tejidos celulares. Constituyen la estructura tridimensional necesaria para alojar las células y los factores biológicos que intervendrán en el proceso de generación de los nuevos tejidos^{170, 171}.

Las técnicas de andamiaje para la regeneración de tejidos deben ser biodegradables y biocompatibles, tener una resistencia mecánica adecuada y permitir un microambiente favorable para la formación de tejido óseo^{36, 65, 66, 172}. Todo esto, sin generar una respuesta inflamatoria que conlleve una alteración de la función tisular y celular o una reacción de rechazo o respuesta a cuerpo extraño.

Para ello, los biomateriales deben tener una microestructura porosa, como requisito fundamental, necesaria para que las células activen los factores de crecimiento, los factores de oxigenación y los de nutrición.

En la eficacia de la regeneración influyen:

- La estructura del injerto
- La porosidad de injerto
- Diámetro del poro
- Interconectividad
- Permeabilidad
- Propiedades químicas de la superficie del injerto

Estas características influyen en la capacidad de adherencia de las células al injerto¹⁷³ y permite la localización y permanencia de las células madre en sitios específicos del organismo. Gracias a estas propiedades, los biomateriales mantienen la estructura tridimensional y actúan como una matriz extracelular artificial que suplente las funciones físicas y biológicas de la matriz original o nativa.

1.3.2.3.1. Propiedades ideales de los Biomateriales

Un **sustituto o biomaterial ideal** debe comportarse como un sinérgico entre un componente con propiedades mecánicas y otro con propiedades biológicas y fisiológicas. Debe presentar, por lo tanto, las características fundamentales ya detalladas de osteogénesis, osteoinducción, osteoconducción y osteointegración^{40, 41}.

Además, los sustitutos óseos deben de tener una serie de características deseables como^{38, 39}:

- Biocompatibilidad (esencial)
- Facilidad de uso (moldeable)
- No producir respuesta inflamatoria
- Ser bioabsorbibles
- Coste-efectividad

1.3.2.3.2. Tipos de Biomateriales: Sustitutos óseos

Algunos ejemplos de biomateriales aplicados en terapia celular ósea son los siguientes:

a) Matriz ósea desmineralizada (DBM)

La DBM se obtiene a través de la descalcificación de hueso cortical y posteriormente se procesa con el objetivo de reducir la inmunogenicidad y el riesgo de transmisión de enfermedades.

La matriz ósea conserva las propiedades osteoinductoras ya que presenta el colágeno de la estructura normal ósea y los factores de crecimiento¹⁷⁴ como el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de crecimiento transformante (TGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF).

Aun presentando estas propiedades, tiene las desventajas de que no posee capacidad de soportar carga (sólo se usa de relleno en defectos óseos) y que

los resultados no son buenos homogéneamente, debido a las diferentes formas de procesamiento del DBM (gel, tiras, pasta moldeable, cemento, etc.)

Por todo esto, se utiliza más como complemento del injerto, que como sustituto propiamente dicho^{175, 176}.

En la cirugía de fusión espinal, tras varios estudios, se respalda el uso de DBM como expansor del autoinjerto en artrodesis posterolateral instrumentada de uno o dos niveles¹⁷⁷.

b) Colágeno

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo y forma parte de la matriz ósea extracelular. Presenta la capacidad de adhesión e interacción celular mediante la expresión de ciertos dominios, es biocompatible y produce mínima respuesta inflamatoria antigénica (se degrada por los lisosomas).

Reúne las siguientes propiedades:

- Favorece la mineralización
- Promueve la angiogénesis
- Produce factores de crecimiento
- Favorece la regeneración ósea¹⁶²

De forma aislada, además de presentar cierto potencial inmunógeno, ofrece un soporte estructural mínimo, por lo que se utiliza conjuntamente con las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), células osteoprogenitoras o hidroxiapatita (HA) para favorecer la incorporación del injerto óseo. Forma parte habitualmente de la composición de otros sustitutos óseos (cerámica de HA, gránulos o fosfato cálcico (TCP)) que son efectivos como complementos óseos^{178, 179}.

c) Sustitutos sintéticos

Son materiales que poseen al menos dos de las características de un injerto ideal: osteointegración y osteoconducción. El objetivo es crear sustitutos que sean biocompatibles, produzcan una mínima reacción fibrótica y permitan el remodelado y la formación de hueso nuevo. Mecánicamente deberían alcanzar la fuerza de hueso cortical o esponjoso al que reemplazan, manteniendo la elasticidad para evitar fracturas por fatiga. Los compuestos que presentan estas características están formados por calcio, sílice o aluminio.

Los polímeros sintéticos presentan una serie de desventajas^{162, 180} como su dificultad de manipulación, su escasa y poco predecible reabsorción, y sus resultados clínicos pobres, con reacción inflamatoria ocasional. Sus productos de degradación pueden causar algunos efectos adversos o alterar el microambiente local.

d) Cerámicas

Son sustitutos sintéticos hechos a base de fosfato tricálcico (TCP) e hidroxiapatita (HA) principalmente. Si se usan aisladamente no poseen propiedades osteoinductoras ni osteogénicas, además de ser un escaso soporte estructural.

Las cerámicas se caracterizan por poseer una elevada porosidad y una baja densidad estructural que proporciona un gran lecho para la angiogénesis y el crecimiento óseo, y aunque en principio carece de fuerza de soporte, la va adquiriendo progresivamente a medida que se va rellenando de hueso esponjoso¹⁸¹.

TCP: El TCP poroso tiene altas propiedades de osteoconducción y es reabsorbido por el foco a medida que crece el nuevo hueso, favoreciendo así la integración con el hueso huésped vecino y también la resorción y la formación ósea¹⁸².

HA: Permanece más tiempo sin reabsorberse ya que tiene una tasa de reabsorción más lenta, pudiendo generar focos de estrés mecánico.

Debido a que solo presentan capacidades osteoconductoras, estos materiales tienden a usarse de forma compuesta asociado a otros elementos, como el autoinjerto o aspirado de médula ósea (HA+TCP o HA +hueso autólogo¹⁸³). Las tasas de fusión con cerámicas en solitario son muy bajas¹⁸⁴.

Ejemplos de cerámicas más usadas son el fosfato cálcico que está compuesto por TCP-alfa mezclado con carbonato cálcico y fosfato monocálcico monohidratado, el TCP-beta ultraporoso que imita la estructura del hueso esponjoso favoreciendo la actividad fagocítica y la infiltración por células osteoformadoras y factores de crecimiento y la HA coralina (que puede ser natural o sintética) que deriva del coral marino y es una estructura porosa compuesta de fosfato cálcico cuya principal propiedad es la osteoconducción y que recientemente se ha usado como vehículo de algunos factores de crecimiento y BMPs¹⁸⁵.

El uso de TCP-beta en cirugías de fusión posterolateral instrumentada de un solo nivel, presenta tasas de fusión similares a las técnicas de fusión clásicas¹⁷⁷. *Korovessis* estudió el potencial de fusión de la HA coralina en artrodesis posterolateral instrumentada, concluyendo que es un extensor del injerto seguro y efectivo para la fusión lumbar posterolateral^{184, 185}.

1.3.2.3.3. Avances en el uso de los biomateriales

Las queratinas extraídas de fibras de cabello humano, se han usado como biomateriales en algunas prácticas médicas formando parte de determinados fármacos, piel sintética e implantes cocleares. Este uso ha sido debido a que presentan un mecanismo fácil de extracción, gran biocompatibilidad, y sitios de reconocimiento molecular donde se integran las células¹⁸⁶.

Matrices derivadas de la submucosa intestinal porcina (SIS) y de la vejiga (BSM) se han usado en procedimientos de formación de tejido de vejiga, fascias, uretra, vasos, cartílagos y huesos¹⁸⁷.

Los biomateriales más usados en terapia celular son los poliésteres (ácido poliglicólico (PGA) y el ácido poliláctico (PLA) y los copolímeros, que se están usando en suturas y en fármacos. Poseen adecuadas propiedades mecánicas y de biodegradación.

En cambio, para la regeneración de tejido óseo los biomateriales más utilizados son el BSM que es un material de origen natural presente en la matriz de los tejidos, el polímero sintético ácido poliláctico co-glicólico (PLGA) y la médula ósea desmineralizada (DBM), constituyendo todos ellos un buen soporte para las CSM.

Los polímeros degradables (PGA y PLA) o su mezcla co-polímeros, tienen la capacidad de que en poco tiempo, semanas o meses, pueden degradarse a dióxido de carbono y agua permitiendo que los tejidos nativos /células óseas, etc. rellenen el espacio que ocupaba el implante, aunque en la actualidad se corre el riesgo de que estos pierdan fuerza de reabsorberse antes de comenzar el relleno del tejido nativo y además pueden desencadenar una reacción inflamatoria al reabsorberse¹⁸⁸.

1.3.2.4. Factores de crecimiento

Para estimular el crecimiento de nuevo tejido óseo existe una liberación por parte del injerto de factores que promueven la migración, proliferación y diferenciación celular¹⁸⁹. Estos factores pueden incorporarse al injerto para ser liberados o unirse a la superficie de contacto del injerto mediante una unión covalente para mejorar la osteointegración del mismo.

Las moléculas que se liberan para llevar a cabo la función osteoinductora son sustancias inductoras como las proteínas no colágenas, que son sintetizadas por los osteoblastos y de las cuales el 1% son los factores de crecimiento, principales reguladores del metabolismo de las células óseas¹⁹⁰. Destacan: BMP, IGF, TGF- β , FGF, PDGF¹⁹¹.

Sus funciones clínicas son acelerar el proceso de consolidación ósea y tratamiento de defectos óseos o pseudoartrosis.

Las BMP favorecen la diferenciación de las células madre mesenquimales hacia osteoblastos y condroblastos^{191,192}, además de aparecer en la fase precoz de consolidación de las fracturas^{193,194}.

1.3.2.4.1. Proteínas morfogenéticas óseas (BMP) en cirugía del raquis

Actualmente, las BMP producidas artificialmente son los factores potenciadores de crecimiento más estudiados y utilizados para la reparación ósea tras el injerto de hueso autólogo⁴⁵.

Las BMP son factores de crecimiento pertenecientes a la familia de los factores TGF- β . Funcionan fundamentalmente en el periodo embrionario para la formación del tubo neural, del corazón y del cartílago, y en el periodo postembrionario para la formación del tejido óseo.

En el periodo postnatal tienen una capacidad formadora de hueso similar a la del injerto óseo autólogo de MO^{195, 196} pero sin presentar sus inconvenientes como la necesidad de intervención quirúrgica para su obtención, el riesgo de pérdida hemática e infección y la morbilidad del sitio donante.

El empleo de las BMP está relacionado con una serie de efectos adversos o complicaciones, como la respuesta inflamatoria variable que producen en algunas situaciones, el efecto dudoso sobre células precancerosas ya que no existen estudios a medio o largo plazo, su respuesta neoformadora de hueso variable pudiendo formar hueso ectópico en otras localizaciones y su dificultad de colocación precisa ya que se presentan en estado líquido y necesitan transportadores como esponjas de colágeno bovino.

En 2002 fue aprobada por la "Food and Drugs Administration" (FDA) el uso de rhBMP-2 para la fusión vertebral lumbar anterior de un solo nivel asociado a un dispositivo intersomático roscado¹⁹⁶. Se observó, que en la cirugía de fusión posterior se producía hueso ectópico en gran cantidad provocando la compresión de estructuras nerviosas y por lo tanto la aparición de clínica

radicular en los pacientes; y también se describió un pequeño aumento del riesgo de cáncer.

La rhBMP-7 fue aprobada por la FDA en 2004, como injerto alternativo en casos en los que no sea posible el uso de injerto óseo autólogo o de MO, o los pacientes presenten una mala calidad ósea por osteoporosis, tabaquismo o diabetes, en cirugías de revisión de fusión lumbar posterolateral¹⁹⁵ aunque en 2009 la FDA no concedió el aprobado precomercialización.

Debido a lo expuesto, el uso de BMP en la actualidad, en cirugía de raquis, queda reservado a casos complejos en los que el uso de injerto óseo autólogo o heterólogo no sea viable.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS

Si el empleo de CSM humanas transportadas en un carrier de TCP e HA puede conseguir la fusión ósea espinal en pacientes humanos con discopatía lumbar unisegmentaria que requieran una artrodesis posterolateral instrumentada.

3. OBJETIVOS

Principales:

- Analizar la **seguridad** de la implantación de CSM autólogas expandidas “in vitro” sobre un carrier de fosfato tricálcico e hidroxiapatita como alternativa terapéutica al injerto óseo en pacientes con discopatía degenerativa lumbar unisegmentaria.
La seguridad se medirá en términos de efectos adversos ocurridos y aparición de complicaciones.
- Analizar la **factibilidad** de realizar este procedimiento dentro de un contexto de práctica clínica hospitalaria habitual.

Secundarios:

- Analizar la **eficacia** del procedimiento en relación a conseguir una mejoría clínica del dolor, la funcionalidad, la calidad de vida y el estatus laboral de los pacientes.
- Analizar la eficacia medida en términos radiológicos (objetivación de fusión ósea en la radiología simple).
- Eliminar la morbilidad del sitio quirúrgico producida por el uso tradicional del autoinjerto

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño del estudio

El estudio consistió en un ensayo clínico (EC) abierto, prospectivo, unicéntrico, no aleatorizado, fase I/II con un solo grupo experimental de tratamiento. (CódigoEC:CSM/Fusión/2009-EudraCT:2010-018335-17; <https://clinicaltrials.gov> code Identifie: NCT01513694). El ensayo fue revisado y aprobado por el comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca y la Agencia Española de medicamentos (AEMPS).

4.1.1. Consideraciones éticas

El estudio se realizó siguiendo el protocolo y recomendaciones para ensayos clínicos y evaluación del producto en fase de investigación en el hombre, que figuran en la declaración de Helsinki, revisada en las sucesivas asambleas mundiales (Asambleas Generales Mundiales WMA desde 1964 Helsinki hasta la actualidad), y la actual Legislación Española en materia de Ensayos Clínicos y de las Buenas Prácticas Clínicas (RD 223/2004), siguiendo las normas ICH-GCP (CPMP/ICH/135/95).

El Comité ético de investigación clínica (CEIC) fue el encargado de revisar y aprobar el protocolo y el consentimiento informado antes de incluir a los sujetos. El sujeto firmó el consentimiento informado aprobado por el CEIC previo a cualquier práctica clínica.

4.1.2. Consentimiento informado

El consentimiento de los participantes del ensayo se entregó siempre por escrito y el sujeto lo firmó y fechó antes de ser incluido en el estudio.

Previo a la firma, el paciente recibió toda la información relativa a la naturaleza del estudio, su propósito, los procedimientos implicados, la duración prevista, los riesgos y beneficios posibles implicados y se le entregó una copia de dicho consentimiento informado.

También se les informó a los pacientes que su participación era totalmente voluntaria y podían retirarse del mismo en cualquier momento sin tener que justificar su marcha y sin que su retirada suponga un perjuicio en su tratamiento médico posterior.

4.1.3. Protección de datos

Con el objetivo de garantizar la confidencialidad de los datos del ensayo, los datos originales permanecieron en el hospital y solo tuvieron acceso a los mismos el equipo investigador, el monitor del ensayo y el Comité Ético de Investigación Clínica del centro.

La recogida de los datos se realizó a través de los cuadernos de recogida de datos (CRD) siguiendo lo recogido en la Ley Orgánica 15/99 de 13 de Diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal. Se mantuvo en todo momento el anonimato de los sujetos participantes en el ensayo.

4.2. Fases del estudio

El estudio se llevó a cabo mediante un protocolo de actuación que obtuviera información válida y cuantificada, y para ello se dividió en 3 fases como se muestra en la figura 2.

Figura 2. Esquema de las fases del estudio



4.2.1. Fase Selección

Es la fase en la que se realizan la inclusión de los pacientes en el estudio, una explicación detallada del ensayo incluyendo las ventajas y posibles inconvenientes (problemas técnicos y posibles complicaciones), la firma del consentimiento informado por parte del paciente y la obtención, cultivo y expansión de las CSM.

4.2.1.1. Población estudiada y evaluación pre-tratamiento

La selección de los pacientes se realizó en consultas externas de la Unidad de Columna del servicio de Traumatología del Complejo Asistencial de Salamanca y se llevó a cabo durante un periodo de inclusión de 12 hasta 24 meses. Esta selección se realizó bajo la aprobación del CEIC del Hospital Universitario de Salamanca y de acuerdo con la declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2000.

a) Criterios de inclusión y exclusión

Los pacientes derivados a la consulta por especialistas de nuestro centro o de otros centros de la comunidad autónoma de Castilla y León por padecimientos de la columna vertebral, para poder ser incluidos en el estudio, debían cumplir todos, los siguientes criterios de inclusión:

Biodemográficos:

- Tener una edad entre 18 y 65 años cualquiera que fuera su género.
- Estar capacitados para la firma del consentimiento informado.

Clínicos:

- Presentar un dolor lumbar y/o radicular refractario a tratamiento conservador (fármacos, fisioterapia) de más de 6 meses de evolución.

Radiológicos:

- Tener el diagnóstico radiológico de discopatía o enfermedad degenerativa lumbar discal (DDD) monosegmentaria (L4-L5 o L5-S1): disminución del espacio discal, osteofitos, etc. en la Rx simple.
- Estadificarse como grado IV o V de Pfirrmann en la RMN¹⁰.

Los pacientes seleccionados además de cumplir con los criterios descritos, debían de tener la capacidad de cumplir con todos los requerimientos del ensayo clínico, además, firmaron voluntariamente el consentimiento informado

antes de la realización de cualquier prueba que no formara parte de la atención habitual de los pacientes (por ejemplo el consentimiento para la extracción de MO) y eran conocedores de la posibilidad de abandonar el ensayo en el momento que quisieran, sin ser perjudicados en ningún momento durante su atención posterior.

Los pacientes que presentaron alguno de los siguientes criterios de exclusión fueron excluidos del ensayo clínico:

- Rechazo por parte del paciente del tratamiento quirúrgico.
- Alérgicos a Penicilina (utilizada como suplemento del medio de cultivo).
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- Pacientes con alguna anomalía genética o adquirida estructural o anatómica que contraindique el procedimiento.
- Pacientes que padezcan importantes comorbilidades:
 - o Enfermedades psiquiátricas graves (drogodependencias, psicosis, trastorno de la personalidad grave).
 - o Patologías tumorales.
 - o Enfermedades inflamatorias sistémicas (espondilitis, artritis reumatoide, etc.).
 - o Enfermedades infecciosas activas.
- Pacientes tratados con terapia quimioterápica, inmunosupresora y corticoidea.
- Pacientes que hubiesen recibido otro agente experimental en los últimos 30 días y/o que estuvieran incluidos en otro ensayo clínico.
- Riesgo quirúrgico elevado (ASA mayor o igual a IV), o contraindicación anestésica.

En la tabla 4 se detallan las características de los pacientes a estudio.

Tabla 4. Características de los pacientes (V=Varón / M=Mujer)

PACIENTE	EDAD	GÉNERO	DOLOR LUMBAR	DOLOR RADICULAR	NIVEL	PFIRRMANN	ASA
1	41	V	SI	SI	L4-L5	V	I
2	30	M	SI	SI	L4-L5	IV	I
3	52	V	SI	SI	L4-L5	IV	II
4	50	V	SI	SI	L5-S1	V	I
5	44	V	SI	SI	L5-S1	V	II
6	54	M	SI	SI	L4-L5	IV	II
7	42	V	SI	SI	L5-S1	IV	I
8	33	M	SI	SI	L5-S1	V	I
9	41	M	SI	SI	L5-S1	V	I
10	49	M	SI	SI	L4-L5	V	II
11	50	M	SI	SI	L5-S1	IV	I

b) Criterios de retirada y abandono

Se establecieron una serie de situaciones en los que los pacientes deberían retirarse del estudio si cumplían al menos una de las siguientes:

- Obtención de menos de 0.5×10^6 CSM por kilo de peso corporal de receptor después de la expansión celular en el laboratorio.
- Presencia de acontecimiento adverso grave anterior a la aplicación de las CSM.

En este caso a estos pacientes se les ofrecería un tratamiento alternativo adecuado y se debería registrar el motivo de la discontinuidad del estudio, programar un seguimiento si es necesario, y documentar su evolución.

- Otras causas por las que el paciente podría ser retirado del estudio son:
 - o Si el paciente es no cooperador o no cumple los requerimientos del ensayo clínico.
 - o Cuando el facultativo considere que la salud del paciente puede estar comprometida.

- Si aparece toxicidad grave grado IV en la escala de efectos adversos de la organización mundial de la salud (OMS).
- Si el efecto terapéutico obtenido con el tratamiento es insatisfactorio.
- Si existe alguna situación de violación del protocolo.
- Si el paciente en cualquier momento decide retirar el consentimiento informado.
- Si se da una pérdida del seguimiento.

Por otro lado el facultativo/ investigador podría a su criterio, suspender el tratamiento en pacientes que presenten alguna de las siguientes razones:

- Negación a recibir el tratamiento.
- Aparición de enfermedad concomitante en el transcurso del estudio.
- Violaciones mayores del protocolo.
- Requerimiento del paciente.
- No cumplimiento con las visitas establecidas.
- Razones administrativas.
- Cambios específicos o generales en el paciente que a criterio del investigador considere que no debe recibir más tratamiento.

Los pacientes que abandonasen el ensayo por cualquier motivo, no podían volver a ser incluidos. En el caso de que la decisión se debiera a la voluntad del propio paciente, éste no estaría obligado a dar explicación alguna por ello.

Si el paciente decidiera abandonar el estudio una vez administrado el producto de investigación (tras la realización del procedimiento quirúrgico), la retirada del mismo no le aportaría ningún beneficio en cuanto a seguridad, por lo que si es posible se le recomendaría continuar en el mismo.

c) Interrupción del ensayo clínico

El estudio podría interrumpirse por el equipo investigador de manera definitiva, ante cualquier acontecimiento adverso grave relacionado con el tratamiento o si se cumplieran alguna de las siguientes circunstancias:

1. Toxicidad grave relacionada con la infusión en 3 de cada 10 pacientes.
2. Respuesta terapéutica en menos de 3 de cada 10 pacientes.
3. Infecciones graves en más de 7 pacientes de cada 10.
4. Falta de inclusión de un mínimo de 5 pacientes en los primeros 18 meses desde su aprobación y distribución.

Por lo tanto, después de todas estas consideraciones y de la aplicación de los anteriores criterios descritos, la población a estudiar se constituyó por 14 pacientes con discopatía degenerativa unisegmentaria que precisaron una artrodesis del segmento vertebral enfermo. De entre dichos pacientes (6 hombres y 8 mujeres), 3 fueron excluidos por fallos de screening (1 caso de sífilis y 2 de hepatitis viral), obteniéndose finalmente una muestra de 11 pacientes, intervenidos en nuestro centro (HUS, Salamanca, España) de enfermedad degenerativa lumbar unisegmentaria entre los años 2010 y 2013.

d) Evaluación pretratamiento

A la población resultante del estudio, se les llevó a cabo los siguientes estudios y evaluaciones:

- Estudio preoperatorio habitual (valoración anestésica, analítica, ECG, Rx de tórax si es necesario, etc.)
- Evaluación clínica y de discapacidad:
 - a) Escala visual analógica (EVA)
 - b) "Owestry disability index" (ODI)
- Evaluación del estado general de salud o calidad de vida:
 - a) "Short Form-36 Health Survey" (SF-36)
- Situación laboral.
- Diagnóstico clínico de discopatía degenerativa lumbar: dolor lumbar y/o radicular de características mecánicas.

- Diagnóstico radiológico: Rx simple anteroposterior y lateral, Rx simple lateral funcional y RMN (clasificación de Pfirrmann del grado de discopatía).

En la primera visita, se le realizó a cada paciente que acudió con sospecha de discopatía lumbar, una historia clínica completa incluyendo enfermedades concomitantes y medicación, además de una exhaustiva exploración física. Tras la explicación de los detalles del estudio y tratamiento y la valoración clínica para constatar que el paciente cumple los criterios de inclusión y exclusión, se obtuvo el consentimiento informado por escrito.

Posteriormente, se realizaron las siguientes pruebas valoraciones diagnósticas:

- Test de embarazo en suero a todas las mujeres en edad fértil.
- Rx simple AP, lateral y lateral funcional (en flexo-extensión) para establecer el diagnóstico de discopatía lumbar de un único nivel.
- RMN para clasificar el grado de la discopatía según los estadios de Pfirrmann¹⁰.
- Valoración clínica según la escala EVA para evaluar el nivel subjetivo de dolor.
- Cuestionario de discapacidad funcional ODI/ Oswestry.
- Cuestionario de calidad de vida: SF 36
- Estudio preoperatorio y valoración anestésica.
- Interrogatorio sobre su situación laboral.

4.2.1.2. Producción celular

Cuatro semanas antes del procedimiento, cada paciente fue sometido a una extracción de 20-25ml de médula ósea, en quirófano y en condiciones de

esterilidad, bajo sedación. Posteriormente las células obtenidas pasaron a la Unidad de Producción Celular, donde se realizó la expansión de las mismas de acuerdo al protocolo estándar de fabricación GMP (Good Manufacturer Practice).

La producción de células se realizó en la Unidad de Producción de células GMP del Hospital universitario de Salamanca. Se siguieron los mismos pasos para el procesamiento de las células que en estudios previos realizados por el mismo equipo en modelo animal¹⁹⁷ con la ligera modificación de añadir fosfato tricálcico (TCP) al producto final de las CSM.

No existen datos que predigan el número de CSM que se requieren para conseguir la formación de hueso, ni el porcentaje de células que sobreviven tras su administración, ni aquellas que se diferencian una vez implantadas. Así, estudios preclínicos en modelos animales han mostrado variaciones de dosis muy importantes (desde 1×10^6 a 100×10^6 CSM/animal) ^{166-168,198}.

En este trabajo, la dosis establecida se fijó en función del peso del paciente que oscilaría entre $0,5 \times 10^6$ CSM/Kg peso receptor (dosis mínima) hasta $1,5 \times 10^6$ CSM/Kg (dosis máxima). Estas dosis son inferiores a las utilizadas en modelos animales por lo que no presentan en ningún caso problemas de toxicidad.

El número de referencia del dossier medicinal (IMPD) aprobado por la AEMPS para la producción de células fue PEI-100-007.

4.2.1.2.1. Extracción de médula ósea

Entre 20 y 25ml de MO fue obtenido de la cresta iliaca de cada paciente en quirófano siguiendo los procedimientos estándar del servicio de Hematología del HUS y luego transferido en condiciones estériles a las instalaciones de GMP.

Este procedimiento se llevó a cabo cuatro semanas antes de la realización de la Cirugía de fusión lumbar, en quirófano, bajo condiciones de esterilidad y bajo sedación o raquianestesia y se obtuvo dicho aspirado de MO procedente de

cresta iliaca posterosuperior. La muestra se depositaba en tubos estériles (Venoject) con heparina (Heparina 5000 UI/ml) y se enviaba al laboratorio de GMP del Hospital Universitario de Salamanca para su procesamiento, siempre dentro de las 24 horas siguientes a la extracción.

4.2.1.2.2. Obtención del lisado plaquetario

El uso de CSM en ensayos clínicos requiere, para la expansión “in vitro” de las células progenitoras, la utilización de suero de ternera fetal, lo que presenta un riesgo para el humano de contaminación por priones u otros microorganismos. Para evitar el uso de productos animales con este fin, minimizando así sus posibles complicaciones como la transmisión de enfermedades infecciosas se puede usar como alternativa el suero autólogo tras la realización de un proceso de plasmaféresis.

Aunque hay estudios en animales, apenas hay datos sobre la seguridad y eficacia de este procedimiento en humanos¹⁹⁹.

Recientemente se ha podido demostrar que las CSM humanas pueden expandirse con rapidez y con una expresión genética estable en suero autólogo, en ausencia de factores de crecimiento¹⁹⁸, pero esta técnica requiere la realización de una plasmaféresis al paciente para obtener el suero, y la cantidad obtenida es en ocasiones insuficiente para la realización del proceso de expansión. Basándonos en un estudio del mismo grupo de investigación, realizado previamente, en el que se demuestra que la adicción de extracto plaquetario al medio de expansión acorta el periodo de cultivo, se planteó utilizar este suplemento en lugar de suero autólogo²⁰⁰. Además, este producto no altera la estabilidad ni la capacidad de diferenciación de las células y cumple todos los estándares de calidad para su uso clínico siendo aportado por el Centro de hemodonación de Castilla y León.

El lisado plaquetario se obtuvo de bolsas de plaquetas caducadas extraídas en el centro de hemodonación, identificadas y testadas según los estándares legales aplicables a los productos hemoterápicos. Al llegar al laboratorio de

GMP de Terapia Celular, fueron congeladas a -80°C durante 3- 4 días para conseguir el lisado plaquetario y obtener un extracto que contuviera los factores de crecimiento. Tras descongelarlas a 37°C se procesaron en una cabina de flujo laminar y posteriormente se centrifugaron a 900 g durante 30 segundos, el sobrenadante obtenido se congeló a -20°C . De este pool se tomó una muestra para control microbiológico y otra para registrarla en la plaquetoteca.

En el momento en que se fue a llevar a cabo la aplicación, el producto se descongeló y se le añadió el medio de cultivo α -MEM a una concentración del 5%.

4.2.1.2.3. Transportador o carrier

En los ensayos clínicos de tratamiento con terapia celular, el principal problema es la supervivencia de las células tras su administración y colocarlas en una localización adecuada.

El objetivo de este estudio es obtener una masa ósea de fusión espinal sólida, por lo que las células se debían de administrar de manera directa en el lecho de fusión, que en este caso es el espacio intertransverso y facetario, para así proporcionarles un ambiente que favoreciera su diferenciación hacia la línea celular osteoblástica. Esto es posible gracias a la presentación de las CSM con un transportador o “carrier”.

El carrier es el soporte para la suspensión celular, se trata de un compuesto sintético de uso comercial aprobado para su utilización en clínica en nuestro país y con sello de la Comunidad Económica Europea (CEE).

En este estudio el “carrier” utilizado estaba compuesto por fosfato tricálcico (TCP) e hidroxiapatita (HA), que permitió posteriormente que durante el acto quirúrgico, las células se adhiriesen a su superficie y penetraran a través de sus poros, para permanecer así en la localización deseada. Estos transportadores utilizados no presentan ningún problema de seguridad ya que están autorizados por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos de EEUU (FDA), además se

reabsorben de forma gradual y no se han descrito reacciones de rechazo o incompatibilidad tras su mezcla con las células¹⁶⁷.

El carrier empleado de TCP e HA constituyó un compuesto denominado Conduit-TC, integrado por 70% de TCP y el 30% restante por HA. Su formulación es en gránulos y viene dispuesto en frascos de 10cc estériles, lo que permite su fácil manejo en condiciones estériles.

4.2.1.2.4. Preparación del producto celular: Obtención del compuesto de células mesenquimales

El objetivo de la preparación de la muestra de MO es la obtención de células para su expansión en condiciones GMP. Durante este proceso las células sufren un determinado número de pases (5 pases o expansiones como máximo) para obtener el número de células indicado ($0,5-1,5 \times 10^6$ CSM/Kg).

Desde la extracción de la MO (20-25ml) y su depósito en bolsas estériles con heparina, hasta la entrega en el laboratorio para su procesamiento y expansión de las células mesenquimales no pudieron transcurrir más de 24 horas.

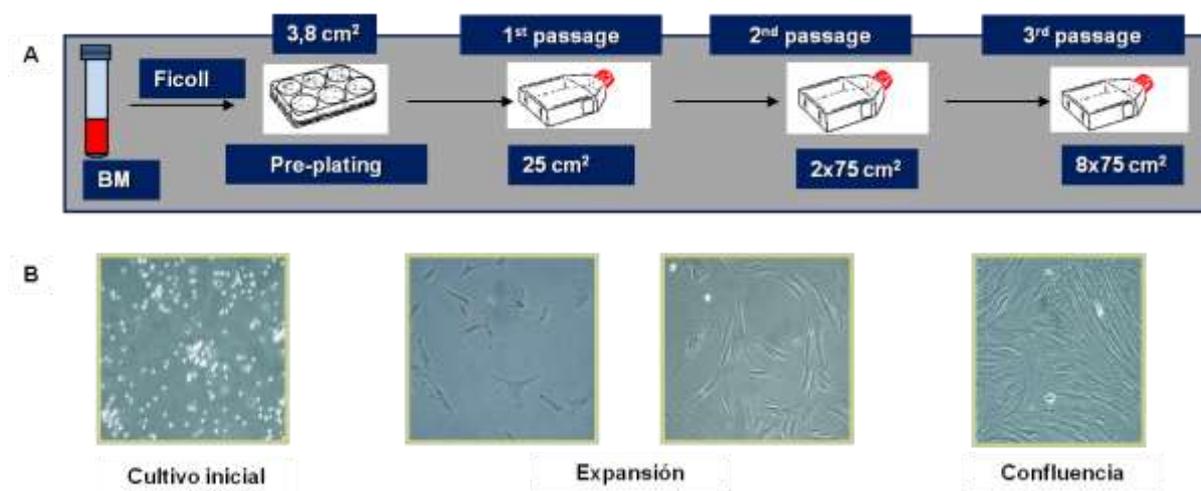
Las células fueron aisladas tras la centrifugación (primero a 2000g durante 20 minutos y posteriormente a 450g durante 8 minutos) con gradiente de densidad (Ficoll®- Paque, GE Healthcare Biosciences, AB, Uppsala, Suecia); el recuento de las células mononucleadas se realizó en cámara de Neubauer posteriormente se sembraron para su cultivo y expansión, en frascos que contenían inicialmente con una concentración de 160.000 células/cm² en una superficie de poliestireno no recubierta (Corning Costar, Milán, Italia) con un medio de cultivo que contenía un caldo de cultivo (94% α MEM) con un 1% de penicilina/estreptomina (Gibco, Paisley, UK), un 5% de sobrenadante de lisado plaquetario de donante sano y 2 UI/ml de heparina (Hospira, Alcobendas, España); y se mantuvieron a una temperatura de 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂.

Después de una confluencia del 70-80%, se realizaron sucesivos pases de cultivo en los que las células se separaron con TrypLE Select (Gibco, Pasley, Reino Unido) y fueron resembradas a 5000 células /cm₂. Después de dos o tres

pases, tras 4 semanas de cultivo, las células se desprendieron, lavaron y concentraron para el implante. La figura 3 muestra el resumen de dicho proceso.

Se determinó la pureza del cultivo mediante citometría de flujo que permitió conocer la expresión de los marcadores celulares. Se detectó la ausencia de marcadores CD34, CD45, HLA-DR, CD-19, CD-14 y la presencia de los marcadores CD73, CD90 y CD105. En todos los pases y al final del proceso se realizaron recuentos celulares, controles microbiológicos, estudios de viabilidad, caracterización fenotípica por citometría y despistaje de micoplasma e infecciones bacterianas (tinción GRAM). También se realizaron estudios de diferenciación hacia tres líneas (adipocito, osteoblasto y condrocito) previo a la infusión.

Figura 3. Obtención y cultivo de CSM
Figura 3B. Expansión de CSM



El producto final se constituyó por aproximadamente entre 0,5- 1,5 x 10⁶ células/Kg del paciente, en una suspensión celular estéril de pequeño tamaño (5-10 ml), y posteriormente se mezcló con 20 ml del transportador, ya definido

en apartados anteriores, compuesto por TCP e HA (Conduit- TC Granules, Depuy-Spine, Raynham, MA, US).

La composición de la suspensión de las CSM fue la siguiente:

- Sustancia activa: Células madre mesenquimales de la MO.
- Carrier: Conduit TCP.
- Excipientes: Solución de Suero fisiológico (Baxter PE 1307):
 - o Cloruro sódico (900mg/100ml)
 - Sodio: 154mmol/l
 - Cloruro: 154mmol/l
 - PH: 5,5
 - Osmolaridad 308 mOsm/l (aproximadamente)

Este producto final fue cargado en dos jeringas, liberado tras su aprobación por los responsables de producción y de control de calidad y llevado a la sala de quirófano para su infusión en el paciente durante el procedimiento quirúrgico.

Las jeringas fueron depositadas en bolsas térmicas de transporte con 2 acumuladores de frío (congelados previamente durante 24 horas a -20°C) y el contenedor para su transporte se mantuvo refrigerado (2-8°C) hasta el momento de la implantación en el paciente.

4.2.2. Fase Tratamiento

Esta fase consiste en la aplicación de las CSM en el espacio intertransverso, que es el lecho de fusión, durante el procedimiento quirúrgico de artrodesis vertebral posterolateral instrumentada.

Tras la cirugía a los pacientes se les permitió la sedestación en el primer día postoperatorio sin necesidad de faja ortopédica y la deambulación el segundo día, dándose de alta a los 5-6 días si no aparecieron complicaciones.

4.2.2.1. Procedimiento quirúrgico

El procedimiento quirúrgico realizado fue, en todos los casos, una artrodesis posterolateral instrumentada, llevada a cabo por el mismo equipo de cirujanos. En un caso además se realizó una hemilaminectomía izquierda y descompresión radicular de la raíz L5.

En todos los procedimientos fue utilizada anestesia general y profilaxis antibiótica con cefazolina 2 gramos intravenosos durante la inducción anestésica.

La incisión realizada fue la línea media posterior lumbar sobre las espinosas del segmento afecto, tras la desinserción de la musculatura paravertebral, se expusieron las apófisis transversas y se realizó curetaje de las mismas como preparación del lecho de fusión en la zona intertransversa. Se colocaron los tornillos pediculares de titanio en el segmento vertebral afecto y si fuera necesario se realizó la descompresión del tejido neural.

La mezcla de la solución celular constituida por una suspensión de CSM (suspendidas en suero fisiológico) en una única dosis de $0,5-15 \times 10^6$ células/kg, junto al soporte biocompatible de TCP e HA, proporcionada por el personal de la sala de producción celular tras su validación, fue aplicado en el lecho de fusión (espacio intertransverso y macizos facetarios) tras la preparación del mismo mediante la decorticación de la superficie ósea, aplicando el contenido de cada jeringa a cada lado como se puede observar en la figura 4. Su

administración directa fue fácil debido a que la porosidad del carrier le confiere a la mezcla una consistencia semipastosa que favorece su administración en el lugar adecuado.

No se usaron sustancias adicionales a este producto aplicado para conseguir la fusión espinal.

El cierre de la herida se llevó a cabo con el aporte de un drenaje no aspirativo para evitar la aspiración del implante celular.

En el postoperatorio, los pacientes recibieron profilaxis tromboembólica con enoxaparina 40 mg s.c. cada 24 horas durante 10 días.

El primer día postquirúrgico se les permitió a los pacientes la sedestación sin necesidad de ortesis lumbar, y al segundo día la bipedestación y deambulaci3n. La estancia media hasta el alta fue de unos 5 días con un rango que oscil3 entre 4 y 6 días).

Figura 4. Procedimiento de aplicaci3n de las CSM en el lecho de fusión



4.2.2.2. Tratamientos concomitantes

Fueron prohibidos los medicamentos, tratamientos o procedimientos que se consideraron que podían interferir con el producto de investigaci3n como cualquier otro agente en investigaci3n, tratamientos o procedimientos

alternativos al tratamiento con CSM para obtener fusión lumbar, quimioterápicos, inmunosupresores y corticoides.

4.2.3. Fase seguimiento

En el postoperatorio inmediato se realizó un seguimiento diario en la planta de hospitalización durante los primeros días.

En las visitas en consultas externas (al mes, 3 meses, 6 meses y al año), según muestra la tabla 5, se estudiaron los resultados clínicos de mejoría o empeoramiento sintomático y los radiológicos en términos de fusión vertebral observada en la Rx simple Ap y lateral y funcionales, y también se registró cualquier efecto adverso que ocurriera durante el proceso.

El seguimiento de los pacientes posterior al alta, se estableció en 12 meses inicialmente, todos los pacientes fueron evaluados de forma longitudinal para todos los parámetros clínicos y paraclínicos. Se estableció este periodo ya que si al año postoperatorio no se objetivaba fusión se consideraría que estábamos ante una pseudoartrosis y por tanto, un fracaso de la técnica.

Aunque el seguimiento inicial establecido del ensayo fue de 12 meses, se evaluó a todos los pacientes durante otros 5 años para determinar la seguridad y la eficacia a largo plazo.

Tabla 5. Cronograma de la valoración en consulta

Selección	-Diagnóstico clínico (dolor, capacidad funcional, ABVD) - EVA - ODI - SF-36 -Diagnóstico radiológico: Rx AP, Lateral y dinámicas. RMN -Parámetros analíticos/ ASA	
1 mes	- EVA - ODI	- Rx AP y Lateral
3 meses	- EVA - ODI - SF-36	- Rx AP y Lateral
6 meses	- EVA - ODI - SF-36	-Rx AP y Lateral
1 año	- EVA - ODI - SF-36	-Rx AP y Lateral

4.2.3.1. Procedimientos realizados durante el seguimiento:

Los pacientes realizaron visitas de seguimiento cada mes, 3 meses, 6 meses y un año, en las cuales se realizaron las siguientes evaluaciones:

- Anamnesis y exploración física
- Documentación del estado del paciente
- Variables clínicas
- Variables radiológicas
- Documentación de Efectos Adversos

En la visita de fin de tratamiento (al año) además del interrogatorio al paciente, de su exploración física y de las evaluaciones anteriores, se realizaron:

- Extracción de muestras de sangre para análisis de:
 - o Hematología (recuento sanguíneo completo, fórmula sanguínea)
 - o Bioquímica (bilirrubina, creatinina, AST, ALT, fosfatasa alcalina, LDH, albúmina, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos y HbA1c)
- Rx Ap y axial de ambas caderas
- Documentación de la medicación y tratamientos concomitantes.

a) Variables analizadas en cada visita:

• **Variables clínicas:**

- Dolor o Eficacia clínica: Escala visual analógica (EVA)²⁰¹
- Función o Discapacidad funcional: Oswestry (ODI)²⁰²
- Calidad de vida mediante el cuestionario SF-36 ²⁰³
- Estatus laboral: incapacidad, cambio de actividad, reincorporación laboral.

• **Variables radiológicas:**

- Fusión radiológica: Existencia de puentes óseos claramente evidenciables en la radiografía simple AP y lateral y dinámicas (en flexo-extensión) y ausencia de líneas de radiolucencia que pueden indicar retardo de consolidación o pseudoartrosis.

Aunque la RMN es una modalidad radiológica muy útil para la evaluación de las partes blandas, tiene nula utilidad como método para establecer la consecución de la fusión ósea. Por esta razón, en este estudio, como en la mayoría, la evaluación de la consecución o no de la artrodesis o fusión se realizó utilizando la radiología simple.

El TAC (tomografía axial computerizada), que también puede poner de manifiesto la existencia de la fusión ósea, no se propuso como método ya que supone someter al paciente a una dosis de radiación muy importante sin que suponga un aporte rentable ni para el paciente ni para el estudio.

b) Acontecimientos adversos registrados en cada visita

Un acontecimiento adverso se define como cualquier episodio o experiencia médica desfavorable en un paciente o sujeto de ensayo clínico que recibe un tratamiento experimental (en este caso células mesenquimales de MO) sin importar la dosis o relación causal. Puede incluir cualquier signo (como una erupción cutánea), síntoma (como náuseas o dolor torácico) desfavorable, un hallazgo anormal de laboratorio o radiológico o una enfermedad temporalmente

asociada al uso de la terapia celular o empeoramiento de alguna patología preexistente.

Todos estos efectos, fueron recogidos en la historia clínica del paciente y en el cuaderno CRD, registrando su gravedad así como su relación con el producto del estudio.

- **Tipos:**

- Se califica de acontecimiento adverso grave (AAG) a cualquier experiencia no deseada que afecta al paciente, esté o no relacionada con el tratamiento experimental y que dé lugar a la muerte, suponga un riesgo para la vida, provoque la hospitalización o una incapacidad permanente; también se consideran AAG reacciones adversas importantes que no comprometen de manera inmediata la vida pero que suponen un peligro para el paciente y/o que requieren un tratamiento o intervención para prevenir lo anteriormente citado. Estos, deben ser comunicadas de forma inmediata.
- La muerte tóxica se define como la muerte secundaria a la toxicidad del tratamiento y es independiente de la valoración de la respuesta al tratamiento.
- La hospitalización es el ingreso oficial en un centro hospitalario y constituye criterios de gravedad de un acontecimiento adverso.
- Un acontecimiento adverso relacionado con el protocolo aparece durante el estudio clínico pero no está relacionado con el producto de investigación, sino con alguno de los pasos o procedimientos realizados.

- **Valoración de la causalidad y severidad de los acontecimientos adversos**

Fue necesario determinar la manera de evaluar los efectos adversos ocurridos durante el procedimiento y seguimiento posterior, para establecer su relación

con el proyecto o con el producto implantado y su severidad o gravedad. Por esto se clasificaron los efectos adversos:

- Según la causalidad:
 - No relacionado: No hay evidencia de ninguna relación causal.
 - Improbable: Existe poca evidencia que sugiera relación causal, por ejemplo debido a que el efecto puede aparecer alejado en el tiempo de la administración del producto o que otros factores pueden haber contribuido a la aparición del acontecimiento.
 - Posible: Existen evidencias que sugieran una posible relación causal, por ejemplo que haya ocurrido en un tiempo razonable después de la administración de las CSM, pero que a pesar de esto exista la influencia de otros factores que puedan contribuir a su aparición.
 - Probable: Existen evidencias que sugieran una relación causal y la influencia de otros factores es poco probable.
 - Seguro: Existen evidencias claras que sugieren una relación causal y se puede descartar una contribución de otros factores.
 - No valorable: No hay evidencia suficiente para poder hacer un juicio clínico sobre una relación causal.

- Según la gravedad:
 - Leve: El efecto es apreciado por el paciente pero no interfiere con su vida habitual.
 - Moderado: El efecto adverso produce molestia e interfiere con la vida habitual del paciente.
 - Grave: El efecto adverso limita severamente la capacidad del paciente de realizar tareas habituales, requiere tratamiento sintomático y pone en peligro directo la vida del paciente.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la población final estaba compuesta por un único grupo experimental de tratamiento compuesto por 11 pacientes (5 hombres y 6 mujeres) con edad media de 44 años (rango comprendido entre 30 y 55 años), todos ellos con signos y síntomas clínicos de afectación lumbar y radicular.

El 54,5% presentaba patología discal que afectaba al espacio L5-S1 y el 45,5% patología que comprometía al espacio L4-L5. En cuanto al grado de severidad radiológica según la clasificación de Pfirrmann que se apreció en la pruebas de RMN, el 54,5% se ajustaba al estadio V y el 44,5% al estadio IV. El riesgo anestésico en estos pacientes según la clasificación de la American Society of Anesthesiologist (ASA) ²⁰⁴ situó a 7 pacientes en ASA 1 y a 4 en ASA 2. Estos datos se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Características de los pacientes en número y porcentaje

		nº	%
Espacio Discal	L4-L5	5	45,5
	L5-S1	6	54,5
Clasificación Pfirrmann	Grado IV	5	45,5
	Grado V	6	54,5
ASA	ASA I	7	63,6
	ASA II	4	36,4

Estos pacientes recibieron durante la intervención quirúrgica de artrodesis vertebral lumbar unisegmentaria, el producto celular autólogo final obtenido en el laboratorio de Producción Celular GMP. El agregado celular fue sometido a

los controles pertinentes (aspecto del cultivo, recuento celular, viabilidad, identificación fenotípica y ensayo de micoplasma) y se suspendió en 5-10 ml de solución estéril de suero fisiológico a razón de 1ml de solución por cada 5-10 millones de CSM, para ser presentado en el quirófano con el objetivo de aplicarlo durante el acto quirúrgico, en 2 jeringas en las que se procedió a la mezcla de la suspensión celular con el soporte compatible de HA y TCP (Conduit™ TCP). Las principales características del producto celular aplicado se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Características del producto celular de CSM tras la expansión

Paciente	Peso (Kg)	Dosis (x10 ⁶ /Kg)	Pase	Días de cultivo	Viabilidad (%)	Cariotipo	Diferenciación in vitro
1	88	1,5	2 ^o	25	95	46,XY [17]	SI
2	82	1,5	1 ^o	18	91,8	46,XX [22]	SI
3	75,3	1,06	1 ^o	18	92	No Metafases	SI
4	75	1,33	1 ^o	26	97	46, XY [21]	SI
5	94	1,5	1 ^o	20	94	46, XY [20]	SI
6	68	1,5	2 ^o	26	97	46, XX [20]	SI
7	98	1,5	1 ^o	21	94	46, XY [20]	SI
8	74	1,5	1 ^o	20	95	No. Metafases	SI
9	51	1,5	1 ^o	21	94	46, XX [15]	SI
10	84	1,5	2 ^o	26	100	46, XX [20]	SI
11	64	1,5	2 ^o	21	95	46, XX [21]	SI

5.1. Análisis estadístico

5.1.1. Métodos estadísticos

Para el estudio y análisis de los datos se empleó el método estadístico *T de Student* y *U de Mann-Witney* para variables cuantitativas y *Chi cuadrado* para variables categóricas o cualitativas. Este análisis se llevó a cabo en el HUS.

5.2. Resultado final

5.2.1. Resultados clínicos y funcionales

Para el estudio de la mejoría clínica en relación tanto con el dolor lumbar como con el dolor radicular se utilizó la escala visual analógica (EVA).

Lo pacientes en cada revisión en consultas puntuaron la escala de dolor según su percepción subjetiva del mismo, rellenando un modelo como el que se muestra en la figura 5.

Figura 5. Modelo de EVA

Escala Visual Analógica
de dolor lumbar (1) y de dolor en miembro inferior (2)

1. Por favor, comenzando por la izquierda de la siguiente barra, trace una línea hacia la derecha indicando la intensidad de su DOLOR DE ESPALDA (DOLOR LUMBAR) en las últimas 4 semanas

Ningún dolor Máximo dolor



2. Ahora, haga igual, indicando la intensidad de su DOLOR EN LA PIERNA (CIÁTICA) en las últimas 4 semanas.

Ningún dolor Máximo dolor



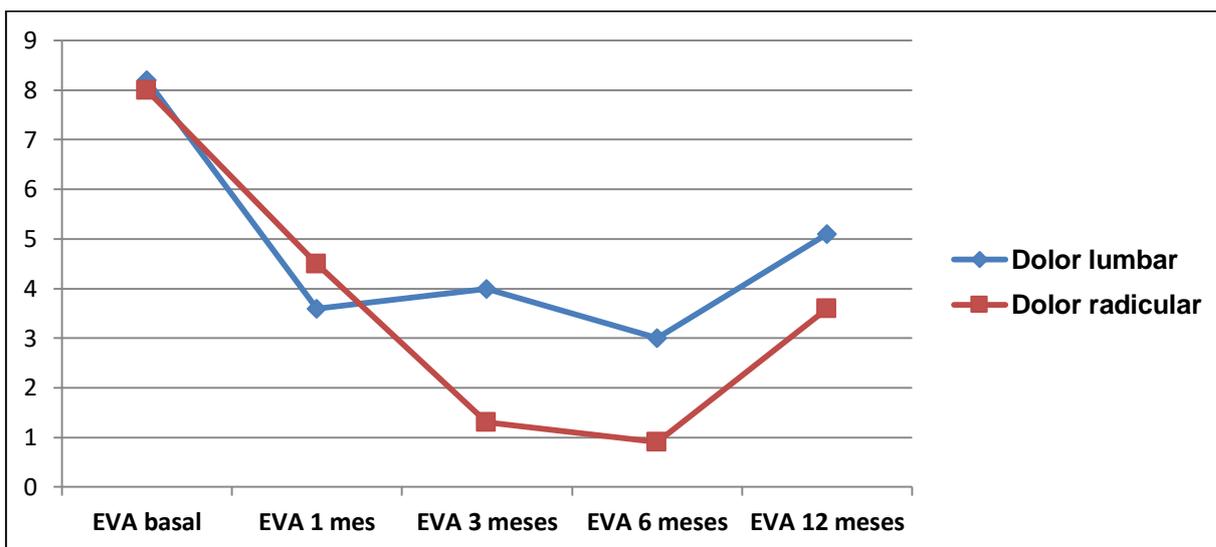
Durante los periodos de valoración (en las visitas médicas al mes, a los 3 meses, a los 6 meses y al año), existieron variaciones de la percepción del dolor, pero comparando los resultados de los valores tras la cirugía de artrodesis vertebral y de CSM (en la visita final a los 12 meses), con los valores preoperatorios (de la valoración pre-tratamiento), se apreció una mejoría clínica de ambos síntomas clínicos, objetivando una mejoría más significativa en lo que se refiere al dolor radicular, ya que se produjo una reducción del dolor de 8 a 3 de puntuación EVA. La mejoría del dolor lumbar se objetivó en una disminución de la puntuación de 8 (valor pretratamiento) a 5 (valor en la visita final). Estos datos se exponen en la tabla 8.

Tabla 8. Puntuación EVA para dolor radicular y dolor lumbar

	Mediana	Mínimo	Máximo
EVA basal, radicular	8	3	10
EVA 1 mes, radicular	4.5	0	8
EVA 3 meses, radicular	1.3	0	6.8
EVA 6 meses, radicular	0.9	0	8.4
EVA 12 meses, radicular	3.6	0	8.6
EVA basal, lumbar	8.2	5	10
EVA 1 mes, lumbar	3.6	1.5	7.8
EVA 3 meses, lumbar	4	4	6.6
EVA 6 meses, lumbar	3	0.3	7.5
EVA 12 meses, lumbar	5.1	0	8.8

Además, en ambos tipos de dolor se produjo la mayor mejoría de los pacientes durante el primer mes postoperatorio como se puede apreciar en la figura 6.

Figura 6. Evolución del dolor lumbar y radicular según la EVA



El estado funcional se recogió mediante el índice de discapacidad de Owesstry (ODI) completado también por los pacientes en todas las visitas postoperatorias. La correlación de los valores porcentuales con el grado de discapacidad, según dicho índice, se puede observar en la tabla 9.

Tabla 9. Índice de discapacidad Owesstry/ ODI

Porcentaje	Limitación funcional	Implicaciones
0-20%	Mínima	No precisa tratamiento. Consejos posturales y ejercicio
20-40%	Moderada	Tratamiento conservador
40-60%	Intensa	Requiere estudio
60-80%	Discapacidad	Requiere intervención
>80%	Máxima	Postrado o simulador

Los sujetos del estudio contestaron preguntas sobre la intensidad del dolor; la aparición del dolor durante actividades básicas de la vida diaria como la bipedestación, la sedestación, las actividades sexuales, los cuidados personales y de higiene, y el grado de afectación del sueño que experimentaban tanto antes como después del tratamiento protagonista de este ensayo clínico.

El análisis ODI, por lo tanto, también mostró una mejoría del estado de discapacidad de los pacientes tras la intervención quirúrgica. Al inicio del tratamiento, como se aprecia en las tabla 10 y 11, en las visitas previas al tratamiento quirúrgico, el valor ODI mostraba una discapacidad severa (ODI basal 56%), mientras que 12 meses después de la cirugía de fijación vertebral con la aplicación de las CSM, la limitación funcional que se obtuvo fue moderada (ODI 31%).

Tabla 10. Valores de ODI en la población a estudio

	Mediana	Mínimo	Máximo
ODI basal	56	12	74
ODI 1 mes	32	20	66
ODI 3 meses	29	8	60
ODI 6 meses,	22	6	60
ODI 12 meses	31	4	62

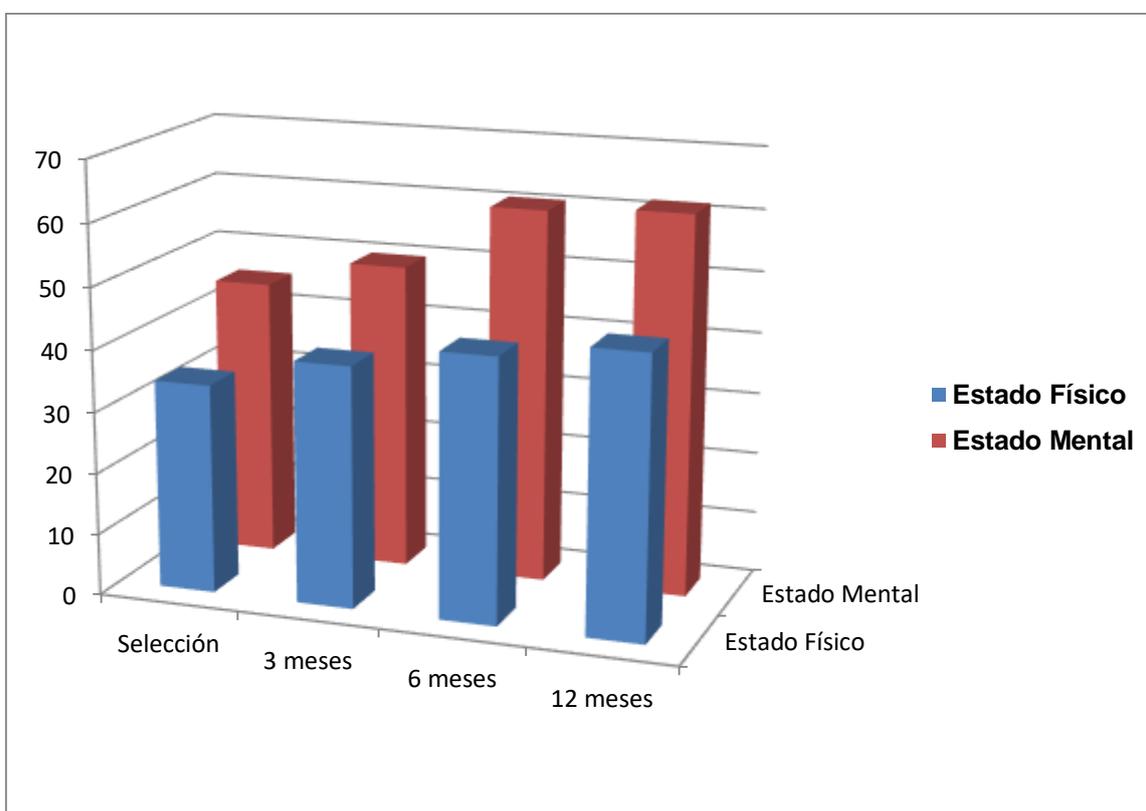
Tabla 11. Correlación entre el valor de ODI y el grado de discapacidad

Valor ODI	Mediana	Incapacidad
Basal	56	Intensa
1 mes	32	Moderada
3 meses	29	Moderada
6 meses	22	Moderada
1 año	31	Moderada

El estado físico y mental, evaluado por el cuestionario SF-36, también mostró una mejora significativa durante el primer año después de la cirugía. Este cuestionario fue rellenado por los sujetos del estudio en todas las visitas, exceptuando la visita del mes postoperatorio, debido a que los datos podían verse alterados por el dolor postquirúrgico y por las falsas expectativas de los pacientes al tratarse de un periodo muy corto de evaluación poco valorable.

En la figura 7 se puede observar como los pacientes partían, en la consulta inicial pre-tratamiento, con una valoración de su estado físico más baja que la valoración que tenían de su estado mental, presentando unos valores de 34,14 en el caso de la valoración física y de 45,28 en el caso de la valoración mental. Al año de la intervención quirúrgica, se observó una mejoría más cuantiosa en el estado psicológico de los pacientes debido a que estos presentaron un incremento de su estado mental en unos 15 puntos (valor final de 61,71), mientras que el incremento del estado físico resultó en aproximadamente 10 puntos (valor final 45,5).

Figura 7. Diagrama de barras del cuestionario SF-36



El paciente número 2, que necesitó además de la estabilización espinal mediante la instrumentación con tornillos, una descompresión de estructuras neurales (en este caso de la raíz L5), recibió analgesia adicional para los episodios dolorosos durante el seguimiento. Dicho paciente, estaba recibiendo tratamiento antidepresivo antes de la cirugía, pero no padecía una enfermedad mental grave.

En cuanto a la incorporación laboral de los pacientes, 10 de los 11 pacientes volvieron a la actividad, todos desempeñando los mismos puestos de trabajo excepto uno que cambió de puesto.

El paciente que no volvió a la actividad laboral tampoco estaba ejerciendo actividad laboral previa a la cirugía, encontrándose en situación de desempleo, y además estaba involucrado en un litigio médico-legal.

5.2.2. Resultados radiológicos

La fusión radiológica sólida se obtuvo con éxito en 9 de los 11 casos al final del estudio, observándose inicio de fusión ósea en el 67% de los pacientes a los 3 meses y el 33% restante a los 6 meses.

La figura 8 proporciona información sobre la aparición radiológica de fusión espinal ósea L5-S1 del sujeto 9 del estudio. En la imagen A, al mes del tratamiento, se observa el producto celular aplicado durante la intervención en el espacio intertransverso, y en las imágenes B, C y D se muestra la formación de puentes óseos en el lecho de fusión hasta constituir una masa ósea sólida a los 12 meses.

Figura 8. Evolución de la Rx AP de la fusión espinal L5-S1 tras una intervención de artrodesis posterolateral.

(A: 1 mes; B: 3 meses; C: 6 meses; D: 12 meses)



Figura 9. Rx AP de la fusión espinal L4-L5 tras una intervención de artrodesis posterolateral, en la que se observan puentes óseos en el espacio intertransverso (asterisco*) 1 año después de la cirugía, Paciente 3.



En ningún caso se detectaron segmentos de movimiento, áreas líticas o pseudoartrosis.

5.2.3. Análisis de eficacia y seguridad del estudio

Estos análisis se aplicaron a todos los pacientes incluidos en el estudio y más específicamente, los análisis de eficacia se realizaron en la población con intención de tratar.

Los datos de eficacia y seguridad de esta alternativa de tratamiento, se recogieron durante un periodo que transcurrió desde la administración del producto celular en el acto quirúrgico, hasta los 7 días posteriores al fin del seguimiento.

Para el estudio de eficacia primaria se incluyeron todos los pacientes que concluyeron el estudio y aquellos que fueron retirados del tratamiento siempre que cumpliesen los criterios de abandono y retirada. El conjunto de datos fue posteriormente definido en el plan de análisis estadístico.

Las evaluaciones relativas a la seguridad dependieron de la incidencia, intensidad y tipo de acontecimientos adversos aparecidos durante el tratamiento, así como de los cambios clínicos significativos evidenciados durante la exploración física de los pacientes en las revisiones en la consulta durante el periodo de seguimiento.

Todos estos datos, así como los de posibles fallecimientos o acontecimientos adversos graves o que requirieran la suspensión del tratamiento, se recogieron en una tabla como se muestra en la figura 10.

Figura 10. Sistema de recogida de los efectos adversos en los CRD

CSM/Fusión		CÓDIGO DE PACIENTE: _____	EFEITOS ADVERSOS
Nº _____	NOMBRE:		Fecha de inicio _ _ _ _ _ _ _
Severidad ⁺	Relación ⁺⁺		Fecha de fin _ _ _ _ _ _ _
Acción tomada ⁺⁺⁺	Se considera un acontecimiento adverso grave? ¹ <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		¿Continúa al final del estudio? <input type="checkbox"/>
Nº _____	NOMBRE:		Fecha de inicio _ _ _ _ _ _ _
Severidad ⁺	Relación ⁺⁺		Fecha de fin _ _ _ _ _ _ _
Acción tomada ⁺⁺⁺	Se considera un acontecimiento adverso grave? ¹ <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		¿Continúa al final del estudio? <input type="checkbox"/>
Nº _____	NOMBRE:		Fecha de inicio _ _ _ _ _ _ _
Severidad ⁺	Relación ⁺⁺		Fecha de fin _ _ _ _ _ _ _
Acción tomada ⁺⁺⁺	Se considera un acontecimiento adverso grave? ¹ <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO		¿Continúa al final del estudio? <input type="checkbox"/>

Para valorar la severidad del acontecimiento adverso, en el apartado del cuadro correspondiente a tal fin, se clasificó el evento como leve (1), moderado (2), intenso (3), potencialmente mortal (4) y muerte o fallecimiento (5). En cuanto a la relación del efecto con el implante de CSM se le atribuyó un valor de 0 cuando no se sospechó relación entre ellos, y un valor de 1 cuando existió una sospecha relacional. En el apartado dispuesto para detallar la acción tomada una vez aparecido el acontecimiento adverso, se marcó con 0, 1, 2, 3 y 4 si la aparición del evento no requirió ninguna acción especial o si requirió la retirada del paciente del ensayo, la necesidad de una medicación concomitante para resolverlo, un tratamiento específico no farmacológico o la hospitalización, respectivamente.

5.2.3.1. Complicaciones y efectos adversos

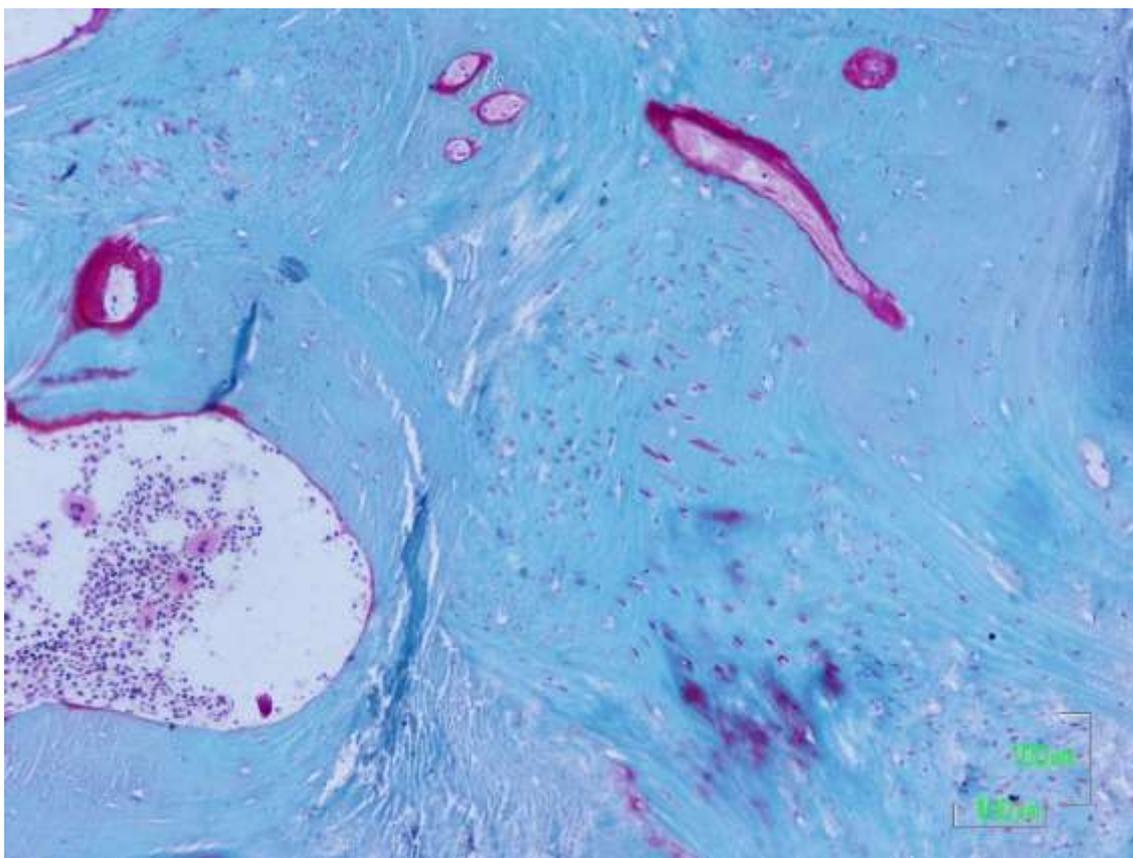
Al final del seguimiento inicial (1 año), así como hasta 5 años después, no se detectaron complicaciones o efectos secundarios adversos relacionados con el procedimiento, incluyendo los más comunes en relación con los sustitutos formadores de hueso como son la osificación heterotópica, las infecciones o los tumores atribuibles al tratamiento con CSM en especies animales y humanos.

Sólo hay que destacar que un paciente precisó ingreso por dolor, y otro presentó fiebre posoperatoria sin complicaciones, que respondió a tratamiento oral sin requerir ingreso hospitalario.

El paciente número 5, cuatro años después de haber completado el seguimiento, consultó por dolor lumbar intenso de naturaleza mecánica. Se realizó una exhaustiva exploración física siendo el examen neurológico completamente normal. La imagen a través de estudios radiológicos mediante Rx simple lumbar y RMN confirmó la existencia de una discopatía del disco adyacente. Se pautó tratamiento médico y fisioterápico y en ausencia de respuesta al tratamiento conservador, se realizó una cirugía de fusión espinal con extensión al nivel adyacente. Se evidenció durante el procedimiento la existencia de masa ósea de fusión posterolateral conseguida en la cirugía inicial. Se recogió una muestra de ambos lados intertransversos y se realizó un estudio histológico de la misma. Los hallazgos fueron similares en ambos lados, mostrando la formación de tejido óseo maduro como se muestra en la figura 11.

Por lo tanto, se puede decir que no aparecieron complicaciones ni efectos adversos graves relacionados con nuestro procedimiento de experimentación.

Figura 11. Imagen histológica del paciente 5 que muestra formación de tejido óseo.



5.2.4. Análisis de variables clínicas y radiológicas a los 10 años

Posteriormente a la realización del estudio se llevó a cabo un seguimiento de los pacientes incluidos en el estudio a los 5 años y a los 10 años.

Todos los pacientes fueron citados de manera presencial para la realización de una exhaustiva exploración física y de una prueba radiológica consistente en una radiografía simple de la zona intervenida. Como en anteriores ocasiones, se evaluó el dolor lumbar y radicular mediante la escala EVA, el grado de discapacidad funcional mediante la puntuación Owestry y la calidad de vida mediante el cuestionario SF-36; recogiendo además la aparición de posibles complicaciones y comorbilidades.

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente, las variables numéricas siguieron una distribución normal (prueba de Sha-apiro-Wilk), para el análisis comparativo de las variables cuantitativas se usó el test de T-student para muestras emparejadas, y el test Anova para la comparación de todos los grupos experimentales.

En cuanto a la valoración clínica los parámetros a los 10 años en comparación con los valores previos a la intervención mejoraron de manera significativa, refiriéndose al dolor lumbar ($p= 0,026$), al dolor radicular ($p= 0,046$), a la discapacidad funcional ($p= 0,015$) y a la calidad de vida ($p= 0,026$). Se consiguió la fusión radiológica en todos los pacientes, sin la aparición de complicaciones como aflojamiento de los tornillos, pseudoartrosis o inestabilidades. En relación a la aparición de efectos adversos graves como infecciones locales, osificaciones heterotópicas o aparición de tumores, a lo largo de los 10 años, no se dieron dichas eventualidades en ninguno de los pacientes tratados con CSM.

Por lo tanto, se puede concluir que este prodecimiento es seguro y arroja beneficios clínicos, radiológicos y de funcionalidad a largo plazo, que deberán completarse con estudios en ensayos más amplios de fase II o III.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 *Terapia celular en fusión espinal*

El desarrollo de la terapia celular aplicada a patologías de la columna vertebral se ha centrado en dos objetivos claros: el tratamiento de la discopatía degenerativa discal mediante la aplicación de células progenitoras en el espacio intervertebral por un lado, y por otro lado, en el uso de dichas células para conseguir una fusión espinal sólida en aquellos procedimientos que requieran de la realización de una artrodesis vertebral²⁰⁵.

La patología degenerativa discal, hoy en día es una de las patologías más prevalentes de los países industrializados. Se calcula que el 80% de la población mundial consulta al menos una vez en la vida a su médico de atención primaria por episodios de dolor lumbar relacionados con el deterioro discal.

Esta dolencia ocasiona unas tasas elevadas de dolor (en su mayoría dolor lumbar y radicular), con una prevalencia del dolor lumbar del 56% aproximadamente, dentro de la etiología del dolor crónico, lo que le lleva a ser una de las causas actuales más comunes de discapacidad²⁰⁶.

Los datos anteriores, junto con la mayor presencia de esta patología en sujetos de edad media que se encuentran en edad laboral, conlleva un importante problema social que se deriva en grandes costes socioeconómicos y una gran pérdida de la calidad de vida de la población²⁰⁷.

El tratamiento quirúrgico de la DDD se indica si no hay respuesta ante el tratamiento conservador y consiste en obtener la fusión intervertebral para reducir la inestabilidad clínica, mecánica y radiológica vertebral *de White y Panjab*²⁰⁸ con el objetivo de aliviar la clínica dolorosa.

Actualmente, la fusión espinal es uno de los procedimientos quirúrgicos más utilizados en el tratamiento de las enfermedades de la columna vertebral^{209, 210} y el abordaje y la fusión posterolateral siguen siendo el “gold standard” cuando se trata de la patología degenerativa discal.

6.2. Injerto óseo para regeneración tisular

Para obtener la fusión posterolateral es necesaria la utilización de material de instrumentación basado en la colocación de tornillos pediculares y barras conectoras, y el aporte de injerto óseo en el espacio intertransverso (que es el lecho de fusión), para conseguir una fijación sólida. El uso de los tornillos pediculares ha demostrado que mejora las tasas de fusión²¹¹.

El injerto óseo necesario puede obtenerse de varias fuentes, como se ha mencionado en la introducción, pero el injerto preferido y que constituye el patrón oro en la mayoría de intervenciones quirúrgicas, y más concretamente en las intervenciones de fusión espinal, es el injerto óseo autólogo (ya sea de la cresta ilíaca⁴¹ o extraído del sitio quirúrgico) ya que presenta una serie de propiedades y ventajas importantes como su capacidad osteogénica, osteoinductora y osteoconductora, la buena integración en el propio tejido del huésped y su rápida capacidad de revascularización.

Clásicamente, los trabajos sobre regeneración ósea se basaban en lograr obtener tejido óseo procedente de auto-aloinjerto óseo de donantes humanos, siendo el más comúnmente utilizado el injerto de cresta iliaca.

Sin embargo, el injerto de cresta ilíaca autóloga se asocia con dolor local y otras complicaciones ya detalladas previamente^{42, 43}, y el injerto recuperado localmente en el propio acto quirúrgico (por ejemplo de las apófisis espinosas o de las articulaciones facetarías) puede ser insuficiente para obtener la fusión del sitio de la lesión.

Estos inconvenientes han propiciado la aparición de técnicas alternativas a la utilización del injerto óseo autólogo, como son el uso de sustitutos óseos naturales o sintéticos y de sustancias con capacidad osteoconductora, osteoinductora u osteogénica²¹².

En esta línea, por lo tanto, es importante desarrollar opciones terapéuticas que reduzcan los efectos adversos del autoinjerto de cresta iliaca y que produzcan una fusión ósea sólida evitando de esta manera la necesidad de reintervenciones; y es por esto que surge el estudio y la aplicación de la ingeniería tisular y la terapia celular para el tratamiento de estas patologías.

6.3. Sustitutos en la regeneración ósea para fusión espinal

En la ingeniería tisular uno de los elementos imprescindibles es el empleo de un armazón, que aporte soporte a las células y logre reproducir una matriz similar a la matriz nativa. Los materiales que formen este armazón deben lograr una correcta integración de las células mediante una porosidad adecuada, favoreciendo su diferenciación y permitiendo una nutrición adecuada de las mismas²¹³ y un reemplazamiento adecuado de los tejidos, siendo biocompatibles y no citotóxicos.

Aparecieron así, los sustitutos óseos, que son materiales de origen natural o sintético que se utilizan como alternativa al injerto óseo, pero que generalmente carecen de actividad osteogénica y oteoinductora, presentando sólo capacidad mecánica, de soporte u osteoconductora.

Los fosfatos de calcio (TCP e HA), son los sustitutos más estudiados y empleados en la actualidad, pueden ser preparados como cerámicas y forman osteoide al contactar con el hueso , mineralizándose y reabsorbiéndose posteriormente, para sustituirse finalmente por tejido óseo.

En nuestro estudio el sustituto utilizado como transportador celular fue el TCP- β sintético (gránulos de TCP , como Conduit TCP) ya que se había estudiado con anterioridad en modelos animales que el TCP posee una tasa de reabsorción rápida y una gran osteoconductividad, y comparado con el uso de HA, se ha demostrado que los gránulos de TCP presentan una mejor reabsorción, debido a que las cerámicas a base de HA producen crecimiento óseo en una superficie porosa en lugar de una verdadera regeneración ósea y se reabsorben más lentamente^{214, 215}.

Pero también se han estudiado otros materiales de naturaleza metálica que pudiesen funcionar como soporte de células precursoras. *Bruder*²¹⁵ inicialmente afirmó que la carga de dispositivos metálicos con CSM mejoraba la reconstrucción ósea en comparación con los dispositivos no celulares. Y posteriormente se demostró que tanto el titanio como el tantalio tenían la capacidad de transportar CSM en sus superficies mejorando la viabilidad

celular y manteniendo todas sus propiedades biológicas tras demostrar la capacidad de expansión in vitro de las células stem sobre estos metales²¹⁶.

Debido a que los biomateriales descritos sólo poseen capacidad de soporte, como ya se ha comentado, estos sustitutos necesitan aplicarse junto a otros elementos, como son las células progenitoras, que sí presentan capacidades neoformadoras y tienen un efecto regenerativo comparable al de los injertos óseos autólogos^{217, 218}.

Estos biomateriales combinados con células osteoprogenitoras, proteínas o péptidos bioactivos y proteínas morfogenéticas óseas (BMP) mejoran la formación ósea porque producen una osteoinducción diseñada²¹⁹.

Las BMP, pertenecientes a la familia de los factores TGF- β , son factores de crecimiento que funcionan como moléculas osteoinductoras, que en el periodo postnatal tienen una capacidad formadora de hueso similar a la del injerto óseo autólogo de MO^{195, 196}.

Las más usadas en cirugía de fusión espinal son las aprobadas por la Agencia Europea del medicamento (BMP-2 y BMP-7), pero se han relacionado con la aparición de determinados efectos indeseables de entre los que destacan la producción de una respuesta inflamatoria variable que puede ocasionar edema en tejidos circundantes, una respuesta neoformadora ósea de distinta magnitud que puede favorecer la formación de hueso ectópico en zonas cercanas con la consiguiente posibilidad de aparición de clínica neurológica por posible compresión nerviosa y un dudoso efecto precanceroso. Se estudiaron informes de casos, series de casos y metaanálisis en relación con el uso de BMP en fusión espinal, concluyendo que el riesgo de cáncer postoperatorio asociado al uso de BMP en fusión espinal es bajo y que no hay una asociación clara causal entre ellos²²⁰.

Según las investigaciones de *Kern Singh*²²¹ las tasas de complicaciones de las BMP diferían para cada entorno de fusión. En la columna cervical anterior, las complicaciones oscilaron entre 0,66% a 20,1%; en la columna cervical posterior, las tasas de complicaciones variaron de 3,5% a 14,6%; en la

columna lumbar anterior, de 2% a 7.3%; en la práctica TLIF de 1,5% a 21,8%; y en PLF de 1.4% a 8.2%.

La eyaculación retrógrada es una complicación conocida en la vía de abordaje anterior y la FDA documentó más eyaculación retrógrada en la utilización de rhBMP-2 posiblemente en relación con la formación de hueso ectópico y con la inflamación local asociada a esta BMP. En el abordaje cervical anterior, el uso de rhBMP-2 fue asociado con una disminución de la infección y de la tasa de pseudoartrosis; pero se observó una tendencia hacia el aumento de edema en el cuello, disfagia y disnea con su utilización. Por último la utilización de BMP en abordajes PLIF y TLIF aumenta la formación ósea ectópica y las complicaciones neurológicas.

Además presentan los inconvenientes de que son caras y de que al tratarse de un producto de elevado precio se han visto envueltas en problemas de uso fuera de la legalidad por parte de algunas empresas que han ocultado incluso sus efectos adversos^{220, 221}.

Debido a lo expuesto el uso de BMPs en la actualidad en cirugía del raquis, queda reservado a casos complejos en los que la utilización del injerto óseo autólogo o heterólogo no sea viable.

6.4. Terapia celular en la regeneración ósea

Otro de los elementos imprescindibles en la ingeniería tisular es el empleo de células formadoras de tejido, que aplicadas junto a los sustitutos osteoconductores y osteoinductores que acabamos de mencionar, aportan la capacidad de producir tejido óseo mediante su función de osteogénesis.

En las últimas décadas, se han llevado a cabo numerosos estudios de terapia celular para comprobar la eficacia de las células madre progenitoras en el tratamiento de numerosas entidades. En el campo de la cirugía ortopédica y traumatológica las CSM han centrado toda la atención, al tratarse de células que poseen la capacidad de diferenciarse en diferentes estirpes celulares entre ellas en células mesodérmicas, como los linajes de células óseas o

cartilaginosas^{222, 223}. Algunos de los estudios realizados demuestran que el uso de CSM sin diferenciar en un modelo de xenotransplante para el tratamiento de un defecto osteocondral grande en animales de experimentación (en este caso conejos), integradas en un hidrogel proteico basado en ELR (elastina recombinante) conduce a la regeneración exitosa del cartílago hialino y puede ser aplicado en técnicas artroscópicas para el relleno de dichos defectos osteocondrales²²³.

Las células mesenquimales (CSM) que fueron descritas inicialmente por *Friedenstein*¹¹⁹, tienen algunas características fundamentales que es necesario probar para considerar que los productos celulares cumplen con los criterios de definición de dichas células CSM¹⁴¹.

- Fuente de obtención de CSM para fusión espinal

Su fuente de obtención es muy variada, como se ha hecho referencia en la introducción, pero la mayoría de los estudios se han centrado en la obtención de dichas células de la MO procedente de la cresta iliaca de los pacientes.

Aunque la cresta iliaca siguió siendo la fuente de MO estándar, sus limitaciones ya mencionadas, llevaron a investigar otras fuentes de obtención celular como la extracción de MO del cuerpo vertebral. En los últimos años se ha investigado mucho acerca de las características de las CSM basadas en la fuente de origen²²⁴.

Técnicamente, la extracción del cuerpo vertebral no supondría un tiempo extra, ya que los pedículos vertebrales se abordan como parte del procedimiento de fijación vertebral durante la colocación de los tornillos pediculares, pero algunos estudios previos además de resaltar la importancia y el potencial clínico de las células obtenidas del cuerpo vertebral, muestran ciertas debilidades relacionadas principalmente con el diseño del estudio, el número limitado de pacientes y el método de aislamiento celular utilizado²²⁵.

Con estos antecedentes *Fragkakis EM*²²⁶, desarrolló un estudio en el que determinó el recuento celular y la capacidad de diferenciación de las CSM

obtenidas de MO del cuerpo vertebral comparándolo con las obtenidas de la MO de cresta iliaca de los pacientes, con el objetivo de valorar su uso como fuente de células progenitoras en la fusión espinal. Sus datos sugirieron una diferenciación osteogénica de las CSM superior en el primer grupo, demostrando una mayor expresión y actividad de fosfatasa alcalina que las extraídas de cresta iliaca, y un mayor rendimiento de las mismas si eran procesadas con lisis de glóbulos rojos en comparación a la centrifugación en gradiente.

A pesar de estos hallazgos y de que la MO del cuerpo vertebral es una fuente conocida para el trasplante de células madre hematopoyéticas^{227, 228}, su uso en la fusión espinal como fuente de CSM, aún no se considera un procedimiento de rutina, aún habiéndose demostrado sus grandes beneficios combinados con andamios de TCP- β .

- Función inmunomoduladora de las CSM

Además, estas células tienen una importante capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria, que es muy atractiva para el tratamiento de algunas enfermedades^{168, 229, 230} ejerciendo un efecto antiinflamatorio en el sitio de la lesión.

Para demostrar dicho efecto se diseñaron estudios que compararon las CSM procedentes de MO y las CSM procedentes de tejido adiposo, fueron cultivadas y expandidas in vitro y tras la caracterización inmunofenotípica de las mismas, se transformaron en distintas líneas celulares. Las CSM mostraron una menor capacidad inhibitoria sobre la proliferación de células inmunes cuando fueron expandidas en lisado plaquetario humano, pero pudo observarse una tendencia a un mayor efecto inhibitorio de las CSM obtenidas de MO, sobre la actividad citotóxica de las células NK en comparación con las CSM de tejido adiposo. En cuanto a la supresión de la respuesta inmune de los linfocitos T, ambos grupos de CSM presentaron un resultado similar y además ambos grupos de CSM inducen un cambio en la secreción de citoquinas inflamatorias o antiinflamatorias²²⁹.

La capacidad de las CSM de suprimir la función de las células T ha provocado beneficios en cuanto a poder utilizarlas para uso terapéutico con el fin de evitar la enfermedad de injerto contra huésped (EICH)²³⁰.

Pero esta capacidad podría alterar la función de injerto contra tumor (injerto contra leucemia) que poseen las células NK. Se obtuvieron unos resultados en los que las CSM procedentes de MO como de tejido adiposo inhibieron de una manera similar la función de las células NK en la EICH, pero solo las procedentes de la MO actuaron inhibiendo la actividad citotóxica de dichas células, lo que sugirió que las CSM procedentes del tejido adiposo podrían preservar aún más la actividad de las células NK y, por lo tanto, favorecer la función antitumoral.

- Liberación de factores de crecimiento por parte de las CSM

Se ha demostrado también, que estas células liberan a las células circundantes muchos factores de crecimiento y exosomas que pueden favorecer la regeneración ósea y la osteogénesis²³¹. Esto puede incluso ser mejorado por la presencia de andamios de TCP o HA, ya que la combinación de estas células CSM con estas cerámicas porosas permite la localización de las células en el sitio específico donde se quiere que ejerzan su acción²³².

Por lo tanto, los elementos básicos de esta novedosa práctica son disponer de células con capacidad de diferenciación y con unas características adecuadas para poder sintetizar la matriz del tejido que se pretende obtener, un soporte o matriz tridimensional adecuada con características osteoconductoras y por último sustancias estimuladoras de las células o un microambiente adecuado para acogerlas. La combinación de todos estos elementos es el fundamento para el tratamiento de defectos tisulares como son los defectos óseos y deben ser valorados en modelos animales antes de valorarse en humanos.

En la patología degenerativa del raquis lumbar, la terapia celular mediante la implantación de CSM se ha propuesto como una alternativa atractiva para promover la fusión ósea. Existe un gran número de publicaciones que informan sobre los resultados del uso de dichas células con este fin, en medianos y

grandes grupos de modelos animales²³³ y que demuestran la efectividad de las CSM para conseguir la fusión espinal mediante su diferenciación a tejido óseo¹⁶⁶.

6.4.1. Modelo animal

Se han llevado a cabo diversas investigaciones en relación a la capacidad de las CSM de diferenciarse en células de estirpe mesodérmica (entre ellas los osteoblastos), el objetivo era obtener tejido óseo in vitro y trasladar los hallazgos a ensayos in vivo con animales y posteriormente realizarlos en humanos. En el campo de la traumatología y ortopedia se ha aplicado la ingeniería tisular para rellenar defectos osteoarticulares y condrales o tratar patología discal en modelos animales.

Tras la realización de numerosos estudios in vitro, se continuó investigando sobre la capacidad de las células mesenquimales estromales de transformarse in vivo en células osteoblásticas y permitir la regeneración ósea en animales.

La elección del modelo animal resulta difícil debido a que cada especie presenta una serie de ventajas e inconvenientes distintas. Inicialmente, se comenzó por utilizar modelos de roedores que constituyen un paso intermedio entre estudios in vitro y modelos de animales más grandes, y eran muy eficaces para estudiar comportamientos moleculares básicos y nuevas matrices y transportadores o carriers. Posteriormente, se aplicaron estos estudios en modelos de conejos, dichos modelos se usan comúnmente en aproximadamente el 35 % de las investigaciones musculoesqueléticas de la investigación médica, debido a su tamaño y facilidad de manejo²³⁴ con el inconveniente de que su biomecánica no es muy similar a la de los humanos. Los modelos caninos serían los más similares a los humanos pero no son muy utilizados porque conllevan muchas connotaciones éticas.

a) Modelo animal en defectos óseos

Así pues, fueron puestos en marcha por ejemplo, estudios que utilizaron CSM en combinación con TCP- β para demostrar la regeneración ósea en defectos óseos de fémur producidos en ratas. Los resultados iniciales no fueron muy alentadores a pesar de que las CSM se expandieron en todas las muestras ya que no se pudieron demostrar diferencias significativas en el comportamiento biológico del sustituto mezclado con CSM, con respecto al sustituto aislado²³⁵.

En otras publicaciones se mostró que la actividad regenerativa de las células madre en el fémur del mismo modelo animal (ratas) es significativa cuando se utilizan asociaciones con factores de crecimiento y plasma rico en plaquetas²³⁶.

Utilizar las CSM en ensayos clínicos puede plantear un problema por la necesidad de utilizar para la expansión in vitro de dichas células, suero de origen animal de ternera fetal, por el hipotético riesgo de contaminación por priones u otros microorganismos. Una alternativa sería el uso de suero autólogo pero no siempre se obtiene la cantidad necesaria y además requiere de una plasmaféresis. Así en nuestro trabajo de investigación utilizamos extracto plaquetario, que además fue publicado por varios grupos de trabajo destacando el grupo liderado por Carrancio²⁰⁰ y cols. que demostró un mayor crecimiento de las CSM con dicho extracto.

Como es conocido, las CSM tienen fuertes propiedades reguladoras inmunes que están presentes en las células de diferentes especies animales, aunque con distintos mecanismos, exhibiendo propiedades de inmunosupresión e inmunoprivilegio. Debido a esto, las CSM pueden suprimir las reacciones inmunes in vitro e in vivo en un complejo de histocompatibilidad de manera independiente^{161, 237}.

Existen numerosos trabajos en los que se han realizado trasplantes xenogénicos de CSM humanas en animales inmunosuprimidos²³⁸ y es por esto que ha sido necesario realizar trabajos posteriores de xenotransplante en modelos animales inmunocompetentes para poder después extrapolar los resultados a los humanos.

Un ejemplo de ello fue el estudio llevado a cabo por el equipo de ingeniería Tisular del departamento de Hematología de nuestro centro²³⁹, que pretendió demostrar la capacidad de las CSM para regenerar tejido óseo en animales de experimentación, así como, la capacidad de las mismas para expandirse in vitro y eludir la respuesta del sistema inmune. Se utilizaron conejos New Zealand no inmunodeprimidos a los que se les provocó un defecto óseo crítico del cóndilo femoral, y a su vez se estudió las propiedades del TCP-beta como sistema de andamiaje de estas células. Se demostró que las CSM humanas son capaces de sobrevivir, diferenciarse y contribuir a la reparación de la lesión regenerando hueso y que también son capaces de facilitar la integración del carrier de TCP, todo ello, en animales inmunocompetentes, en un porcentaje cercano al 100%²³⁹.

Este estudio, fue la antesala a la realización del presente ensayo ya que nuestro estudio constituyó una parte final de una línea de investigación iniciada con la caracterización in vitro de las interacciones de las CSM con el TCP y su evaluación preclínica en el modelo de regeneración ósea animal practicado en conejos que se acaba de citar.

b) Modelo animal en fusión espinal

En esta misma línea, pero más concretamente en el estudio de la regeneración ósea para conseguir la fusión espinal, *Nakjima*¹⁶⁶ había demostrado la efectividad de las CSM para conseguir fusión espinal mediante su diferenciación a tejido óseo en modelos animales de conejos, y *G. Cinotti*²⁴⁰ demostró la capacidad de las CSM cultivadas sobre cerámicas porosas para producir hueso in vitro durante el procedimiento de artrodesis vertebral L4-L5 en conejos New Zealand sin la aparición de reacción de rechazo o reacción de histocompatibilidad.

*Hsu*²⁴¹, más tarde, estudió los resultados en términos de fusión radiológica de la combinación de CSM derivadas de tejido adiposo junto con la BMP-2 (proteína morfogenética ósea) tras su aplicación en el lecho de fusión en el procedimiento de artrodesis posterolateral de un nivel en ratas, llegando a la

conclusión que el potencial osteogénico de las CSM por sí solo (sin BMPs) no era capaz de conseguir fusión vertebral y que es importante estudiar el carrier más adecuado para este propósito.

Otro estudio con esta misma hipótesis, fue desarrollado por *Tsa-Sheng Fuet*²⁴² en este caso utilizando conejos como animal de experimentación, concluyendo que dosis celulares de CSM in vitro junto a proteína morfogenética ósea recombinante (rhBMP-2) tienen más potencial osteoinductor que las CSM no combinadas para producir fusión espinal.

6.4.2. Aplicación de terapia celular para fusión espinal en humanos

En cuanto a la extrapolación de estos resultados a seres humanos, *Eastlack*²⁴³ publicó un estudio de 182 pacientes en el que se consiguió fusión espinal radiológica entre un 90 y un 95%, así como buenos resultados en cuanto a satisfacción del paciente, al utilizar Osteocel plus (una matriz ósea de aloinjerto celular que contiene CSM) en el procedimiento de discectomía cervical anterior y fusión.

Aunque los datos preclínicos sobre diferentes modelos animales de fusión espinal han sido ampliamente mostrados, existen pocos ensayos clínicos prospectivos que hayan evaluado el papel de las CSM, expandidas en una instalación de GMP y publicados de acuerdo con los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)²³³.

En nuestro estudio, hemos obtenido células mesenquimales humanas de la MO de cresta iliaca de pacientes, que fueron sometidos a este proceso de extracción 4 semanas antes de la intervención quirúrgica de artrodesis vertebral. Esta fuente de obtención es fácil y consigue CSM de una manera abundante. Las células fueron aisladas, cultivadas y expandidas de una manera sencilla, comprobándose el alto grado de diferenciación en estirpe ósea^{148, 200}.

Con respecto a los *efectos adversos* relacionados con el uso de estas células CSM, dichos efectos registrados en otras publicaciones científicas son escasos (no se han dado casos de toxicidad local ni general, ni efectos secundarios de su utilización), pero cabe destacar entre las posibles reacciones adversas:

- a) Posibilidad de desarrollo de tumores: la transformación tumoral parece requerir periodos de cultivo *in vitro* extremadamente largos, superiores a 4 meses²⁴⁴. Para evitar este efecto se realizó un tiempo de cultivo de 3-5 semanas para obtener la dosis celular requerida. Además se ha comprobado tras diversos estudios, que en un modelo de conejo, el uso de CSM mezcladas con el “carrier” aplicadas sobre una lesión ósea crítica no produce ningún efecto secundario tras su administración^{239, 245}.
- b) Fracaso de consecución del objetivo terapéutico, ha sido descrito en algunos estudios previos^{246, 247}.
- c) Existencia de calcificación ectópica, muy poco probable debido a la implantación de las células localmente, en el lecho de fusión.

En nuestro ensayo clínico no apareció ninguno de esos potenciales efectos adversos en todo el proceso de seguimiento hasta los 5 años postoperatorios.

6.4.3. Derivados de las CSM: Alternativas terapéuticas

Con el fin de conseguir la formación tisular y basándose en las características y propiedades de las CSM, han surgido productos alogénicos derivados de estas células para el uso clínico. Estos productos son variables con respecto a la concentración total de CSM y respecto a su eficacia en relación con la edad del paciente, su vida útil y su viabilidad celular. Algunos de estos productos tienen tasas de fusión muy similares a las del autoinjerto de cresta iliaca, como por ejemplo el uso de Osteocel (Nuvasive, San Diego California) que se ha estudiado en cirugías de fusión espinal posterolateral alcanzando tasas de fusión de aproximadamente un 87,7% en comparación con el 94,7% de aloinjerto²⁴⁸.

En los últimos años se han desarrollado estudios en los que se utilizan otros tipos de células diferentes a la CSM, como las que componen la fracción vascular estromal (FVS). Estas células a diferencia de las CSM, no están incluidas en los ATMP (productos medicinales de terapia avanzada)²⁴⁹. La fracción vascular estromal está compuesta por una mezcla de diferentes tipos celulares, incluyendo algunas células pro-inflamatorias, como los monocitos.

En la misma línea de investigación, algunos otros grupos han usado aspirado de médula ósea para conseguir fusión espinal posterolateral²⁵⁰. El aspirado o concentrado de médula ósea se utiliza en varias combinaciones tales como autoinjerto, matriz ósea desmineralizada humana y biomateriales²⁵¹.

Se ha demostrado que el aspirado de MO tiene efectos beneficiosos en la fusión espinal, y además el proceso para obtenerla es simple y barato²⁵²⁻²⁵⁵, y contiene células progenitoras (en su mayoría de origen hematopoyético) pero su cantidad y distribución pueden ser variables^{250, 251, 256}.

La matriz ósea desmineralizada posee tantos efectos beneficiosos, debido a que es un aloinjerto de hueso cortical que se trata con ácido para eliminar sus componentes minerales y mantener su estructura colágena, las proteínas no colágenas y los factores de crecimiento¹⁷⁴, reproduciendo la arquitectura tridimensional del hueso y guiando así la invasión, el crecimiento y la diferenciación de la célula huésped. *Grafton*²⁵⁷ estudió su uso inicialmente, y posteriormente *Caminssa y cols*²⁵⁷, realizaron un ensayo prospectivo multicéntrico que demostró la eficacia de la DBM aplicada junto a autoinjerto local y comparándolo con la aplicación de autoinjerto de cresta iliaca en solitario, en procedimientos de fusión espinal. A los dos años las tasas de fusión para 120 pacientes fueron similares, siendo 52% en el primer grupo y 54% en el segundo grupo.

Tras la realización de otras investigaciones, se han obtenido datos que respaldan el uso de la matriz ósea desmineralizada como un “expansor” del autoinjerto en fusiones espinales posterolaterales instrumentadas de 1 o 2 niveles.

Estas estrategias, comparadas con los productos ATMP, pueden no proporcionar un producto celular uniforme definido por la ISCT con una

caracterización y una proporción exacta de las células administradas, a diferencia de lo que ocurre con las CSM¹⁴¹, por lo que no se consideran medicamentos regulados por las Agencia Nacional del Medicamento.

6.5. Comparación con el presente estudio

Como ya se ha comentado, según refleja la literatura, se han practicado algunos estudios de terapia celular en animales para conseguir fusión espinal, siendo pocos los realizados en humanos. Así, los reguladores españoles obligaron a comenzar a probar este producto en un pequeño ensayo prospectivo de fase I/II con un número máximo de 15 pacientes.

Nuestro estudio se diseñó con dichas características y en comparación con trabajos anteriores, posee algunas características diferenciadas²³³.

En primer lugar emplea adecuadamente las CSM según las características definidas por la ISCT, y es desarrollado en una instalación GMP con todas las aprobaciones de los organismos reguladores correspondientes, como un ATMP.

El producto compuesto por CSM obtenidas de aspirado de MO es homogéneo y reproducible. La obtención celular resulta sencilla y los pacientes presentaron una gran aceptación en el momento de dar la autorización para la extracción de células al tratarse de un procedimiento sencillo, indoloro y sin complicaciones.

Nuestro ensayo, comparado con otros estudios o ensayos analizados retrospectivamente, es un estudio prospectivo en el que se mezclaron CSM autólogas derivadas de la propia MO de los pacientes con TCP- β , que se utilizaron como injerto en intervenciones de artrodesis posterolateral lumbar para el tratamiento de la enfermedad degenerativa discal de un solo nivel, que no hubiese respondido al tratamiento conservador.

El fosfato tricálcico ya empleado en otros estudios^{258, 259} constituye un sustituto óseo fácil de aplicar y posee unas características físicas y químicas adecuadas que lo convierten en el carrier más utilizado y más estudiado en este tipo de

ensayos. Fue el carrier elegido para nuestro estudio, ya que era el sustituto óseo por defecto utilizado en ese momento.

Nuestro estudio posee algunas limitaciones, de entre las que destaca el bajo número de pacientes incluidos, y que además no es posible hacer un estudio histológico de la masa de fusión formada, como se realiza en animales de experimentación, para poder demostrar la morfología de las CSM administradas y su disposición similar a la del tejido óseo; salvo en el caso del paciente 5 que al requerir una segunda intervención por discopatía del disco adyacente, se pudo obtener la muestra durante la segunda cirugía para realizarle el análisis histológico.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Este estudio ha demostrado la seguridad de este procedimiento alternativo al injerto óseo, en el tratamiento de la discopatía lumbar mediante la aplicación del producto de experimentación durante el procedimiento de fusión espinal posterolateral en humanos, debido a que no se objetivaron complicaciones ni efectos adversos graves en la población de estudio.
2. Esta técnica ha demostrado poseer factibilidad y viabilidad para su realización en un hospital universitario durante la práctica clínica habitual, ya que su metodología es aplicable y reproducible en centros con similares características.
3. Se ha realizado el seguimiento durante el tiempo más largo publicado hasta la fecha (10 años para todos los pacientes), afianzando más aún el logro de estos objetivos primarios de ensayo clínico en fase I-II (seguridad y factibilidad).
4. Destaca como hallazgo más importante la ausencia de efectos adversos o complicaciones graves relacionadas con dicho procedimiento.
5. La situación clínica de todos los pacientes mejoró tanto para el dolor lumbar como para el dolor radicular, así como la reanudación de la actividad laboral fue posible en todos ellos, exceptuando a uno que precisamente se encontraba en situación de desempleo antes de iniciar este ensayo clínico.
6. En cuanto a los resultados radiológicos se logró una tasa de fusión elevada, del 81 %, al final del seguimiento.

En resumen, nuestros resultados muestran que la terapia celular con CSM autólogas en la cirugía de artrodesis vertebral posterolateral para conseguir fusión espinal es un procedimiento seguro, viable y reproducible, al menos en nuestro entorno.

Aunque las conclusiones sobre la eficacia del procedimiento deben tomarse con cautela, los resultados son comparables con los otros enfoques indicados anteriormente. Además, no se han probado diferentes dosis celulares, lo que tendría un impacto en la mejora de estos resultados, pero esto debe evaluarse de forma prospectiva en ensayos futuros.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Charran AK, Tony G, Lalam R, Tyrrell PN, Tins B, Singh J, Eisenstein SM, Balain B, Trivedi JM, Cassar-Pullicino VN. Destructive discovertebral degenerative disease of the lumbar spine. *Skeletal Radiol.* 2012 Sep;41(10):1213-21.
- 2) Muraki S, Oka H, Akunne T, et al: prevalence of radiographic lumbar spondylosis and its association with low back pain in elderly subjects of population-based cohorts: The ROAD study. *Ann Rheum Dis* 2009; 68 (9): 1401-1406.
- 3) Chan D, Song Y, Sham P, Cheung KM. Genetics of disc degeneration. *Eur Spine J.* 2006 Aug;15 Suppl 3:S317-25.
- 4) Setton LA, Chen J. Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration. *J Bone Joint Surg Am.* 2006 Apr;88 Suppl 2:52-7.
- 5) Wang J, Tang T, Yang H, Yao X, Chen L, Liu W, Li T. The expression of Fasligand on normal and stabbed-disc cells in a rabbit model of intervertebral discdegeneration: a possible pathogenesis. *J Neurosurg Spine.* 2007 May;6(5):425-30.
- 6) Bibby SR, Urban JP. Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells. *Eur Spine J.* 2004 Dec;13(8):695-701.
- 7) Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, Muntión S, Hernandez-Campo P, Santamaria C, Carrancio S, Barbado MV, Cruz G, Gutierrez-Cosío S, Herrero C, San Miguel JF, Briñon JG, del Cañizo MC. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects. *Spine (PhilaPa 1976).* 2010 Dec 15;35(26):2259-65.
- 8) Kirkaldy-Willis WH, Wedge JH, Yong-Hing K, Reilly J. Pathology and pathogenesis of lumbar spondylosis and stenosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 1978 Dec;3(4):319-28. doi: 10.1097/00007632-197812000-00004. PMID: 741238.

- 9) Hammouri QM, Haims AH, Simpson AK, Alqaqa A, Grauer JN. The utility of dynamic flexion-extension radiographs in the initial evaluation of the degenerative lumbar spine. *Spine (Phila Pa 1976)*2007;32(21):2361-2364.
- 10) Pfirrmann CW, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(17):1873–8.
- 11) Jones A, Clarke A, Freeman BJ, Lam KS, Grevitt MP. The Modic classification: inter- and intraobserver error in clinical practice. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Aug 15;30(16):1867-9.
- 12) Kleinstück F, Dvorak J, Mannion AF. Are "structural abnormalities" on magnetic resonance imaging a contraindication to the successful conservative treatment of chronic nonspecific low back pain? *Spine (Phila Pa 1976)*2006;31(19):2250-2257.
- 13) Jarvik JJ, Hollingworth W, Heagerty P, Haynor DR, Deyo RA. The Longitudinal Assessment of Imaging and Disability of the Back (LAIDBack) Study: baseline data. *Spine* 2001;26(10):1158-1166.
- 14) Kuisma M, Karppinen J, Niinimäki J, Ojala R, Haapea M, Heliövaara M, Korpelainen R, Taimela S, Natri A, Tervonen O. Modic changes in endplates of lumbar vertebral: prevalence and association with low back and sciatic pain among middle-aged male workers. *Spine (Phila Pa 1976)*2007;32(10):1116-1122.
- 15) Lee CK, Langrana NA. A review of spinal fusion for degenerative disc disease:need for alternative treatment approach of disc arthroplasty? *Spine J*. 2004 Nov-Dec;4(6 Suppl):173S-176S
- 16) Keller A, Hayden J, Bombardier C, van Tulder M. Effect sizes of non-surgical treatments of non-specific low-back pain. *Eur Spine J*. 2007;16(11):1776-1788.

- 17) Albee FH. Transplantation of a portion of the tibia into the spine for Pott's disease: a preliminary report 1911. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;460:14-6.
- 18) Hibbs RA. An operation for progressive spinal deformities: a preliminary report of three cases from the service of the orthopaedic hospital. 1911. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;460:17-20.
- 19) Campbell WC. An operation for extra articular arthrodesis of the sacroiliac joint. *Surg Gynecol Obstet* 1927;45:218-21.
- 20) Ghormley RK. Low back pain with special reference to the articular facets with present attention of an operative procedure. *JAMA* 1933;101: 1013-15.
- 21) Mercer W. Spondylolisthesis: With a Description of a New Method of Operative Treatment and Notes of Ten Cases. *Edinb Med J.* 1936;43(9):545-572.
- 22) Cleveland M, Bosworth DM, Thompson FR. Pseudarthrosis in the lumbosacral spine. *J Bone Joint Surg Am.* 1948;30A(2):302-312.
- 23) Watkins MB. Posterolateral fusion of the lumbar and lumbosacral spine. *J Bone Joint Surg Am.* 1953 Oct;35-A(4):1014-8.
- 24) Venable CS, Stuck WG. Electrolysis controlling factor in the use of metals in treating fractures. *JAMA* 1939;3 349-54.
- 25) Wilson PD, Straub LR. American Academy of Orthopaedic Surgeons Instructional Course Lecture, vol 9. Ann Arbor 1952.
- 26) King D. Internal fixation of the lumbosacral spine. *Am J Surg* 1944;66:357-63.
- 27) Harrington PR, Dickson JH. Spinal instrumentation in the treatment of severe progressive spondylolisthesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1976;(117):157-63.
- 28) Judet R. Osteosyntheses: Material, techniques, complications, actualités. De chirurgie Orthopedique de L'Hospital Raymond, Vol VII. Masson, Paris, 1970.
- 29) Roy-Camille R. Internal fixation of the lumbar spines. *Clin Orthop* 1986;203:7-15.

- 30) Louis R. Fusion of the lumbar and sacral spine by internal fixation with screw plates. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Feb;(203):18-33.
- 31) Delawi D, Dhert WJ, Castelein RM, Verbout AJ, Oner FC. The incidence of donorsite pain after bone graft harvesting from the posterior iliac crest may be overestimated: a study on spine fracture patients. *Spine (Phila Pa 1976).* 2007 Aug 1;32(17):1865-8.
- 32) Carreon LY, Glassman SD, Howard J. Fusion and nonsurgical treatment for symptomatic lumbar degenerative disease: a systematic review of Oswestry Disability Index and MOS Short Form-36 outcomes. *Spine J.* 2008;8(5):747-755.
- 33) Oakes BW. Orthopaedic tissue engineering: from laboratory to the clinic. *Med J Aust* 2004;180(5 Suppl):S35-S38.
- 34) Campana V, Milano G, Pagano E et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25(10):2445-2461.
- 35) Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005;36 Suppl 3:S20-S27
- 36) Sung HJ, Meredith C, Johnson C, Galis ZS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 2004;25(26):5735-5742.
- 37) Groeneveld EH, van den Bergh JP, Holzmann P, ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH. Mineralization processes in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations. *J Biomed Mater Res* 1999;48(4):393-402.
- 38) Chiarello E, Cadossi M, Tedesco G, et al. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res.* 2013;25 Suppl 1:S101-S103.

- 39) Cook EA, Cook JJ. Bone graft substitutes and allografts for reconstruction of the foot and ankle. *Clin Podiatr Med Surg*. 2009;26(4):589-605.
- 40) Nichols JE, Cortiella J, Lee J et al. In vitro analog of human bone marrow from 3D scaffolds with biomimetic inverted colloidal crystal geometry. *Biomaterials* 2009;30(6):1071-1079.
- 41) Tan J, Liu T, Hou L et al. Maintenance and expansion of hematopoietic stem/progenitor cells in biomimetic osteoblast niche. *Cytotechnology* 2010;62(5):439-448.
- 42) Oryan A, Bigham-Sadegh A, Abbasi-Teshnizi F. Effects of osteogenic medium on healing of the experimental critical bone defect in a rabbit model. *Bone* 2014;63:53-60.
- 43) Verbicaro T, Giovanini AF, Zielak JC, Baratto FF, de Araujo MR, Deliberador TM. Osteocalcin immunohistochemical expression during repair of critical-sized bone defects treated with subcutaneous adipose tissue in rat and rabbit animal model. *Braz Dent J* 2013;24(6):559-564.
- 44) Guo X, Zheng Q, Kulbatski I et al. Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous beta-TCP ceramic scaffolds. *Biomed Mater* 2006;1(3):93-99.
- 45) Bodde EW, Wolke JG, Kowalski RS, Jansen JA. Bone regeneration of porous beta-tricalcium phosphate (Conduit TCP) and of biphasic calcium phosphate ceramic (Biosel) in trabecular defects in sheep. *J Biomed Mater Res A* 2007;82(3):711-722.
- 46) Harris CT, Cooper LF. Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis. *J Biomed Mater Res A* 2004;68(4):747-755.
- 47) Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005;26(17):3587-3596.

- 48) Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* 1997;18(15):1037-1041.
- 49) Fujita M, Kinoshita Y, Sato E et al. Proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells on poly(glycolic acid)-collagen sponge. *Tissue Eng* 2005;11(9-10):1346-1355.
- 50) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-147.
- 51) An HS, Lynch K, Toth J. Prospective comparison of autograft vs. allograft for adult posterolateral lumbar spine fusion: differences among freeze-dried, frozen, and mixed grafts. *J Spinal Disord.* 1995;8(2):131–5.
- 52) Gibson S, McLeod I, Wardlaw D, Urbaniak S. Allograft versus autograft in instrumented posterolateral lumbar spinal fusion: a randomized control trial. *Spine (Phila Pa 1976).* 2002;27(15):1599–603.
- 53) Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(3):454-464.
- 54) Yoshikawa T. Bone reconstruction by cultured bone graft. *Materials Science and Engineering* 2000;(13):29-37.
- 55) Weir NA, Buchanan FJ, Orr JF, Dickson GR. Degradation of poly-L-lactide. Part 1: in vitro and in vivo physiological temperature degradation. *Proc Inst Mech Eng H* 2004;218(5):307-319.
- 56) Park JJ, Hershman SH, Kim YH. Updates in the use of bone grafts in the lumbar spine. *Bull Hosp Jt Dis.* 2013;71(1):39–48.
- 57) Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 2003;22(1):81-91.
- 58) Hubbell JA. Bioactive biomaterials. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10(2):123-129.

- 59) Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991;99 (Pt 1):131-139.
- 60) Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352(19):1959-1966.
- 61) Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19(3):180-192.
- 62) McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO et al. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif* 2005;38(4):245-255.
- 63) Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002;12(11):502-508
- 64) Mountford JC. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus Med* 2008;18(1):1-12.
- 65) Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996;(17):93-102.
- 66) Mendes SC, Bezemer J, Claase MB et al. Evaluation of two biodegradable polymeric systems as substrates for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2003;9 Suppl 1:S91-101.
- 67) Filvaroff E, Erlebacher A, Ye J et al. Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development* 1999;126(19):4267-4279.
- 68) Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-222.

- 69) Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med* 2006;24(5):379-388.
- 70) Trounson A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. *BMC Med* 2009;7:29.
- 71) Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425(6960):841-846.
- 72) Lam BS, Adams GB. Hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow stem cell niche. *Int J Lab Hematol* 2010;32(6 Pt 2):551-558.
- 73) Zhang J, Niu C, Ye L et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425(6960):836-841.
- 74) Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:349-356.
- 75) Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl* 1982;1:87-94.
- 76) Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hemopoietic microenvironment. *Exp Hematol* 1984;12(7):517-521.
- 77) Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006;20(3):161-171.
- 78) Sorrell JM, Weiss L. Cell interactions between hematopoietic and stromal cells in the embryonic chick bone marrow. *Anat Rec* 1980;197(1):1-19.
- 79) Weiss L. The haemopoietic microenvironment of bone marrow: an ultrastructural study of the interactions of blood cells, stroma and blood vessels. *Ciba Found Symp* 1980;71:3-19.

- 80) Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997;36(1):17-28.
- 81) Martin I, Shastri VP, Padera RF et al. Selective differentiation of mammalian bone marrow stromal cells cultured on three-dimensional polymer foams. *J Biomed Mater Res* 2001;55(2):229-235
- 82) Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2004;22(2):80-86.
- 83) Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG. Threedimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* 1998;19(15):1405-1412.
- 84) Braccini A, Wendt D, Jaquiere C et al. Three-dimensional perfusion culture of human bone marrow cells and generation of osteoinductive grafts. *Stem Cells* 2005;23(8):1066-1072.
- 85) Datta N, Pham QP, Sharma U, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG. In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2488-2493.
- 86) Holtorf HL, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Ann Biomed Eng* 2005;33(9):1238-1248.
- 87) Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. *J Biomed Mater Res A* 2005;72(3):326-334.
- 88) Scaglione S, Braccini A, Wendt D et al. Engineering of osteoinductive grafts by isolation and expansion of ovine bone marrow stromal cells directly on 3D ceramic scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2006;93(1):181-187.
- 89) Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture

increases with increasing fluid shear forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(25):14683-14688.

- 90) Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, Liebschner MA, Dauner M, Mikos AG. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng* 2005;33(1):63-70.
- 91) Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1992;1(1):23-32.
- 92) Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 1997;12(10):1606-1614.
- 93) Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992;13(1):81-88.
- 94) Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K et al. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 1997;12(9):1335-1347.
- 95) Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 1997;63(8):1059-1069.
- 96) Braccini A, Wendt D, Farhadi J, Schaeren S, Heberer M, Martin I. The osteogenicity of implanted engineered bone constructs is related to the density of clonogenic bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1(1):60-65.
- 97) Marcacci M, Kon E, Moukhachev V et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007;13(5):947-955.

- 98) Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344(5):385-386.
- 99) Caradano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 2003;(8):980-989.
- 100) Kawamura K, Yajima H, Ohgushi H et al. Experimental study of vascularized tissue-engineered bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 2006;117(5):1471-1479.
- 101) Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9(6):685-693.
- 102) Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ. Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *J Bone Miner Res* 2005;20(5):848-857.
- 103) Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004;110(3):349-355.
- 104) Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;109(5):656-663.
- 105) Valarmathi MT, Yost MJ, Goodwin RL, Potts JD. A three-dimensional tubular scaffold that modulates the osteogenic and vasculogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2008;14(4):491-504.
- 106) Unger RE, Sartoris A, Peters K et al. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 2007;28(27):3965-3976.

- 107) Choong CS, Hutmacher DW, Triffitt JT. Co-culture of bone marrow fibroblasts and endothelial cells on modified polycaprolactone substrates for enhanced potentials in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2006;12(9):2521-2531.
- 108) Rouwkema J, de BJ, van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 2006;12(9):2685-2693.
- 109) Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98(9):2615-2625.
- 110) Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:231-233.
- 111) Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:231-234
- 112) Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells: an update. *ovartis Found Symp* 2005;265:55-61.
- 113) Cogle CR, Wainman DA, Jorgensen ML, Guthrie SM, Mames RN, Scott EW. Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. *Blood* 2004;103(1):133-135.
- 114) Forrai A, Robb L. The hemangioblast--between blood and vessels. *Cell Cycle* 2003;2(2):86-90.
- 115) Jaffredo T, Bollerot K, Sugiyama D, Gautier R, Drevon C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int J Dev Biol* 2005;49(2-3):269-277.
- 116) Loges S, Fehse B, Brockmann MA et al. Identification of the adult human hemangioblast. *Stem Cells Dev* 2004;13(3):229-242.

- 117) Friedenstein A, Kuralesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation* 1971;12(2):99-108.
- 118) Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16(3):381-390.
- 119) Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6(2):230-247.
- 120) Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 1995;56 Suppl 1:S17.
- 121) Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 1997;97(3):561-570.
- 122) Holyoake TL, Alcorn MJ. CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev* 1994;8(2):113-124
- 123) Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87(1):1-13.
- 124) Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001;15(1):1-13.
- 125) Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25(11):2739-2749.
- 126) Lind M. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta Orthop Scand* 1996;67(4):407-417
- 127) Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11(1):55-64.

- 128) Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 1990;11(3):181-188.
- 129) Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002;20(5):1060-1069.
- 130) O'Driscoll SW, Saris DB, Ito Y, Fitzimmons JS. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J Orthop Res* 2001;19(1):95-103.
- 131) Zarnett R, Salter RB. Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin. *Can J Surg* 1989;32(3):171-174.
- 132) Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997;21(3):225-235.
- 133) Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13(4):655-663.
- 134) Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28(8):875-884.
- 135) Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13(1):69-80.
- 136) Kobune M, Kawano Y, Ito Y et al. Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp Hematol* 2003;31(8):715-722.
- 137) Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 2002;30(8):879-886.

- 138) Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng* 2005;11(5-6):787-802.
- 139) Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71-74.
- 140) Sun S, Guo Z, Xiao X et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells* 2003;21(5):527-535.
- 141) Dominici M, Le BK, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-317.
- 142) Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181(1):67-73.
- 143) Di MN, Piccinini E, Jaworski M, Trumpp A, Wendt DJ, Martin I. Toward modeling the bone marrow niche using scaffold-based 3D culture systems. *Biomaterials* 2011;32(2):321-329.
- 144) Bagley J, Rosenzweig M, Marks DF, Pykett MJ. Extended culture of multipotent hematopoietic progenitors without cytokine augmentation in a novel threedimensional device. *Exp Hematol* 1999;27(3):496-504.
- 145) De Barros AP, Takiya CM, Garzoni LR et al. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model. *PLoS One* 2010;5(2):e9093.
- 146) Baddoo M, Hill K, Wilkinson R et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003;89(6):1235-1249.
- 147) Ringe J, Kaps C, Schmitt B et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002;307(3):321-327.

- 148) Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004;89(12):1421-1427.
- 149) Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98(8):2396-2402.
- 150) Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004;6(6):543-553.
- 151) In 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003;88(8):845-852.
- 152) Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004;19(6):1450-1456.
- 153) Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109(1):235-242.
- 154) O'Donoghue K, Choolani M, Chan J et al. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2003;9(8):497-502.
- 155) Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2(6):477-488.
- 156) Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001;7(6):259-264.
- 157) Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro

- culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007;67(19):9142-9149.
- 158) Herrero C, Perez-Simon JA. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 2010;43(5):425-430.
- 159) Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36(10):2566-2573.
- 160) Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418(6893):41-49.
- 161) Krampera M, Cosmi L, Angeli R et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(2):386-398.
- 162) Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21(3):429-435.
- 163) Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells *Exp Cell Res* 1998;238(1):265-272.
- 164) Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9 Suppl A:S36-S40.
- 165) Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ et al. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by *PPARgamma2*. *J Cell Biochem* 1999;74(3):357-371.
- 166) Nakajima T, Iizuka H, Tsutsumi S, Kayakabe M, Takagishi K. Evaluation of posterolateral spinal fusion using mesenchymal stem cells: differences with or without osteogenic differentiation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007; 32:2432-6.
- 167) Cinotti G, Patti AM, Vulcano A et al. Experimental posterolateral spinal fusion with porous ceramics and mesenchymal stem cells. *The Journal of bone and joint surgery* 2004 (86): 135-40.

- 168) Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 2009.
- 169) Sugiura F, Kitoh H, Ishiguro N. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;316(1):233-239.
- 170) Atala A. Recent developments in tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Opin Pediatr* 2006;18(2):167-171.
- 171) Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005;23(1):47-55.
- 172) Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000;21(23):2335-2346.
- 173) O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 2014;(26):441-443.
- 174) Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *Int Orthop* 2013;37(12):2491-2498.
- 175) Lee K, Chan CK, Patil N, Goodman SB. Cell therapy for bone regeneration--bench to bedside. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;89(1):252-263.
- 176) Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9(5):641-650.
- 177) Kaiser MG, Groff MW, Watters WC 3rd, et al. Guideline update for the performance of fusion procedures for degenerative disease of the lumbar spine. Part 16: bone graft extenders and substitutes as an adjunct for lumbar fusion. *J Neurosurg Spine.* 2014;21(1):106-132.
- 178) Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cellbased tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A(7):1541-1558.

- 179) Deasy BM, Gharaibeh BM, Pollett JB et al. Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol Biol Cell* 2005;16(7):3323-3333.
- 180) Muschler GF, Boehm C, Easley K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79(11):1699-1709.
- 181) Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res* 2005;8(4):277-284.
- 182) Cowan CM, Soo C, Ting K, Wu B. Evolving concepts in bone tissue engineering. *Curr Top Dev Biol* 2005;66:239-285.
- 183) Hutmacher DW, Garcia AJ. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. *Gene* 2005;347(1):1-10.
- 184) Korovessis P, Koureas G, Zacharatos S, Papazisis Z, Lambiris E. Correlative radiological, self-assessment and clinical analysis of evolution in instrumented dorsal and lateral fusion for degenerative lumbar spine disease. Autograft versus coralline hydroxyapatite. *Eur Spine J.* 2005;14(7):630–8.
- 185) Wang Y, Chen X, Armstrong MA, Li G. Survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenotransplantation model. *J Orthop Res* 2007;25(7):926-932.
- 186) Tachibana A, Furuta Y, Takeshima H, Tanabe T, Yamauchi K. Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. *J Biotechnol.* 2002;93(2):165-170.
- 187) Lee SJ, Lim GJ, Lee JW, Atala A, Yoo JJ. In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials.* 2006;27(18):3466-3472.
- 188) Wei G, Ma PX. Macroporous and nanofibrous polymer scaffolds and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres. *J Biomed Mater Res A* 2006;78(2):306-315.

- 189) Langer R. New methods of drug delivery. *Science* 1993;(260):926.
- 190) Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Relat Res* 1991;(263):30-48.
- 191) Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991;113(5):981-986.
- 192) Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 1983;220(4598):680-686.
- 193) Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A Suppl 1(Pt 1):S1-S6.
- 194) Torzilli PA, Burstein AH, Takebe K. The mechanical and structural properties of maturing bone. In: Cowen SC, editor. *Mechanical properties of bone*. New York: American Society of Mechanical Engineers; 1981:145-161.
- 195) Endo M, Kuroda S, Kondo H, Maruoka Y, Ohya K, Kasugai S. Bone regeneration by modified gene-activated matrix: effectiveness in segmental tibial defects in rats. *Tissue Eng*. 2006;12(3):489-497.
- 196) Lin CY, Schek RM, Mistry AS, et al. Functional bone engineering using ex vivo gene therapy and topology-optimized, biodegradable polymer composite scaffolds. *Tissue Eng*. 2005;11(9-10):1589-1598.
- 197) Sánchez-Guijo F, Caballero-Velázquez T, López-Villar O, Redondo A, Parody R, Martínez C, et al. Sequential third-party mesenchymal stromal cell therapy for refractory acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(10):1580–5
- 198) Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*. 2005 Oct;23(9):1357-66.

- 199) Gang EJ, Bosnakovski D, Simsek T, To K, Perlingeiro RC. Pax3 activation promotes the differentiation of mesenchymal stem cells toward the myogenic lineage. *Exp Cell Res.* 2008;314(8):1721-1733.
- 200) Carrancio S, N López-Holgado, F Sánchez-Guijo, EM Villarón, V Barbado, S Tabera, M Díez-Campelo, J Blanco, JF. San Miguel, MC del Cañizo. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Experimental Hematology* 2008; 36: 1014-1021.
- 201) Williamson A, Hoggart B. Pain: a review of three commonly used pain rating scales. *J Clin Nurs.* 2005;14(7):798–804.
- 202) Little DG, MacDonald D. The use of the percentage change in Oswestry disability index score as an outcome measure in lumbar spinal surgery. *Spine (Phila Pa 1976).* 1994;19(19):2139–43.
- 203) Walsh TL, Hanscom B, Lurie JD, Weinstein JN. Is a condition-specific instrument for patients with low Back pain/leg symptoms really necessary? *Spine (Phila Pa 1976).* 2003;28(6):607–15.
- 204) Sathiyakumar V, Molina CS, Thakore RV, Obremskey WT, Sethi MK. ASA score as a predictor of 30-day perioperative readmission in patients with orthopaedic trauma injuries: an NSQIP analysis. *J Orthop Trauma.* 2015;29(3):e127-e132.
- 205) Werner BC, Li XSF. Stem cells in preclinical spine studies. *spine J.* 2014;14(3): 542–51.
- 206) Francisco M et al. *Correlation Between Pain, Disability, and Quality of Life in Patients With Common Low Back Pain.* SPINE Volume 29, Number 2, pp 206–210 ©2004, Lippincott Williams & Wilkins, Inc)
- 207) Foster NE. Barriers and progress in the treatment of low back pain. *BMC Med* 2011;9:108
- 208) Panjabi MM, White AA 3rd. Basic biomechanics of the spine. *Neurosurgery.* 1980;7(1):76-93. doi:10.1227/00006123-198007000-00014)

- 209) Rajae SS, Bae HW, Kanim LE, Delamarter RB. Spinal fusion in the United States: analysis of trends from 1998 to 2008. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012; 37(1):67–76.
- 210) Weiss AJ, Elixhauser A. Trends in operating room procedures in U.S. Hospitals, 2001–2011: Statistical Brief #171. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs; 2006.
- 211) Wood GW, Boyd RJ, Carothers TA, Mansfield FL, Rehtine GR, Rozen MJ, et al. The effect of pedicle screw/plate fixation on lumbar/lumbosacral autogenous bone graft fusions in patients with degenerative disc disease. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(7):819–30.
- 212) Tuchman A, Brodke DS, Youssef JA, Meisel HJ, Dettori JR, Park JB, et al. Iliac crest bone graft versus local autograft or allograft for lumbar spinal fusion: a systematic review. *Glob Spine J*. 2016;6(6):592–606.
- 213) Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(7):373-382.
- 214) H. Ohgushi, V. M. Goldberg, and A. I. Caplan, "Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic: experiments in rats," *Acta Orthopaedica Scandinavica*, vol. 60, no. 3, pp. 334–339, 1989.
- 215) S. P. Bruder, K. H. Kraus, V. M. Goldberg, and S. Kadiyala, "The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects," *The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, vol. 80, no. 7, pp. 985–996, 1998.
- 216) Blanco JF, Sánchez-Guijo FM, Carrancio S, Muntion S, García-Briñon J, del Cañizo MC. Titanium and tantalum as mesenchymal stem cell scaffolds for spinal fusion: an in vitro comparative study. *Eur Spine J*. 2011;20 Suppl 3(Suppl 3):353-360. doi:10.1007/s00586-011-1901-8

- 217) Buser Z, Brodke DS, Youssef JA, Meisel H-J, Myhre SL, Hashimoto R, et al. Synthetic bone graft versus autograft or allograft for spinal fusion: a systematic review. *J Neurosurg Spine*. 2016;25(4):509–16
- 218) Stanovici J, Le Nail L-R, Brennan MA, Vidal L, Trichet V, Rosset P, et al. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Curr Res Transl Med*. 2016;64(2):83-90.
- 219) Hannink G, Arts JJC. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S22-5.
- 220) Cahill KS, McCormick PC, Levi AD. A comprehensive assessment of the risk of bone morphogenetic protein use in spinal fusion surgery and postoperative cancer diagnosis. *J Neurosurg Spine*. 2015;23(1):86–93.
- 221) Singh K, Ahmadiania K, Park DK, Nandyala SV, Marquez-Lara A, Patel AA, et al. Complications of spinal fusion with utilization of bone morphogenetic protein. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014;39(1):91–101.
- 222) Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(12):2173–85.
- 223) Pescador D, Ibáñez-Fonseca A, Sánchez-Guijo F, Briñón JG, Arias FJ, Muntión S, et al. Regeneration of hyaline cartilage promoted by xenogeneic mesenchymal stromal cells embedded within elastin-like recombinamerbased bioactive hydrogels. *J Mater Sci Mater Med*. 2017;28(8).
- 224) Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011; 9:12.
- 225) McLain RF, Fleming JE, Boehm CA, Muschler GF. Aspiration of osteoprogenitor cells for augmenting spinal fusion: comparison of progenitor

- cell concentrations from the vertebral body and iliac crest. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2005; 87(12):2655±61.
- 226) Fragkakis EM, El-Jawhari JJ, Dunsmuir RA, et al. Vertebral body versus iliac crest bone marrow as a source of multipotential stromal cells: Comparison of processing techniques, tri-lineage differentiation and application on a scaffold for spine fusion. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197969. Published 2018 May 24.
- 227) Fontes CR P.A., Rao A.S., Rybka W.B., Dodson S.F., McAllister CG., Broznick B., Ukah F.O., Fung J. J., Starzl T.E. Human vertebral bodies as a source of bone marrow for cell augmentation in whole organ allografts. *Methods in Cell transplantation* Camillo Ricordi. R.G. Landes Company 1994. p. Chapter H1:615±24.
- 228) Mansilla E MK, Roque G, Tau JM, MarõÃn GH, Castuma MV, Orlandi G and Tarditti A. Salvage of Cadaver Stem Cells (CSCs) as a Routine Procedure: History or Future for Regenerative Medicine. *Journal of Transplantation Technologies & Research*. 2013; 3: 118.
- 229) Valencia J, Blanco B, Yáñez R, Vázquez M, Herrero Sánchez C, Fernández-García M, et al. Comparative analysis of the immunomodulatory capacities of human bone marrow– and adipose tissue–derived mesenchymal stromal cells from the same donor. *Cytotherapy*. 2016;18(10):1297–311.
- 230) Blanco B, Herrero-Sánchez M del C, Rodríguez-Serrano C, García- Martínez ML, Blanco JF, Muntión S, et al. Immunomodulatory effects of bone marrow versus adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on NK cells: implications in the transplantation setting. *Eur J Haematol*. 2016;97(6):528–37.
- 231) Li Y, Jin D, Xie W, Wen L, Chen W, Xu J, et al. Mesenchymal stem cells derived exosomes: a possible therapeutic strategy for osteoporosis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(5):362–8.
- 232) Zhang J, Liu X, Li H, Chen C, Hu B, Niu X, et al. Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):136.

- 233) Salamanna F, Sartori M, Brodano GB, Griffoni C, Martini L, Boriani S, et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of spinal arthrodesis: from preclinical research to clinical scenario. *Stem Cells Int.* 2017;2017:3537094.
- 234) A. I. Pearce, R. G. Richards, S. Milz et al., "Animal models for implant biomaterial research in bone: a review," *European Cells and Materials*, vol. 13, pp. 1–10, 2007
- 235) Blanco Antona L, García Cenador MB, Sánchez Ledesma MJ, Rojo López R, Muntión Olave S, Collía Fernández F, De Vicente Jiménez J, López- Valverde Centeno A. Bone regeneration using stem cells in combination with beta-tricalcium phosphate carrier. *Trauma Fund MAPRE* (2014) Vol 25 nº 4: 237-244.
- 236) Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H, et al. Vertical bone augmentation with simultaneous implant placement using particulate mineralized bone and mesenchymal stem cells: a preliminary study in rabbit. *J Oral Implantol.* 2013;39(1):3-13. doi:10.1563/AAID-JOI-D-10-00206) (Rai B, Teoh SH, Ho KH. An in vitro evaluation of PCL-TCP composites as delivery systems for platelet-rich plasma. *J Control Release.* 2005; 107 (2) : 330-342.
- 237) K. Le Blanc, L. Tammik, B. Sundberg, S. E. Haynesworth, and O. Ringdén, "Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 57, no. 1, pp. 11–20, 2003.
- 238) M. W. Ronsyn, J. Daans, G. Spaepen et al., "Plasmid-based genetic modification of human bone marrow-derived stromal cells: analysis of cell survival and transgene expression after transplantation in rat spinal cord," *BMC Biotechnology*, vol. 7, no. 1, p. 90, 2007.
- 239) Blanco JF, García-Briñon J, Benito-Garzón L, Pescador D, Muntión S, Sánchez-Guijo F. Human bone marrow mesenchymal stromal cells promote bone regeneration in a xenogeneic rabbit model: a preclinical study. *Stem Cells Int.* 2018;2018:7089484.

- 240) Cinotti G, Patti AM, Vulcano A, Della Rocca C, Polveroni G, Giannicola G, Postacchini F. Experimental posterolateral spinal fusion with porous ceramics and mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg Br.* 2004 Jan;86(1):135-42. Erratum in: *J Bone Joint Surg Br.* 2004 May;86(4):622.
- 241) Hsu WK, Wang JC, Liu NQ, Krenek L, Zuk PA, Hedrick MH, Benhaim P, Lieberman JR. Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 May;90(5):1043-52.)
- 242) Fu TS, Chen WJ, Chen LH, Lin SS, Liu SJ, Ueng SW. Enhancement of posterolateral lumbar spine fusion using low-dose rhBMP-2 and cultured marrow stromal cells. *J Orthop Res.* 2009 Mar;27(3):380-4.)
- 243) Eastlack RK, Garfin SR, Brown CR, Meyer SC. Osteocel Plus cellular allograft in anterior cervical discectomy and fusion: evaluation of clinical and radiographic outcomes from a prospective multicenter study. *Spine (Phila Pa 1976).* 2014 Oct 15;39(22):E1331-7.
- 244) Rubio R, Abarrategi A, Garcia-Castro J, et al. Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2014;32(5):1136-1148.
- 245) Graciani IF, Blanco JF, Sánchez-Guijo FM, Barbado MV, García JL, Sánchez-Cuadrado I, Villarón EM, López-Villar O, Tabera S, Cruz G, Blanco B, San Miguel JF, Briñón JG, del Cañizo MC. Tratamiento de la lesión ósea crítica en un modelo animal mediante células stem mesenquimales./ *Haematologica* (ed. Esp.) 2007.
- 246) Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials.* 2008 Oct;29:3973-82.
- 247) Niu C et al 2009 Niu CC, Yuan LJ, Lin SS, Chen LH, Chen WJ. Mesenchymal stem cell and nucleus pulposus cell coculture modulates cell profile. *Clin Orthop Relat Res.* 2009 Dec;467(12):3263-72.

- 248) Le Hec JC, Lespirt E, Delavigne C, et al. Tri-calcium phosphate ceramics and allografts as bone substitutes for spinal fusion in idiopathic scoliosis: comparative results at four years. *Acta Orthop Belg* 1997;63:202-11.
- 249) Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):145.
- 250) Yousef MAA, La Maida GA, Misaggi B. Long-term radiological and clinical outcomes after using bone marrow mesenchymal stem cells concentrate obtained with selective retention cell technology in posterolateral spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976).* 2017;42(24):1871–9.
- 251) Gan Y, Dai K, Zhang P, Tang T, Zhu Z, Lu J. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials.* 2008;29(29):3973–82.
- 252) Hendrich C, Engelmaier F, Waertel G, Krebs R, Jäger M. Safety of autologous bone marrow aspiration concentrate transplantation: initial experiences in 101 patients. *Orthop Rev (Pavia).* 2009;1(1):32.
- 253) Jäger M, Hernigou P, Zilkens C, Herten M, Li X, Fischer J, et al. Cell therapy in bone healing disorders. *Orthop Rev (Pavia).* 2010;2(2):e20.
- 254) Jäger M, Herten M, Fochtmann U, Fischer J, Hernigou P, Zilkens C, et al. Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *J Orthop Res.* 2011;29(2):173–80.
- 255) Gessmann J, Köller M, Godry H, Schildhauer TA, Seybold D. Regenerate augmentation with bone marrow concentrate after traumatic bone loss. *Orthop Rev (Pavia).* 2012;3(2):14.
- 256) Hyer CF, Berlet GC, Bussewitz BW, Hankins T, Ziegler HL, Philbin TM. Quantitative assessment of the yield of osteoblastic connective tissue progenitors in bone marrow aspirate from the iliac crest, tibia, and calcaneus. *J Bone Joint Surg-Am.* 2013;95(14):1312–6.

- 257) Camimsa FP Jr, Lowery G, Garfin SR. Two-year fusion rate equivalency between GraftonDBM gel and autograft in posterolateral spine fusion: a Prospective controlled trial employing a side-by-side comparison in the same patient. *Spine (Phila Pa 1976)* 29:660-666.2004
- 258) Epstein NE. Beta tricalcium phosphate: observation of use in 100 posterolateral lumbar instrumented fusions. *Spine J.* 2009;9(8):630–8.
- 259) Thaler M, Lechner R, Gstottner M, Kobel C, Bach C. The use of betatricalcium phosphate and bone marrow aspirate as a bone graft substitute in posterior lumbar interbody fusion. *Eur Spine J.* 2013;22(5):1173–82.