

TESIS DOCTORAL

HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS “STEM” MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL CERVICAL DEGENERADO.

Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos pacientes y resultados previos en la región lumbar.



DIEGO LÓPEZ GONZÁLEZ

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS

SALAMANCA 2015



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS

TESIS DOCTORAL

**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS “STEM”
MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL
CERVICAL DEGENERADO. Comparación con las células obtenidas de
médula ósea de los mismos pacientes y resultados previos en la región
lumbar.**

DIEGO LÓPEZ GONZÁLEZ

TUTOR:

ANTONIO JESÚS ALVÁREZ-MORUJO SUÁREZ

DIRECTORES:

**JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO
RAFAEL CONRADO GONZALEZ DIAZ
FERMÍN SÁNCHEZ-GUIJO MARTÍN**

SALAMANCA, 2015



**VNiVERSiDAD
DSALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS

PROF. DR.

D. ANTONIO JESÚS ÁLVAREZ-MORUJO SUÁREZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado "**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS "STEM" MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL CERVICAL DEGENERADO. Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos pacientes y resultados previos en la región lumbar.**" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Diego López González en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 2015.

Fdo. Dr. D. Antonio Jesús Álvarez-Morujó Suárez.



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA

PROF. DR.

D. JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado "**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS "STEM" MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL CERVICAL DEGENERADO. Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos pacientes y resultados previos en la región lumbar.**" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Diego López González en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 2015.

Fdo. Dr. D. Juan Francisco Blanco Blanco.



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS

PROF. DR.

D. RAFAEL CONRADO GONZÁLEZ DÍAZ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD REY JUAN CARLOS,

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado "**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS "STEM" MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL CERVICAL DEGENERADO. Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos pacientes y resultados previos en la región lumbar.**" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Diego López González en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 2015.

Fdo. Dr. D. Rafael Conrado González Díaz.



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS

PROF. DR.

D. FERMÍN SÁNCHEZ-GUIJO MARTÍN, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado "**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS "STEM" MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL CERVICAL DEGENERADO. Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos pacientes y resultados previos en la región lumbar.**" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Diego López González en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 2015.

Fdo. Dr. D. Fermín Martín Sánchez-Guijo.

**Este proyecto ha sido financiado parcialmente por la fundación MAPFRE,
beca concedida de investigación 2013. Código del proyecto:
SA12AYU/094.**

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar al Dr. Rafael González Díaz la posibilidad de realizar este estudio, de contar con todo su apoyo y su tiempo.

También al Dr. Juan Francisco Blanco por su confianza y tutela en este trabajo, desde el principio, un ejemplo para mí como médico y persona.

Al Dr. Fermín Sánchez-Guijo, co-director de esta Tesis, y a las Dras. Consuelo del Cañizo y Sandra Muntión, y a la TEL Rebeca Ortega, de la Unidad de Terapia Celular del servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca por su interés, motivación, afán investigador y por poner a nuestra disposición todos sus medios y sus conocimientos, que son extraordinarios.

Al Dr. David Pescador Hernández, por la cooperación que ha hecho posible que médicos de distintas comunidades hayamos trabajado en equipo.

Al Hospital Universitario Fundación Alcorcón y el servicio de Traumatología, en especial la unidad de columna, por seguir potenciando el desarrollo de investigación.

También gracias a mi mujer, por el apoyo recibido y sacrificar su tiempo para permitirme realizar este proyecto. Y a mis padres, fuente inagotable de motivación y ejemplo.

ÍNDICE

ÍNDICE

0. Resumen	1
1. Introducción	7
1.1. El Disco intervertebral.....	16
1.1.1 Desarrollo del disco intervertebral.....	19
1.1.2 Anatomía normal del disco intervertebral y las carillas articulares.....	23
1.1.3 Biomecánica del disco	24
1.1.3.1 Consideraciones biomecánicas sobre la estabilidad de la columna.....	24
1.1.3.2 Propiedades físicas y biomecánica funcional del disco intervertebral.....	25
1.1.3.3 Características de compresión del disco.....	27
1.1.3.4 Propiedades elásticas del disco.....	28
1.1.3.5 Características de flexión del disco.....	29
1.1.3.6 Comportamiento del disco frente a la torsión.....	30
1.1.3.7 Características de cizallamiento del disco.....	31
1.1.3.8 Propiedades de fluencia y relajación del disco.....	32
1.1.3.9 Propiedades de histéresis del disco.....	32
1.1.3.10 Tolerancia a la fatiga del disco	33
1.2 Morfología de la degeneración discal.....	34
1.2.1 El disco normal	35
1.2.2 Las moléculas que constituyen la matriz del disco.....	36
1.2.2.1 Agrecano y otros proteoglicanos.....	37
1.2.2.2 Colágenos.....	38

1.2.3 Degeneración discal.....	40
1.2.3.1 Anatomía patológica.....	49
1.2.3.2 Degeneración de la matriz desde el punto de vista enzimático.....	52
1.2.3.3 Biomecánica del disco degenerativo.....	52
1.2.3.4 Alteraciones morfológicas asociadas a la degeneración del disco intervertebral.....	55
1.2.4 Degeneración de la articulación de las carillas.....	57
1.3 Etiología de la degeneración discal	58
1.3.1 Genes y degeneración discal	63
1.3.2 Vías ambientales para la degeneración discal.....	65
1.3.3 Vías nutritivas.....	66
1.3.4 Carga mecánica y lesión.....	68
1.3.5 Tabaco.....	69
1.4 Efectos de la degeneración sobre el funcionamiento del disco.....	70
1.4.1 Modelo estructural del disco, función del agregano y de la red de colágeno.....	70
1.4.2 Cargas sobre el disco.....	71
1.4.3 Efecto de la carga sobre la hidratación del disco.....	75
1.4.4 Efecto de la pérdida de agregano.....	76
1.5. Patología del disco	78
1.5.1 Hernia discal.....	78
1.5.2 Estenosis de la columna.....	81
1.5.3 Deformidades de la columna.....	82
1.6 Abordajes terapéuticos.....	84

1.6.1 Tendencias en el tratamiento.....	84
1.6.1.1 Tratamiento conservador.....	85
1.6.1.2 Discectomía o microdiscectomía.....	87
1.6.1.3 Discectomía y fusión anterior cervical.....	87
1.6.1.4 Fusión cervical posterior.....	88
1.6.1.5 Disco adyacente sintomático.....	88
1.6.1.6 Prótesis discales.....	89
1.6.2 Reparación biológica del tejido	93
1.6.2.1 Tratamiento génico.....	93
1.6.2.2 Reparación celular.....	94
1.7. Terapia celular: empleo de las células “stem” en ingeniería tisular.....	96
1.7.1. Concepto y antecedentes.....	96
1.7.1.1. Células madre.....	99
1.7.1.1.1 Caracterización de las CSM	101
1.7.1.1.2 Potencial de diferenciación	105
1.7.2 Las células estromales de la médula.....	108
1.7.2.1. Células progenitoras mesenquimales.....	109
1.7.3 Las CSM y el nicho hematopoyético	110
1.7.3.1 Otras fuentes de obtención de CSM.....	113
1.7.4 Remodelación y renovación.....	114
1.7.5 Aislamiento de las las CSM.....	118
1.7.6 Expansión y cultivo.....	120
1.7.7 Factores de crecimiento proliferativos.....	121
1.7.8 Biología de las CSM.....	122

1.7.9 Biología de las CSM <i>in vitro</i>	124
1.8. Biomateriales en la terapia celular.....	126
1.8.1. Principios básicos de los BM.....	126
1.8.2. Propiedades de los BM.....	127
1.8.3. Tecnología en la fabricación de los BM.....	129
1.8.4. Biomateriales para la terapia celular.....	130
2. Hipótesis de trabajo	131
3. Objetivos	135
3.1 General.....	137
3.2 Específicas.....	137
4. Material y métodos	139
4.1 Diseño.....	141
4.2 Sujetos de estudio.....	142
4.3 Desarrollo técnico.....	145
4.4 Obtención de las células mesenquimales.....	147
4.4.1 Aislamiento de CSM en NP.....	147
4.4.2 Aislamiento de CSM en MO.....	148
4.4.3 Inmunofenotipo por citometría de flujo.....	150
4.4.4 Diferenciación multilineage de CSM.....	152
4.4.5 Recogida y análisis de datos.....	153
4.4.6 Análisis de las variables.....	154
4.4.7 Fases del proyecto.....	156
5. Resultados	159
5.1 Procesamiento.....	161
5.2 Cultivo.....	161

5.3 Diferenciación multilineal.....	162
5.4 El estudio inmunofenotípico.....	163
6. Discusión.....	167
6.1 Terapia celular.....	170
7. Conclusiones.....	191
7.1 General.....	193
7.2 Específicas.....	193
8. Bibliografía.....	197
9. Anexos.....	223
9.1 Abreviaturas.....	225
9.2 Índice de tablas.....	228
9.3 Índice de figuras.....	228
9.4 Méritos.....	230

RESUMEN

RESUMEN

Justificación: El estudio y tratamiento de la discopatía, supone un gran reto para la comunidad científica, la tecnología actual junto con la ingeniería tisular, abren nuevas puertas que debemos aprovechar. Hasta el momento, existe un tratamiento para la discopatía degenerativa conservador, encaminado a mejorar los síntomas y un tratamiento quirúrgico, que va desde la discectomía a la artrodesis segmentaria. El objetivo de este estudio, es profundizar en el conocimiento de la fisiopatología del disco intervertebral como paso previo para plantear la regeneración del tejido discal dañado. Para ello, evaluamos la presencia de células mesenquimales (progenitores celulares) en el núcleo pulposo de disco intervertebral cervical degenerado y analizamos sus características comparativamente con los progenitores celulares obtenidos de médula ósea de los mismos sujetos.

Métodos: Hemos realizado un estudio descriptivo con 14 pacientes que precisaron cirugía de artrodesis cervical, por padecer una discopatía degenerativa. Se analizó la presencia de células “stem” mesenquimales (CSM) en el núcleo pulposo (NP) del disco, comparándolas cualitativamente con las de médula ósea (MO) de los mismos pacientes. Se aislaron y expandieron CSM, tanto de NP como de MO. Se realizaron los estudios de diferenciación multilineal *in vitro* de las células mesenquimales de ambas fuentes, hacia osteoblasto, adipocito y caracterización inmunofenotípica por citometría de flujo

Resultados: Se hallaron progenitores celulares en el disco cervical degenerado. Las células de ambos orígenes (disco degenerado y médula ósea) se diferencian *in vitro* hacia ambas líneas celulares, si bien la diferenciación adipocítica de las células procedentes del disco fue menor que las procedentes de MO. Tampoco demostraron diferencias en los marcadores inmunofenotípicos. Las células de ambas fuentes poseen los marcadores inmunofenotípicos característicos de las células mesenquimales.

Conclusiones: El NP de disco vertebral cervical degenerado contiene células troncales mesenquimales. Estas células son similares a las células de MO, con la excepción de su capacidad disminuida de diferenciación adipogénica. Estos datos son coincidentes con los hallazgos obtenidos en el segmento lumbar. No podemos demostrar que haya diferencias entre segmentos biomecánicamente diferentes como cervical y lumbar.

Palabras clave: Células mesenquimales discales, núcleo pulposo, diferenciación celular, degeneración discal, terapia celular.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las numerosas patologías cartilaginosas o articulares existentes, tienen una elevada incidencia en la población mundial, siendo una causa frecuente de pérdida de salud y sufrimiento para los pacientes, ocasionando en la sociedad enormes pérdidas financieras, por ser motivo importante de absentismo laboral y generando un gasto sanitario alto. De todas estas enfermedades, se estima que sólo la artrosis es responsable del 50% de las enfermedades crónicas en la población envejecida y en los próximos años se espera que su incidencia sea aún mayor, en Estados Unidos en el 2008 afectaba a 27 millones de personas ^[1] y en el año 2030 serán 67 millones, el 25% de la población, los afectados de artrosis ^[2].

El dolor lumbar y el cervical son un problema de salud frecuentes, que en muchas ocasiones evolucionan a la cronicidad, con un difícil tratamiento que genera en el paciente desesperación y cuando este cuadro se acompaña de clínica neurológica, afecta de forma más que significativa a la independencia en la vida del paciente. La etiología que produce la degeneración discal, a menudo presente en el contexto de estas enfermedades, es multifactorial y será comentada más adelante.

El daño discal, centro de nuestro estudio, se produce de forma crónica con la pérdida progresiva de su estructura, composición y función, con degeneración de las de células notocordales que estabilizan la matriz extracelular y protegen la integridad del disco ^[3], también la pérdida de condrocitos en el núcleo

pulposo (NP) y su sustitución por fibroblastos, parece asociado a una degeneración discal precoz ^[4].

Esta degeneración discal, se puede acompañar de un cuadro clínico en forma de dolor, radiculopatía o mielopatía y su diagnóstico exige unos cambios anatomopatológicos, que en clínica identificamos o correlacionamos con pruebas de imagen. Tras el fracaso del tratamiento conservador (tratamiento expectante sintomático, antiinflamatorios, corticoides, neuromoduladores, ozono, rehabilitación, unidad del dolor, etc.) debemos poder proponer al paciente una solución quirúrgica, responsable, definitiva y de contrastados resultados a largo plazo. Los procesos invasivos como la cirugía a ese nivel, varían desde, conservadora del remanente discal degenerado, como la microdiscectomía, hasta fusiones, pasando por las prótesis, sin embargo, ninguno de estos últimos procesos conserva el disco y mucho menos lo regenera. La técnica de elección quirúrgica, en nuestra opinión, a nivel cervical, es la descompresión y fusión, que cumple todo lo requerido anteriormente y soluciona los problemas discales asociados con radiculopatía o mielopatía cervical. La artrodesis, con más de 25-50 años de experiencia, ha demostrado ser un tratamiento efectivo, seguro, pero no exento de complicaciones graves y riesgos para el paciente.

Gracias al avance en investigación, se han explorado en los últimos años caminos de tratamiento con base en la biología e ingeniería tisular, utilizando células pluripotenciales de cordón y más frecuentemente del adulto, donde se han descrito en MO, grasa y también en discos vertebrales ^[5].

Las células troncales mesenquimales o células “stem” mesenquimales (CSM), gracias a su capacidad de división y su capacidad para diferenciarse en tejidos especializados, son la herramienta más prometedora para solucionar el problema de degeneración discal y su uso terapéutico ya ha sido validado, gracias a su capacidad para migrar e injertarse en tejidos a distancia ^[6].

Casi todos los tejidos reparan sus lesiones mediante nuevo tejido, pero cicatricial, esto no ocurre por ejemplo en el hueso, que regenera sus fracturas con nuevo hueso y esta propiedad es la que queremos desarrollar con la utilización de CSM.

Las células pluripotenciales, pueden ser embrionarias, hematopoyéticas o mesenquimales. Las últimas se encuentra principalmente en la médula ósea, pero también en otros tejidos del adulto y son capaces de diferenciarse hacia un linaje, adipocítico, condrocítico, miocítico, tenocítico o célula neural.

La terapia celular es uno de los tratamientos más prometedores enfocados a problemas degenerativos, la investigación se desarrolla en esa línea conociendo la fisiopatología del tejido que se degenera y evaluando las posibilidades de las terapias celulares, buscando crear líneas de tratamiento precoces, poco agresivas y más definitivas para el paciente. El tejido humano tiene una limitada capacidad regenerativa, los estudios e investigación terapéutica actual pretende utilizar las propiedades de invasión, diferenciación y reparación que tienen las células madre, para reparar tejido dañado sin generar tejido de granulación, que se asocia a los procesos de cicatrización.

Se entiende por **reparación** de un tejido biológico, a la restauración de dicho tejido sin que éste conserve su arquitectura original, ni tampoco su función. Al no recuperar su estado original, sus propiedades mecánicas y físicas son inferiores, esto es una transformación que ocurre espontáneamente y el resultado final es la cicatrización. Entendemos por **regeneración** cuando la restauración de dicho tejido posee propiedades indistinguibles del tejido original. En la última década, la ingeniería de tejidos se ha revelado como el futuro en el campo de las terapias regenerativas frente a lesiones tisulares ^[7].

Centrándonos de nuevo en las CSM, éstas fueron descritas por primera vez por *Friedenstein* ^[8] como células no hematopoyéticas que residen en la médula ósea, con aspecto fibroblástico y características de célula stem: capacidad de autorrenovación, proliferación y con capacidad de diferenciarse a varias líneas de tejido mesodérmico. Además de en el cordón umbilical, se aislaron en médula ósea ^[9], grasa ^[10,11], músculo ^[12], piel ^[13], periostio ^[14], tendón ^[15], o tejido nervioso ^[16]. Sin embargo, las fuentes predominantes siguen siendo la médula ósea y el tejido adiposo ^[8].

A partir de su descripción inicial, el interés que han despertado estas células ha ido en aumento, siendo muchos los estudios sobre ellas en los que se han usando diferentes métodos de aislamiento, expansión y caracterización. La capacidad de diferenciación hacia estirpes mesodérmicas es un requisito exigido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) para que una célula sea considerada mesenquimal multipotencial ^[17]. Existen como ya hemos

visto, diferentes fuentes celulares en el organismo de las que se pueden obtener CSM, y como acabamos de mencionar las más frecuentemente empleadas son la médula ósea y el tejido adiposo (Figura 1) ^[18].

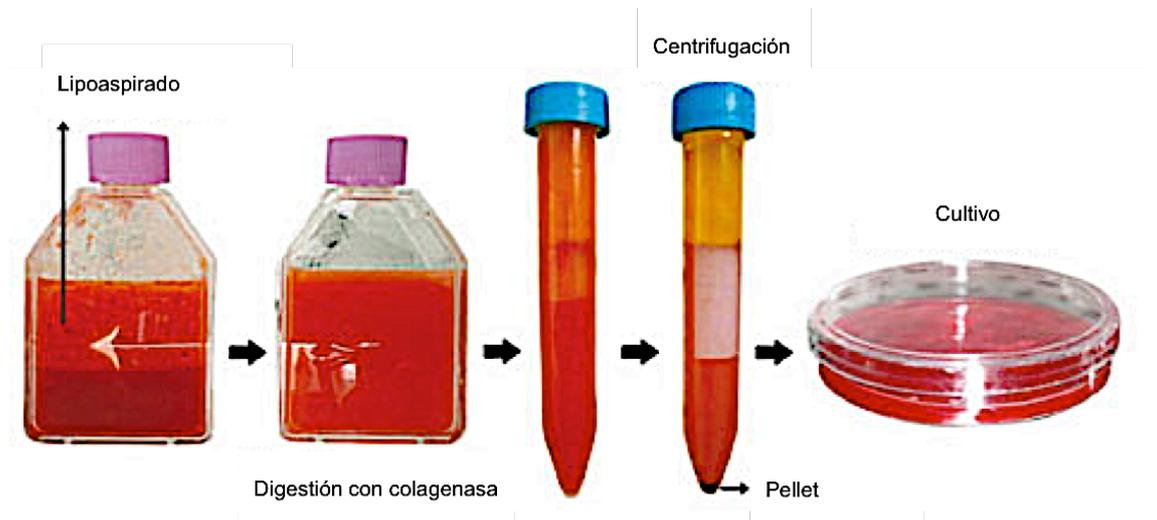


Figura 1. Procesamiento de “Stem Cells” derivadas de un lipoaspirado.

Las CSM representan una herramienta terapéutica que podría aplicarse a diversas enfermedades degenerativas e inmunes. Debido a su amplia capacidad de autorrenovación, proliferación, multipotencialidad ^[19,20], propiedades inmunomoduladoras y a la capacidad para ser modificadas por técnicas de ingeniería molecular, se han demostrado útiles para la reparación y regeneración de tejidos tanto en estudios preclínicos como clínicos, principalmente en el sistema cardiovascular, aparato locomotor, trasplante hematopoyético, tracto gastrointestinal, páncreas e incluso en el sistema nervioso central. Su vía de administración puede ser mediante inyección intravenosa o por administración *in situ*.

A nivel óseo, las CSM influyen directamente en la homeostasis, por tanto cabe pensar, que la pérdida de funcionalidad celular que allí ocurre, puede ser tratada con CSM cultivadas e injertadas en ese tejido ^[21]. Existen estudios, que previamente han identificado células madre en los discos intervertebrales (DIV) y concretamente en el núcleo pulposo (NP) ^[22-24]. En esta ocasión, hemos dirigido la investigación a los discos cervicales, cuya anatomía y biomecánica específica, podrían condicionar una diferente degeneración del disco, a nivel celular y molecular. Difieren la carga y la movilidad a la que son sometidos los DIV cervicales respecto a la zona lumbar, siendo en esta última una degeneración condicionada sobre todo por carga ^[25].

El área cervical, es sobre todo móvil y la influencia de la movilidad se ha analizado con el ejercicio físico, que estimula la reparación del disco y la proliferación de CSM en modelos animales, de forma diferente a lo largo del raquis ^[26].

El NP del disco es avascular, con un ambiente hipóxico y de carga física, la degeneración a ese nivel, supone una probable merma en la capacidad de regeneración de las células mesenquimales, por lo tanto, uno de los objetivos de la terapia regenerativa es mejorar el microambiente que existe y estimular la proliferación celular desde el momento inicial de la lesión, a través de la implantación de CSM en el disco, potenciando su capacidad regenerativa ^[27]. El término célula troncal, célula madre o “stem cell”, define una célula progenitora, autorrenovable, capaz de regenerar uno o más tipos celulares diferenciados.

Estas células poseen la capacidad de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que están programadas y por tanto, producir células de uno o más tejidos adultos, funcionales y plenamente diferenciados, en función de su grado de multipotencialidad. La mayoría de los tejidos de un individuo adulto poseen una población específica propia de células troncales, que permiten su renovación periódica o su regeneración cuando se produce un daño tisular. Hasta hace poco tiempo, se creía que las células troncales adultas presentes en un determinado tejido, sólo se diferenciaban dando lugar exclusivamente a los tipos celulares propios de dicho tejido, sin embargo, actualmente se ha puesto de manifiesto que en los seres vivos adultos, existen varios tipos de células troncales capaces de encontrarse localizadas en un tejido y generar células especializadas de otro diferente ^[28]. Por tanto, el hecho de que podamos aislar células madre en discos degenerados, nos crean expectativas sobre la posibilidad de una regeneración celular posible a través de ellas. Dichas células pueden ser cultivadas *in vitro*, mostrando una proliferación ilimitada y la capacidad de diferenciarse a cualquier otro tipo de célula mesodérmica ^[29].

En los últimos años, varios grupos han investigado el potencial de las células troncales mesenquimales en la reparación y regeneración de tejidos, dejando patente la capacidad de diferenciación de estas células, a lo largo de varias rutas definidas *in vitro*, en concreto para reparar patología esquelética ^[30,19], cartilaginosa ^[31,32], muscular ^[33] y tendinosa ^[34], siendo los resultados prometedores (Figura 2).

LA GÉNESIS DEL TEJIDO MESODÉRMICO

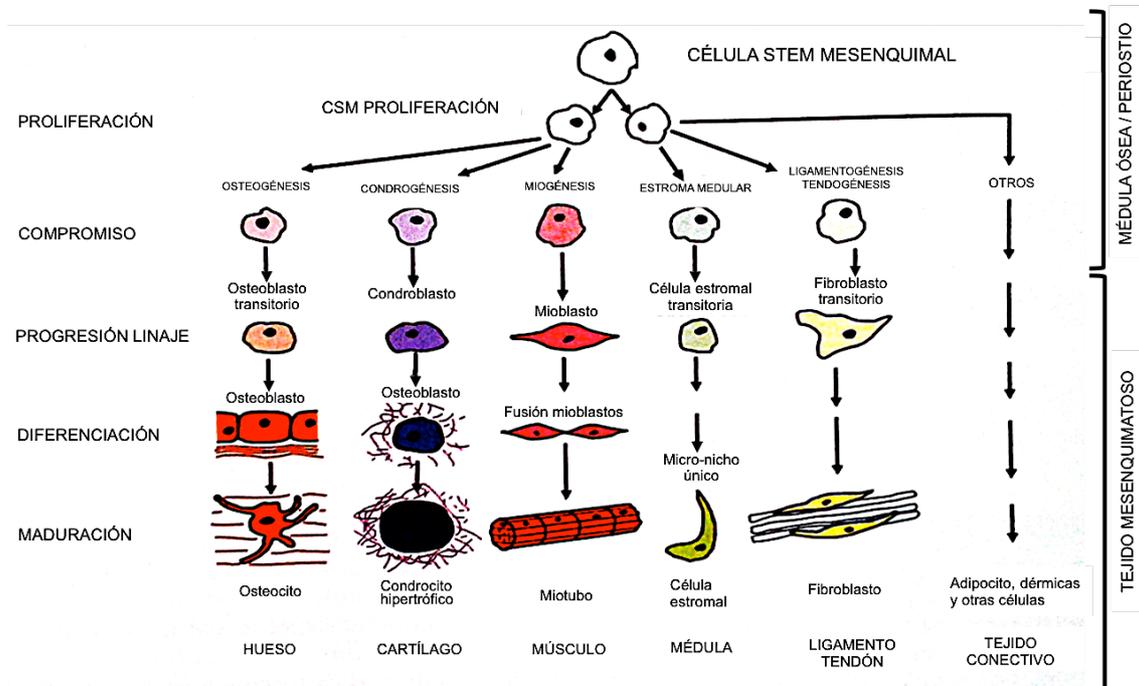


Figura 2. El proceso mesogénico (esquema generado en 1980 por los investigadores de la época). Imagen tomada de “Principles of Regenerative Medicine”, second edition. Academic Press. Figura 14.1 p.254 parte II capítulo 14: MSCs in Regenerative Medicine.

1.1 El disco intervertebral

El disco intervertebral forma una sínfisis o anfiartrosis entre dos vertebra adyacentes (Figura 3), representa la mayor estructura avascular del organismo y supone en el hombre el 20-33% del total de la longitud de la columna

vertebral, transmite y amortigua las cargas axialmente, además de permitir el movimiento, en una estructura por lo demás rígida. Junto con las articulaciones facetarias son las estructuras más expuestas a las cargas en la columna.

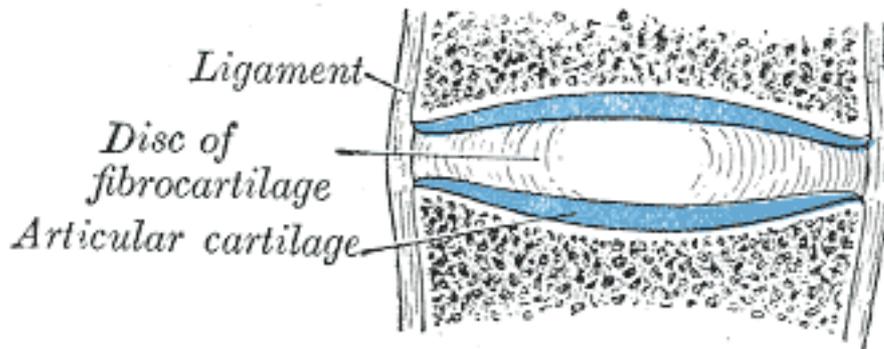


Figura 3. Anfiartrosis (sínfisis)

El disco vertebral es un tejido en el que el proceso degenerativo es frecuente y además de inicio precoz, comenzando ya en la edad infantil ^[35], este deterioro, puede manifestarse clínicamente como una hernia, una estenosis o simplemente como una degeneración local. Junto con las articulaciones facetarias, determinan el grado de degeneración de la columna vertebral en su conjunto.

El disco vertebral por otro lado, es el órgano más grande que contiene tejido fibroso del cuerpo humano, tiene un anillo exterior (anillo fibroso (AF), hecho de fibras resistentes de colágeno que unen el disco a los cuerpos vertebrales adyacentes, fibras de Sharpey) y un núcleo interior (núcleo pulposo (NP)). Éste último, está formado por un tejido cartilaginoso blando que contiene células

(condrocitos like) y la denominada matriz extracelular (sustancia fundamental), hecha de moléculas de alto peso molecular (proteoglicanos como el sulfato de condroitina). Estas sustancias, tienen una gran capacidad para retener el agua, siendo el contenido hídrico de los discos del 75–90%. Puesto que el disco no está directamente conectado al sistema vascular del cuerpo, su nutrición sólo está asegurada por difusión a través de las superficies cartilagosas y óseas de los cuerpos vertebrales adyacentes, concretamente atravesando los platillos vertebrales epifisarios (EP del inglés “endplates”) (Figura 4).

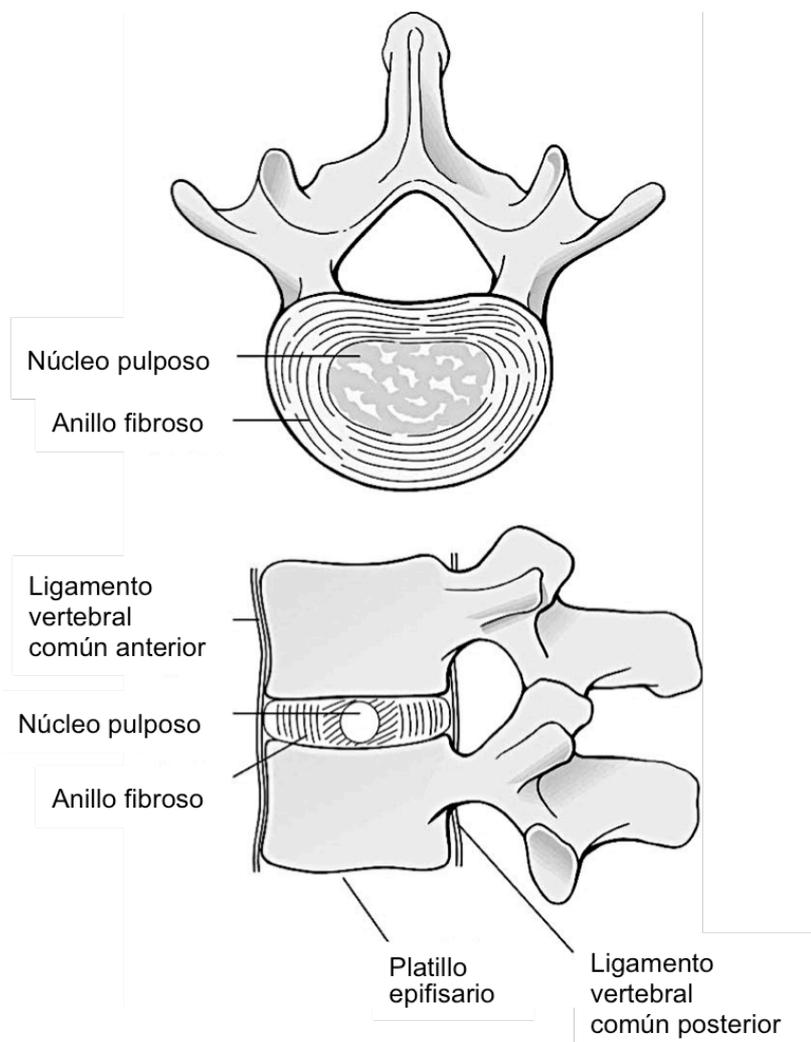


Figura 4. Disco intervertebral

1.1.1 Desarrollo del disco intervertebral

La columna vertebral empieza a desarrollarse durante la tercera semana de gestación con la formación del ectodermo, el mesodermo y el endodermo. A medida que las células de la línea primitiva se van diferenciando, se forma la notocorda, que sirve de base para la formación del esqueleto axial (Figura 5).

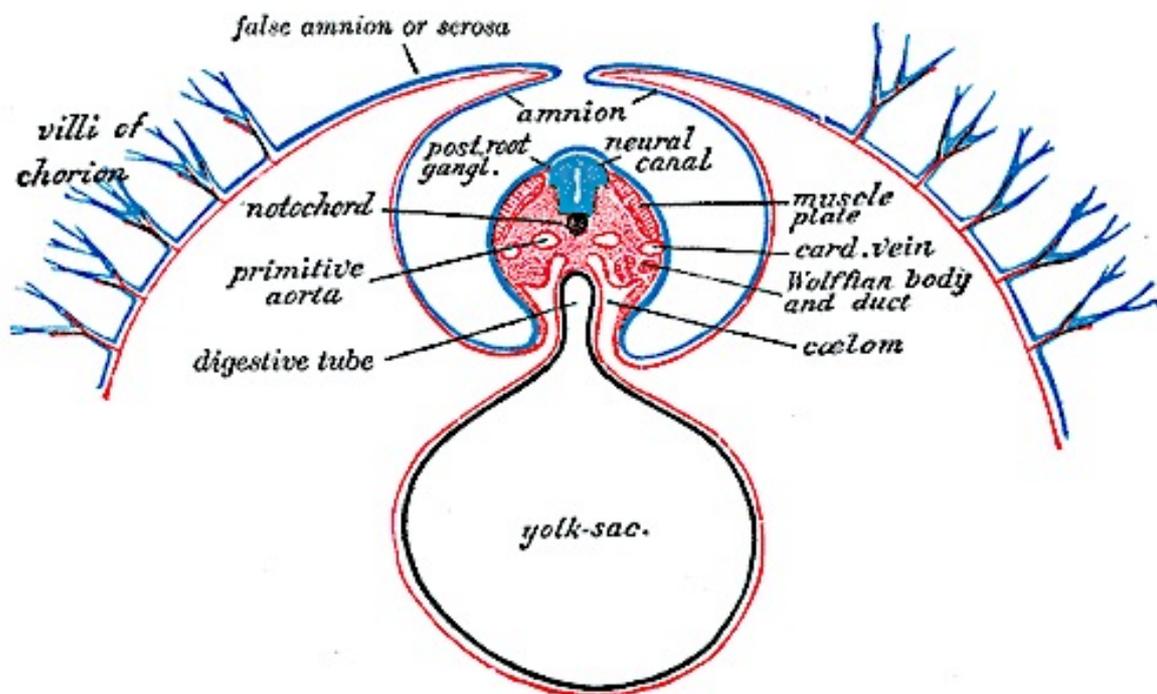


Figura 5. Desarrollo embrionario

La columna, se desarrolla a partir de la condensación de las células mesenquimatosas. Estas células se segmentan en bandas claras y oscuras alternantes que forman, respectivamente, los cuerpos vertebrales y los discos intervertebrales (Figura 6)

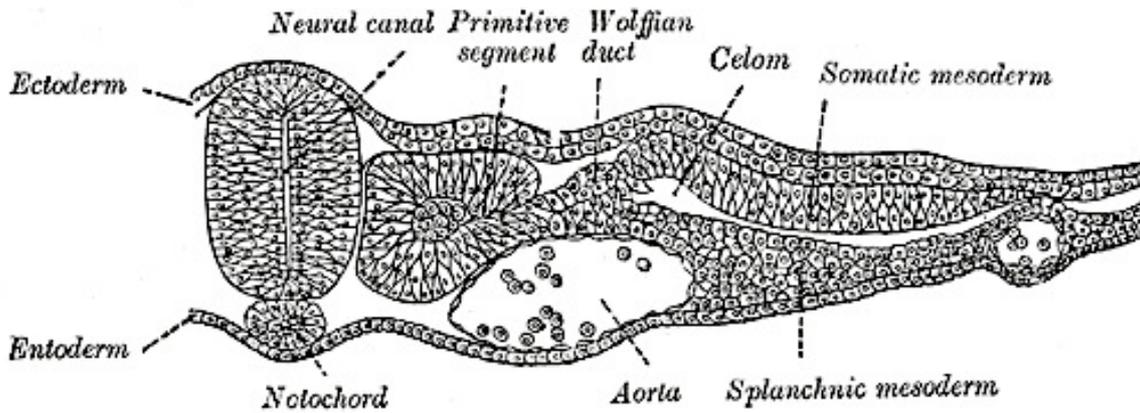


Figura 6. Desarrollo embrionario canal raquídeo

El núcleo pulposo, surge a partir de una expansión de células que rodean el cartilago primitivo de la propia notocorda (Figura 7). Las células de la notocorda tienen un papel crucial en la formación de la matriz del núcleo pulposo. Resultan empujadas en agrupaciones celulares, lo que se conoce como *chorna reticulum*, por la formación de la matriz extracelular. Se cree que las células de la notocorda permanecen activas hasta la segunda década de la vida, momento a partir del cual raramente se observan.

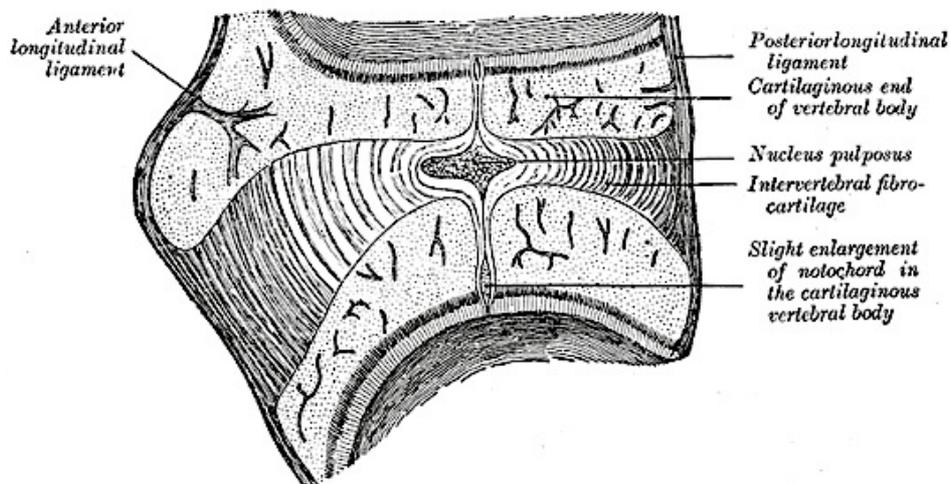


Figura 7. Núcleo Pulposo

Al igual que otros tejidos conectivos, el disco intervertebral contiene una escasa población celular y una abundante matriz extracelular. El anillo fibroso externo contiene principalmente colágeno de tipo I y fibroblastos. En esta región, las fibrillas de colágeno de tipo I están orientada paralelamente para formar láminas concéntricas; la ordenación se parece a las capas de una cebolla (Figura 8). Cada capa concéntrica del anillo fibroso contiene fibras de colágeno de tipo I que está orientada aproximadamente a unos 30° del eje longitudinal de la columna. Las capas, alternantes, se orientan en direcciones opuestas para proporcionar al tejido una integridad estructural óptima y una gran resistencia a la torsión y a las fuerzas de cizallamiento.

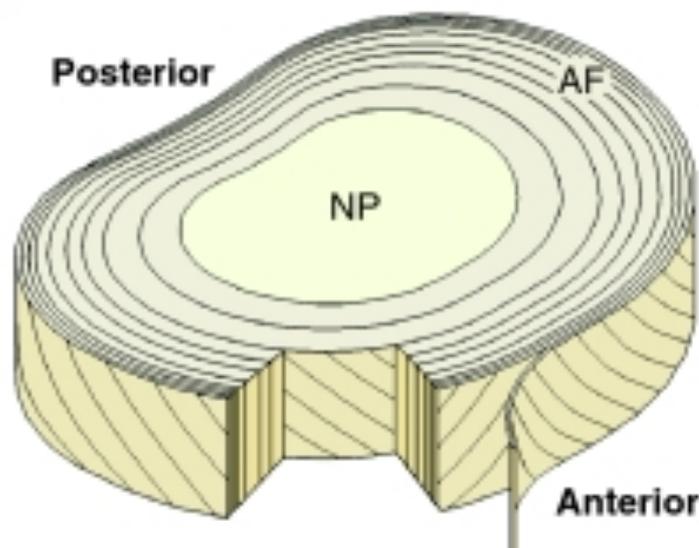


Figura 8. Fibrillas anillo fibroso

Existe una delgada zona de transición que separa el anillo fibroso del núcleo pulposo. El núcleo pulposo es la región más central del disco y contiene una matriz rica en proteoglicanos con fibras de colágeno orientadas de forma

aleatoria (principalmente colágeno de tipo II). Grandes agregados de proteoglicanos hidrófilos, situados en el núcleo pulpos, proporcionan rigidez y viscoelasticidad al disco. Así, dentro del núcleo pulpos, una pequeña población celular mantiene una vasta matriz extracelular.

Los platillos epifisarios que limitan ventral y caudalmente el disco, están formados por un hueso compacto especializado. El hueso, es sustancialmente más grueso a lo largo de la periferia del disco que en su región central. Este hueso periférico más grueso, proporciona un soporte estructural, mientras que la región central, permite un mayor contacto entre los capilares del platillo epifisario y el disco subyacente (Figura 9), estos platillos óseos, están cubiertos por una capa de cartílago hialino que separa el hueso del núcleo pulpos y actúa como una barrera a la difusión, permitiendo solamente el paso de pequeñas moléculas no cargadas de dentro afuera del disco en una cantidad significativa.

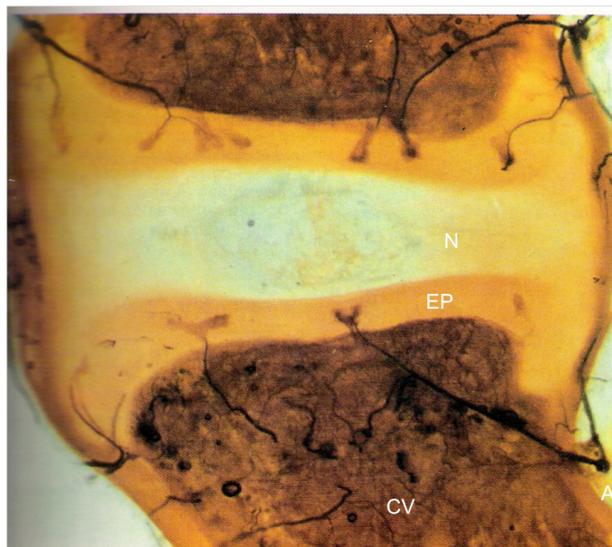


Figura 9. Vías de nutrición

A: Riego sanguíneo, CV: Vertebra, N: Núcleo, EP: Platillo vertebral epifisario

A medida que envejecen se calcifican y esta calcificación afecta al metabolismo discal, pues limita posteriormente el aporte de nutrientes y la eliminación de los productos de deshecho. Por tanto, las células del interior del disco viven en un entorno nutricional comprometido que empeora con la edad y que se ha postulado como uno de los factores implicados en la degeneración discal.

1.1.2 Anatomía normal del disco intervertebral y las carillas articulares

El segmento básico de movimiento de la columna vertebral, está compuesto por un disco intervertebral anterior y dos carillas posteriores. Este complejo de tres articulaciones, permite el movimiento y resiste a las fuerzas de compresión ejercidas a través de la columna vertebral. Si bien se produce movimiento en las tres principales articulaciones, el disco intervertebral proporciona la mayor resistencia a la compresión, mientras que las carillas permiten la rotación, la inclinación lateral y la extensión.

El disco intervertebral actúa como una estructura de soporte de carga, con dos componentes distintos: el núcleo pulposos y el anillo fibroso. Cada componente tiene unas propiedades biomecánicas totalmente distintas. El núcleo pulposos, rico en proteoglicanos, funciona como una masa semilíquida viscosa interna, mientras que el anillo fibroso, rico en colágeno, funciona como un contenedor fibroso laminar. La combinación única de las propiedades bioquímicas y biomecánicas del núcleo pulposos y el anillo fibroso, permiten que el disco intervertebral absorba y disperse las fuerzas de carga normales que experimenta la columna vertebral. La presunción es que, incluso cuando el

núcleo pulposo o el anillo fibroso están comprometidos estructuralmente, los cambios degenerativos progresarán debido a la alteración de la distribución de fuerzas mecánicas a través de la unidad funcional de la columna.

Las articulaciones de las carillas son verdaderas articulaciones sinoviales, que sufren cambios degenerativos similares, a los de la artrosis vista en otras articulaciones, siendo una de las principales estructuras estabilizadoras del segmento de movimiento vertebral. A medida que progresa la cascada degenerativa y se pierde el soporte de la columna anterior, las articulaciones de las carillas soportan más carga. Con la progresiva degeneración de la columna, los patrones de carga de las articulaciones de las carillas se alteran y ocasionan cambios estructurales en las mismas.

1.1.3 Biomecánica del disco

1.1.3.1 Consideraciones biomecánicas sobre la estabilidad de la columna

La columna es una estructura mecánica y las vértebras, presentan articulaciones entre ellas, sometidas al control de todo un complejo sistema de palancas (vértebras), pivotes (carillas y discos), limitadores pasivos (ligamentos) y elementos activadores (músculos). El conocimiento integral de su biomecánica, cobra una importancia primordial, para entender todos los aspectos que atañen al análisis clínico y al tratamiento de los problemas de la columna. Un requisito previo, necesario, consiste en comprender de forma

básica aquellos términos y conceptos de ingeniería, aplicables a la biomecánica osteomuscular y de la columna.

1.1.3.2 Propiedades físicas y biomecánica funcional del disco intervertebral

Las tres funciones básicas de la columna consisten en transmitir el peso, permitir el movimiento y proteger una estructura noble como la médula espinal. Su anatomía parece cumplirlas de forma óptima (Figura 10). En su conjunto, consta de 7 vértebras cervicales, 12 torácicas, 5 lumbares, 5 sacras fusionadas entre sí y tres o cuatro segmentos coccígeos también fusionados. Al contemplarla en un plano frontal, por regla general parece recta y simétrica.

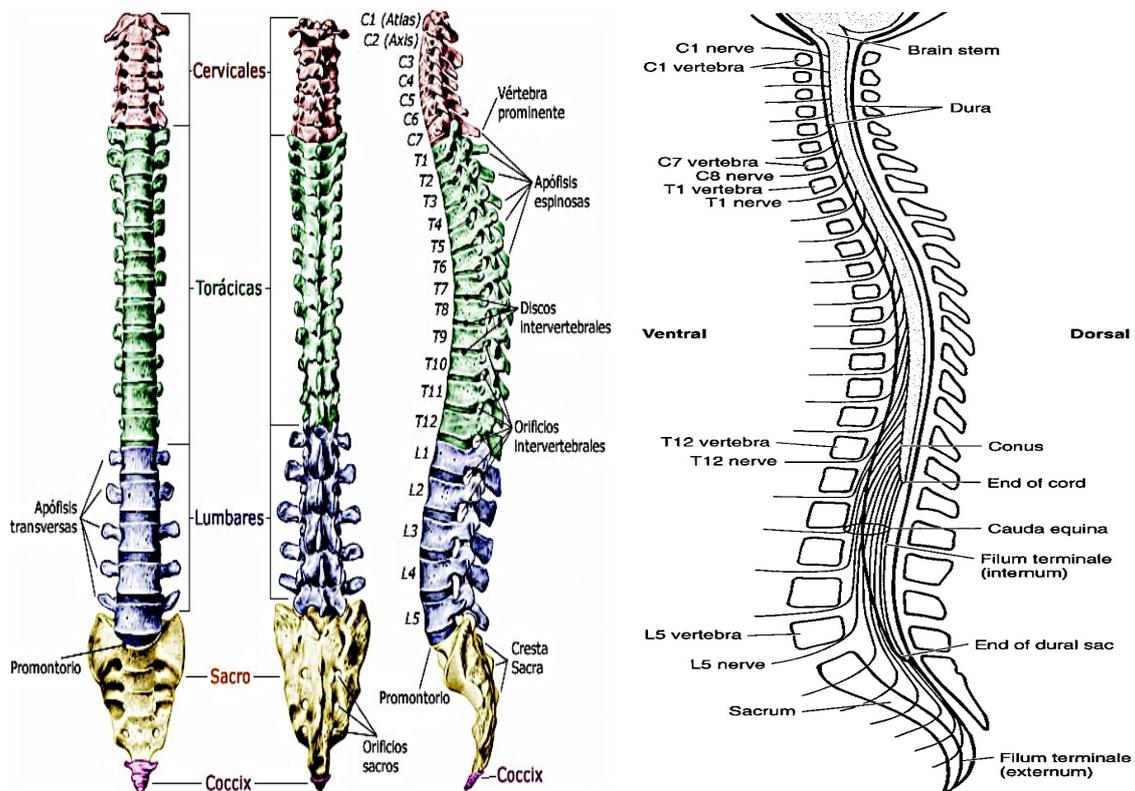


Figura 10. Columna vertebral y médula espinal

El plano sagital, revela sus cuatro curvas normales (Figura 11). Estas curvas, orientan su lado convexo hacia adelante en las regiones cervical y lumbar, y hacia atrás en las regiones torácicas y sacrococcígea. Existe una base mecánica que justifica estas curvas anatómicas normales, dotando a la columna de mayor flexibilidad y de una capacidad amortiguadora más amplia, a la vez que mantienen la rigidez y estabilidad suficientes a nivel de las articulaciones intervertebrales.

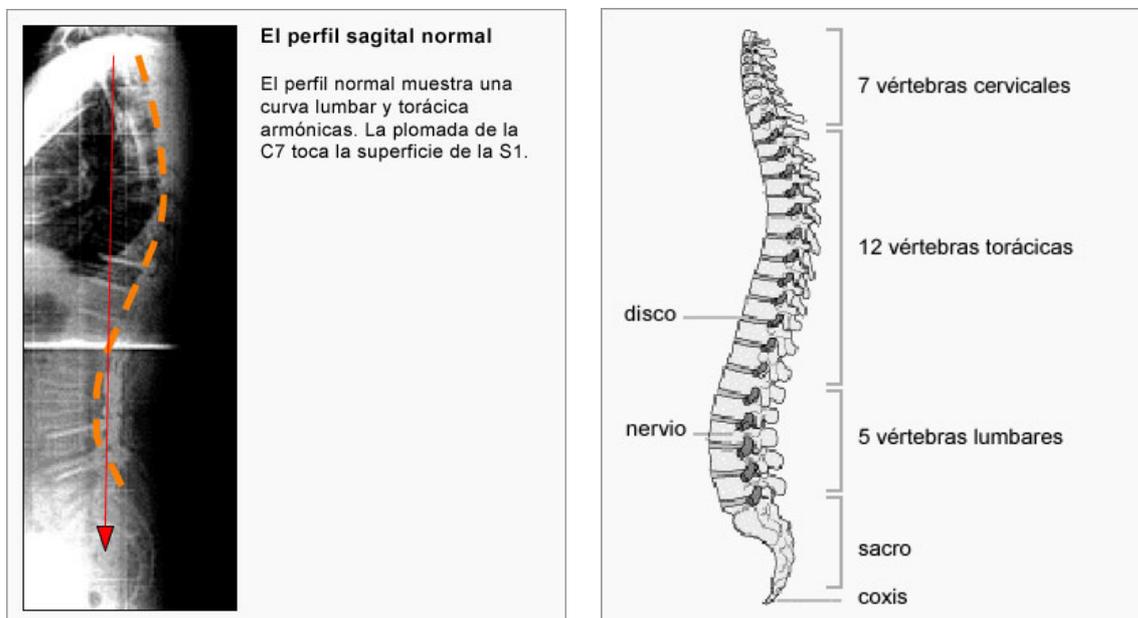


Figura 11. Perfil sagital normal

El disco intervertebral está sometido a toda una diversidad de fuerzas y momentos. Junto a las articulaciones interapofisarias, tienen la responsabilidad de transportar todas las cargas de compresión que recibe el tronco. Determinadas porciones suyas se ven expuestas a tensión durante los movimientos fisiológicos de flexión, extensión e inclinación lateral. La rotación

axial del tronco, con respecto a la pelvis crea unas cargas de torsión, que se traducen en la acción de unas fuerzas de cizallamiento sobre el disco. Como se sabe los movimientos de rotación van acoplados a los de inclinación, las presiones experimentadas por el disco, reúnen una combinación de fuerzas de tensión, compresión y cizallamiento con estos movimientos.

1.1.3.3 Características de compresión del disco

La carga de compresión se traslada desde el platillo de un cuerpo vertebral al siguiente a través del núcleo pulposo y el anillo fibroso. Durante los primeros años de la vida (hasta los 30), el núcleo posee suficiente hidratación para actuar como una masa gelatinosa o viscoelástica. Al aplicarle un peso, se crea determinada presión sobre el núcleo, esta presión hidrostática, empuja a las estructuras vecinas en todas las direcciones dispersándolas desde su centro, generando la compresión, unas tensiones complejas sobre el anillo. La situación es diferente cuando el núcleo está seco (deshidratado), en este caso, el mecanismo de transferencia de las cargas se encuentra muy alterado, debido a que el núcleo es incapaz de admitir la suficiente presión hidrostática. Por consiguiente, los platillos vertebrales quedan sometidos a una presión menor en el centro y las cargas se distribuyen más hacia la periferia, cambiando las tensiones que actúan sobre el anillo. Cuando el disco está degenerado, en sus capas externas recae menos tensión periférica, más presión axial y mucha más fuerza sobre las fibras.

Los experimentos desarrollados por *Virgin* ^[36] mostraron que aunque los discos sometidos a elevadas cargas de compresión manifestaran una deformación permanente, no se producía una hernia del núcleo pulposo. Incluso al efectuar una incisión longitudinal en la parte posterolateral del anillo fibroso que llegara hasta el centro y aplicar una compresión sobre la pieza, las propiedades elásticas registraban pocos cambios e indudablemente no se producía una hernia de disco. Este trabajo, así como los experimentos sucesivos de *Hirsch* ^[37], *Markolf y Morris* ^[38] y *Farfan y cols.* ^[39], sugieren que la hernia discal, no está ocasionada por una compresión excesiva, aunque sí sea posible que aparezcan nódulos de Schmorl como consecuencia de una carga (Figura 12). Esto implica que la tendencia del disco a su hernia posterolateral, tal como se observa en las situaciones clínicas, no es inherente a su estructura sino que debe depender de determinadas circunstancias de carga diferentes a la compresión.

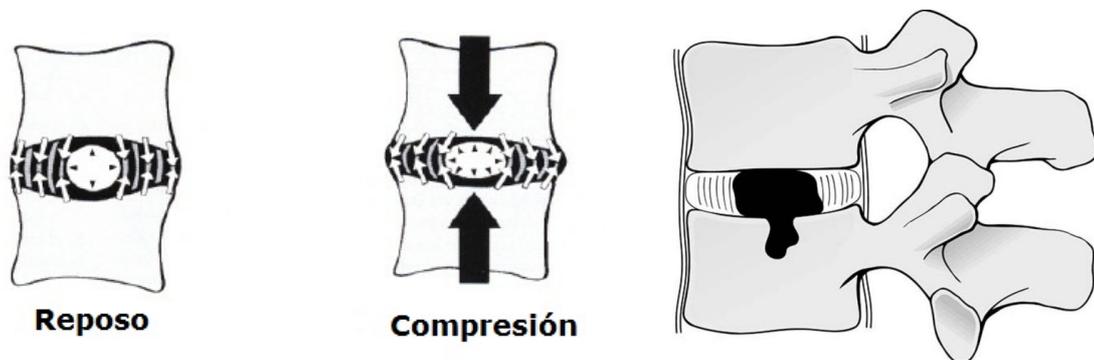


Figura 12. Compresión, nódulo de Schmorl

1.1.3.4 Propiedades elásticas del disco

Aunque en la clínica el disco jamás está cargado puramente por un estado de tensión, estas fuerzas actúan sobre algunas de sus partes durante los

movimientos fisiológicos. *Markolf*^[38] estudió las propiedades elásticas del disco como tal estructura y descubrió que era menos rígido en una situación de tensión, que bajo una compresión. Esto lo atribuyó a la intensificación de la presión hidrostática en el interior del núcleo, al recibir la carga de compresión. Asimismo, debido a la naturaleza líquida del núcleo y al efecto de *Poisson*, el disco se abomba durante la compresión y se contrae en tensión (Figura 13).

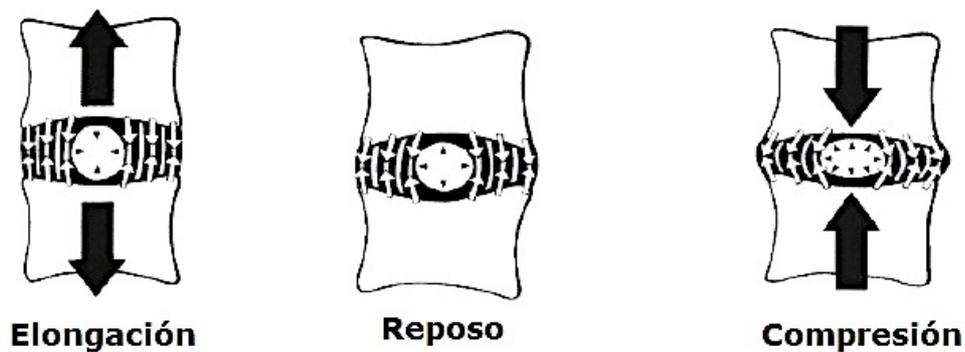


Figura 13. Tensión-Compresión sobre el disco

1.1.3.5 Características de flexión del disco

La columna está sometida a fuerzas de tensión sobre su lado convexo y a fuerzas de compresión sobre el cóncavo cuando se aplican pesos que la doblan en circunstancias de flexión, extensión e inclinación lateral. Por tanto, su acción se puede concebir como una combinación de cargas de tensión y de compresión, en cada caso depositadas sobre la mitad del disco. Las presiones de flexión y de torsión suscitan un interés especial, porque los datos experimentados apuntan hacia ellas y no hacia las cargas de compresión, como los factores más nocivos para el disco (Figura 14). Una inclinación de 6°

a 8° en el plano sagital, en el frontal y en otros planos verticales no provoca un fracaso del disco lumbar. Sin embargo, después de eliminar los elementos posteriores y con una inclinación (flexión) de 15°, sí que se produce este fallo.

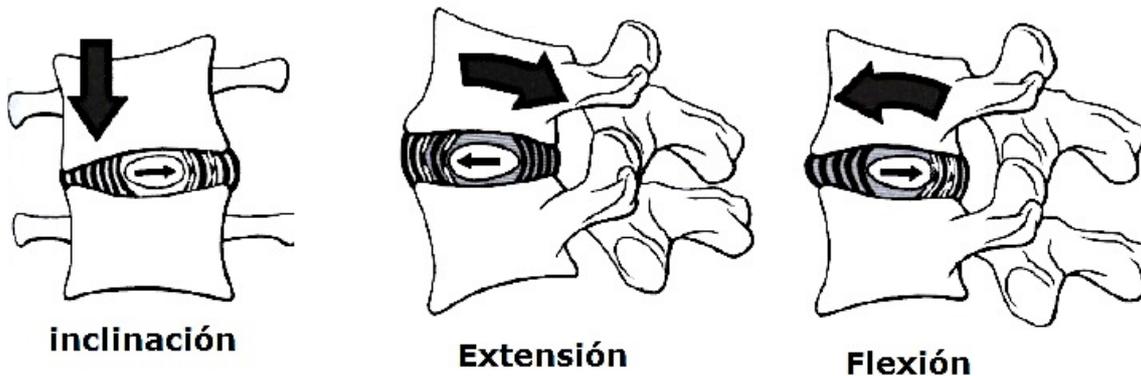


Figura 14. Flexión y torsión sobre el disco

1.1.3.6 Comportamiento del disco frente a la torsión

Cuando el disco está sometido a una torsión, surgen fuerzas de cizallamiento que siguen el plano horizontal y el axial. Su magnitud varía en proporción directa a la distancia que las separa desde el eje de rotación. En los planos intermedios entre el horizontal y el axial existen otras combinaciones de presiones. *Farfan y cols.* ^[39] propusieron en 1973 la hipótesis de que la torsión pueda ser la principal carga causante de lesión. Una construcción vértebra-disco-vértebra (incluido los elementos posteriores) fue sometida a una presión de torsión en torno a un eje fijo que atravesaba la cara posterior del disco. Se aplicó un momento dinámico y se recogieron datos hasta el momento de producirse un fracaso. De este modo pudo observarse que las curvas angulares del momento dinámico eran sigmoides, con tres fases distintas. En la

primera podría producirse una deformación de 0° a 3° por un pequeño momento dinámico (por tanto, dentro de la zona neutra). En la intermedia, que consta de una rotación de 3° a 12°, había una relación lineal entre el momento dinámico y la deformación angular. En la última, por regla general hacían falta unos 20° de rotación para provocar su fracaso. El ángulo en que esto tenía lugar era un poco menor en los discos degenerados. Antes de consumarse su fallo siempre se advirtieron sonidos secos de chasquidos procedentes de la pieza, concluyendo que el momento dinámico medio para el fracaso era un 25° mayor en los discos normales que en los anormales.

1.1.3.7 Características de cizallamiento del disco

El cizallamiento es la fuerza que actúa en el plano horizontal, que es perpendicular al eje mayor de la columna. Genera fuerzas de corte cuya magnitud es más o menos equivalente por todo el anillo y siguen un trayecto paralelo a la fuerza de cizallamiento aplicada. Se observó que la rigidez de cizallamiento en el plano horizontal (en dirección anteroposterior y lateral) era aproximadamente de 260N/mm. Este valor es elevado y tiene importancia clínica, pues pone de manifiesto, que hace falta aplicar una gran fuerza para producir un desplazamiento horizontal anómalo en una unidad normal del disco intervertebral. Esto significa, que resulta relativamente raro el fracaso clínico del anillo únicamente debido a la presión de cizallamiento pura. Cuando aparece el signo clínico de la rotura anular quiere decir que hay muchas más probabilidades de que el disco haya fallado por una combinación de inclinación, torsión y tensión.

1.1.3.8 Propiedades de fluencia y relajación del disco

El disco intervertebral presenta las cualidades de fluencia y relajación, *Kazarian* ^[40] realizó pruebas de fluencia sobre unidades vertebrales funcionales (UVF) y clasificó en cuatro grados los discos de las piezas analizadas, de 0 a 3, según la gravedad de su degeneración. Observó una relación, entre las características de fluencia y el grado correspondiente del disco. Los discos sin degenerar (grado 0), cambian con lentitud y alcanzan su situación de deformación final, pasado un tiempo considerable en comparación con los ya degenerados (grados 2 y 3). La curva del grado 0, resulta propia de una estructura más viscoelástica que las curvas de grados 2 y 3. Por tanto, el proceso degenerativo reduce la viscoelasticidad del disco. Esto quiere decir que, según avanza la degeneración, el disco pierde su capacidad para atenuar los impactos y repartir las presiones por el platillo vertebral en su integridad.

1.1.3.9 Propiedades de histéresis del disco

Todas las estructuras viscoelásticas, incluido el disco y la unidad vertebral funcional, manifiestan una histéresis. Este es un fenómeno que provoca una disminución de la energía cuando la estructura se ve sometida a ciclos repetidos de carga y descarga. La histéresis parece variar con el peso aplicado y con la edad del disco, así como con su altura en la columna, cuanto más grande sea la carga, mayor será la histéresis. Es más acusada en las personas muy jóvenes y menos en las de media edad. *Virgin* ^[36] observó que los discos torácicos inferiores y lumbares superiores, mostraban menos histéresis que los

lumbares inferiores y que esta propiedad disminuía, cuando el mismo disco recibía una carga por segunda vez.

1.1.3.10 Tolerancia a la fatiga del disco

Una carga breve ocasiona un daño estructural irreparable en el disco intervertebral, cuando genera una presión sobre un punto dado, de valor superior a la presión máxima de fracaso. El mecanismo por el que se produce cualquier fallo, durante la aplicación prolongada de una carga, cuya magnitud sea relativamente pequeña, no tiene nada que ver y se debe a un fracaso por fatiga. En un lugar sometido a una presión teórica relativamente alta (pero mucho menor, que la presión máxima de rotura o incluso que su límite elástico) aparece un desgarro y con el tiempo, crece y desemboca en un fallo completo del disco (Figura 15).

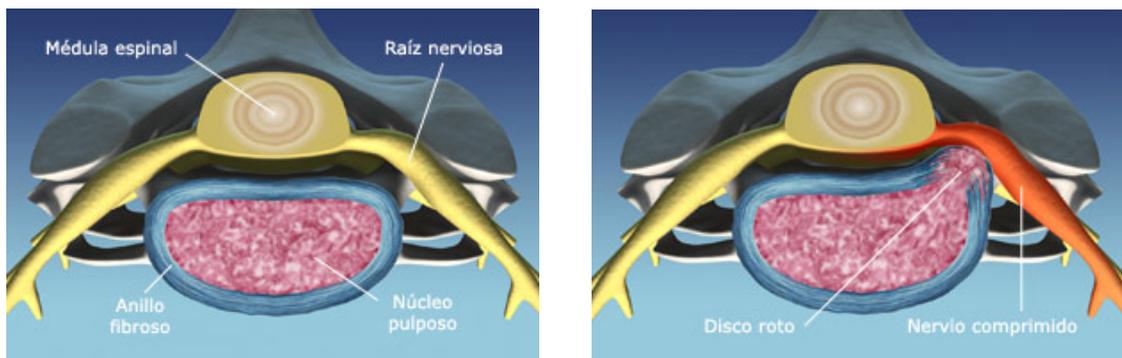


Figura 15. Disco sano y hernia discal

1.2 Morfología de la degeneración discal

La degeneración del disco está caracterizada, por una alteración estructural. La cantidad de agua y la altura del disco disminuyen. La carga, continua sobre el anillo fibroso aumenta el índice de fisuras, lo cual debilita su resistencia mecánica. Esto puede causar una protrusión del disco en el canal vertebral y la compresión de las raíces nerviosas (Figura 16). La pérdida de altura del disco hace aumentar la carga en las carillas articulares y acelera los cambios relacionados con la degeneración, estableciéndose un círculo vicioso.

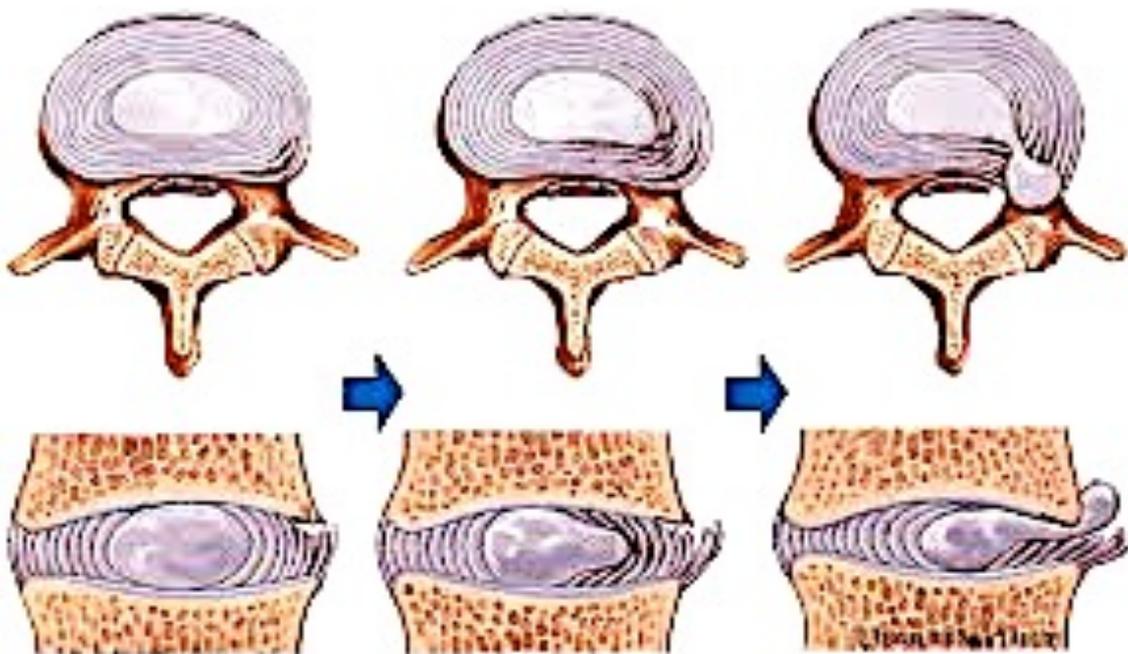


Figura 16. Evolución de la degeneración discal hasta la hernia

1.2.1 El disco normal a nivel celular

El disco, básicamente consta de una matriz de fibras de colágeno inmersa en un gel de agua y proteoglicanos, sin embargo, su composición molecular y la organización de la matriz cambia según la zona, así en el anillo fibroso la disposición de sus fibras es concéntrica, con alto contenido en colágeno, alrededor de un núcleo pulposo más hidratado con abundancia de proteoglicanos.

La celularidad de la matriz es escasa (5500 células/mm²), siendo los condrocitos vitales para mantener y conservar esta matriz, abundando más en las zonas más vascularizadas, platillos vertebrales y periferia. Aunque no están caracterizadas por completo todas las células del disco, existen diferentes tipos, capaces de cultivarse y producir varios grupos de proteínas de matriz extracelular.

Existe diferencia, al igual que en su origen embrionario, entre las células del anillo fibroso y núcleo pulposo, las células del NP proceden de la notocorda, y su desaparición se produce en el hombre entre los 4 y 10 años, quedando células parecidas a condrocitos redondeados, con cápsula y prolongaciones hacia la matriz. Las células del anillo también son redondeadas, con unas prolongaciones más largas y delgadas que se extienden a lo largo de las fibras de colágeno (Figura 17).

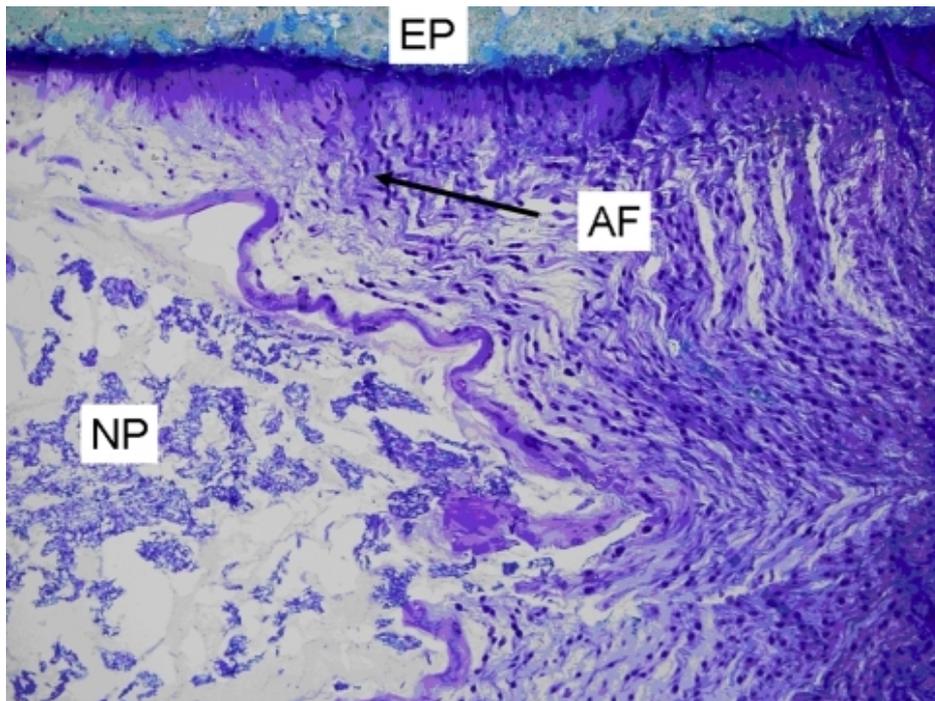


Figura 17. Disco intervertebral al microscopio óptico

NP: Núcleo Pulposo

AN: Anillo Fibroso

EP: Endplate (platillo vertebral)

1.2.2 Las moléculas que constituyen la matriz del disco

La composición química de los disco es compleja, al igual que la del cartílago articular, son compuestos que interaccionan entre si y modifican, las propiedades mecánicas y la fisiología del disco, pudiendo interaccionar las células con la matriz a través de integrinas y recibir alteraciones de la configuración o deformación de la matriz (traducción mecánica) y modificar la biosíntesis de enzimas oportunas, degenerativas o constituyentes de matriz. Así en la mayoría de los discos degenerados, aparecen fenómenos de fragmentación y degradación de la matriz consecuencia de esta descomposición enzimática.

1.2.2.1 Agrecano y otros proteoglicanos

El agrecano (Figura 18), es el proteoglicano (PGC) más abundante en el disco, en los sanos y jóvenes constituye el 70% del peso en seco del NP y el 25% del AF, es el responsable de atraer y retener el agua en el interior de la matriz extracelular. Los proteoglicanos son una gran familia de glicoproteínas con un núcleo proteico (en el disco, el agrecano) al que se encuentra unido por un enlace covalente el polisacárido o glicosaminaglicano, con carga muy negativa atrayendo a los cationes. Así, en la matriz del disco, se genera una gran tensión iónica o presión de turgencia capacitando a la matriz a oponerse a la compresión. Varias moléculas de agrecano, recién sintetizadas se unen sobre una cadena del hialuronano a través de la región globular (G1) del núcleo proteico, para formar “agregados”, quedando este enorme conglomerado sellado en la red fibrosa de colágeno que le rodea.

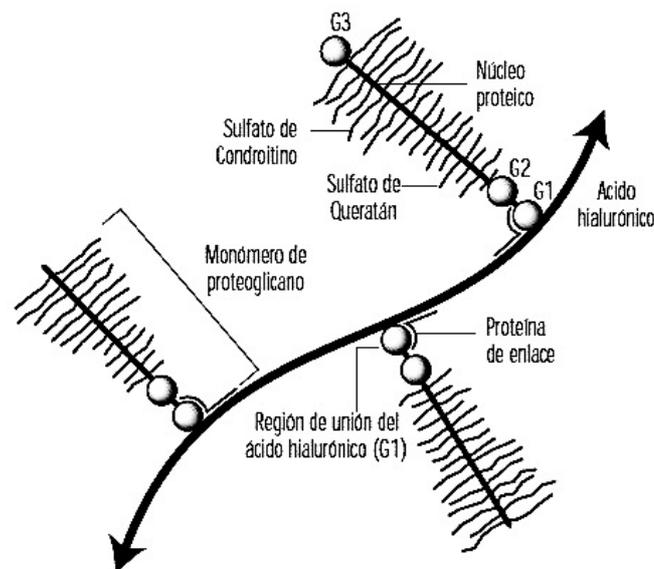


Figura 18. Molécula de agrecano

En la degeneración discal, el hallazgo bioquímico principal es la pérdida de proteoglicanos. Las moléculas de agregano son degradadas por la acción de enzimas, metaloproteinasas de matriz (MMP) y agreganasa, sus pequeños residuos se filtran desde los tejidos, por tanto, la pérdida de glucosaminoglicanos (GAG), implicará un descenso de la hidratación. Sin embargo hasta las células de los discos degenerados conservan la facultad de sintetizar moléculas de agregano.

En el disco, también se encuentran otros pequeños PGCs, que cuentan sólo con una o dos cadenas de GAG, a diferencia de las 100 o más del agregano y no dan lugar agregados. Entre ellos la decorita, biglucano, fibromodulina y lumicano, con un papel más modulador sobre la fibrillogénesis de colágeno o conservación de los factores de crecimiento en el seno de la matriz, que estructural, como era el del agregano. Estos PGCs, también se ven afectados con la degeneración del disco, aumentando al comenzar el proceso degenerativo en el anillo fibroso y descendiendo drásticamente cuando aumenta la degeneración, detectándose también la presencia de su forma degradada.

1.2.2.2 Colágenos

El colágeno es el componente fibrilar de la matriz mixta del disco (Figura 19). La mayor parte en el NP es de tipo II, mientras que en el AF es de tipo I, así engloban el 80% del colágeno total, también existen tipo III, IV, IX, X, XI, XII, XIV, sin tener clara su función, parece que algunos podrían influir en la

formación de las fibrillas de colágeno. Parte de estos, están colocalizados y dan lugar a fibrillas complejas, el tipo XI parece generar un núcleo para ensamblar las fibras tipo II y el tipo IX es superficial, creando enlaces cruzados entre las fibrillas adyacentes. El tipo III y VI están más relacionados con las células.

Aunque el colágeno cambia con la degeneración, los cambios no son tan evidentes como con los PGC, su cantidad absoluta varía poco, pueden observarse cambios en la distribución de los colágenos secundarios y detectarse un aumentando en el grado de desnaturalización enzimática del colágeno tipo II, durante la degeneración. Sin embargo, los estudios realizados sobre los enlaces cruzados de colágeno indican que, una vez más y al igual que en el caso de los proteoglicanos, es posible, sintetizar nuevas moléculas de colágeno, al menos durante una fase incipiente de la degeneración discal, tal vez en un intento de reparar el disco.

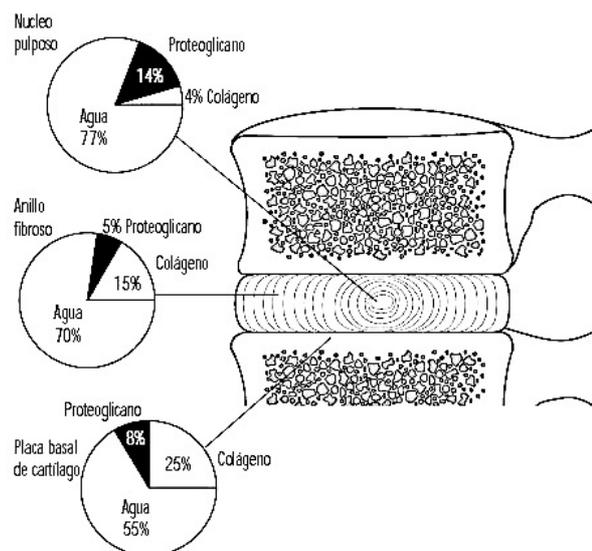


Figura 19. Proporción relativa de los componentes principales del disco y patillo del adulto

1.2.3 Degeneración discal

El DIV es el tejido más precoz del organismo en mostrar cambios degenerativos, desde el nacimiento, se va perdiendo la interfaz entre NP y AF, el núcleo cambia su aspecto de gel, volviéndose más fibroso y perdiendo componentes higroscópicos de la matriz, deshidratándose. La traducción estructural supone pérdida de altura, fisuras, grietas y desorden en las bandas concéntricas que recorren el AF, todo ello permite tipificar la degeneración discal. Este proceso es más frecuente en la columna lumbar y está asociado a dolor. Con la degeneración, aumenta la cantidad de nervios y vasos en zonas más centrales, quedando esta zona restringida a la periferia en el disco sano y joven. También aumenta la celularidad, con mayor producción de agregados sobre todo en NP, aumenta la necrosis y la apoptosis, *Trout y cols.* ^[41] afirman que más del 50% de las células del disco adulto están necrosadas.

Los cambios morfológicos vinculados a la degeneración, han sido analizados por *Boos y cols.* ^[42] que pusieron de manifiesto cambios, incluso en discos de pacientes de 2 años de edad, consistentes en la formación muy tenue de hendiduras y en cambios granulares a nivel nuclear. Por lo tanto hay una clara asociación entre edad y cambio morfológico, con un aumento de muerte celular, proliferación, degeneración mucosa, cambios granulares y desgarramientos concéntricos.

No existe consenso en cuanto a definición, evaluación, diagnóstico o tratamiento de la enfermedad degenerativa discal. Si la degeneración discal,

debe considerarse como una enfermedad, es un tema de debate, puesto que la degeneración es un proceso normal, que habitualmente no produce síntomas clínicos significativos. Aunque los cambios degenerativos apreciados por resonancia magnética (RM), aumentan con la edad, no se corresponden estrechamente con la presencia o progresión de una lumbalgia. Una disminución de la intensidad de señal, en imágenes de RM ponderadas en T2 (Figura 20), que refleja la pérdida de hidratación del núcleo pulposo, es el hallazgo degenerativo que mejor se correlaciona con el envejecimiento del disco.



Figura 20. Disminución de la intensidad de señal, imágenes de RM ponderadas en T2

Sin embargo, estos cambios no permiten distinguir los discos degenerativos sintomáticos de los asintomáticos entre sí. Algunos autores, han sugerido, el uso del término degeneración discal sintomática, en lugar de enfermedad degenerativa discal, para describir los síntomas clínicos sustanciales que parecen ser el resultado de la degeneración del disco intervertebral.

Claramente, es necesario algo más, que la simple deshidratación del disco para producir dolor de origen discal. Un hallazgo patológico, que puede ser significativo, es que existe un crecimiento interno de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas en las fisuras anulares de grosor total. En un disco normal, solamente 1 o 2 mm externos de la superficie anular están inervados y la región más interna del disco carece de inervación. En algunos discos degenerativos, sobre roturas anulares, se han encontrado fibras nerviosas con un receptor de sustancias nociceptivas, como son la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Figura 21). Estas estructuras nerviosas pueden tener un papel en la producción de síntomas discógenos.

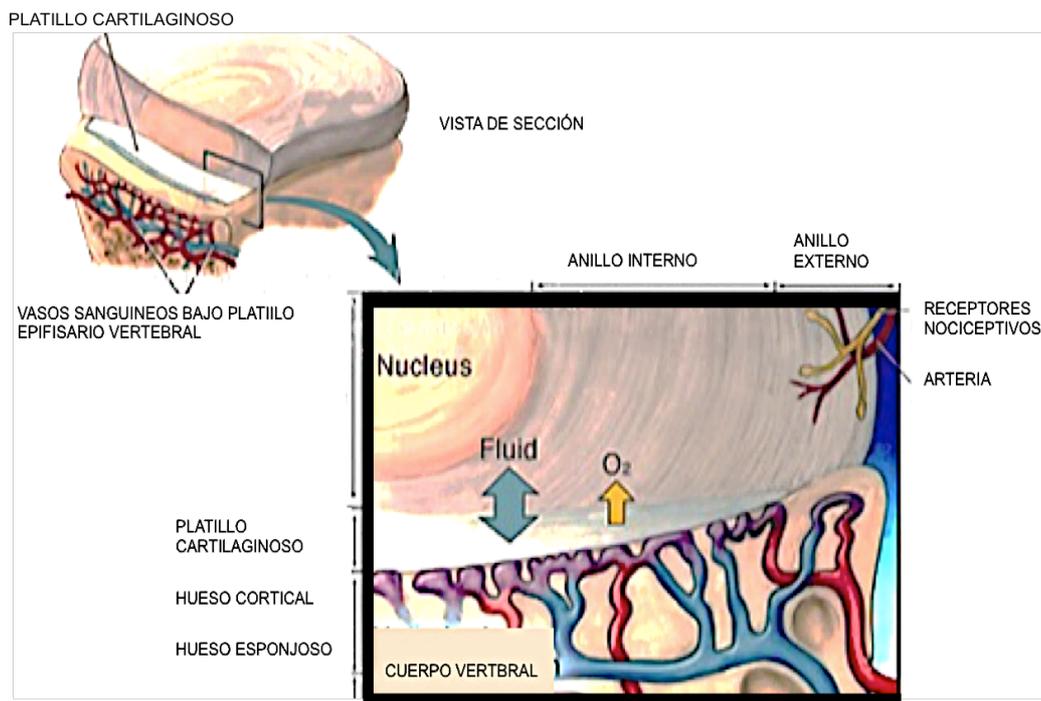


Figura 21. Plexo vasculonervioso discal

Desafortunadamente, la capacidad del clínico para evaluar, de forma objetiva un disco doloroso, es limitada. La discografía, que está ampliamente utilizada

para establecer un disco determinado como origen de dolor, presenta limitaciones bien establecidas (Figura 22). Son necesarias mejores pruebas diagnósticas para guiar la evaluación de los pacientes afectados de una degeneración discal sintomática y el desarrollo de nuevas formas de tratamiento.



Figura 22. Discografía

Múltiples autores sugieren que está indicado un estudio radiológico en un paciente con radiculopatía cuando: 1) existen verdaderos síntomas radiculares; 2) existen evidencias objetivas de irritación de la raíz nerviosa en la exploración física (p.ej., Lassègue / Spurling +) y el paciente no ha respondido al “tratamiento conservador” de 4-6 semanas de duración. La realización más precoz de estudios radiológicos puede ser adecuada, si las características clínicas llevan a sospechar un proceso maligno o infeccioso, o si los hallazgos neurológicos empeoran durante la observación. Estas recomendaciones se basan en varios estudios sobre el tratamiento no quirúrgico exitoso de la radiculopatía. Por tanto, los estudios radiológicos (Figura 23) se recomiendan

sólo, para la minoría de pacientes con signos o síntomas persistentes, que se consideran candidatos quirúrgicos o en los que persisten dudas sobre el diagnóstico.

Independientemente de las diversas teorías propuestas para explicar su causa, la degeneración del disco intervertebral, inicia una compleja cascada de cambios morfológicos y biomecánicos, que acaban produciendo una o una combinación de cuatro alteraciones morfológicas: degeneración del disco con su secuela, estenosis vertebral, artrosis de la articulación interapofisaria, inestabilidad y mala alineación.

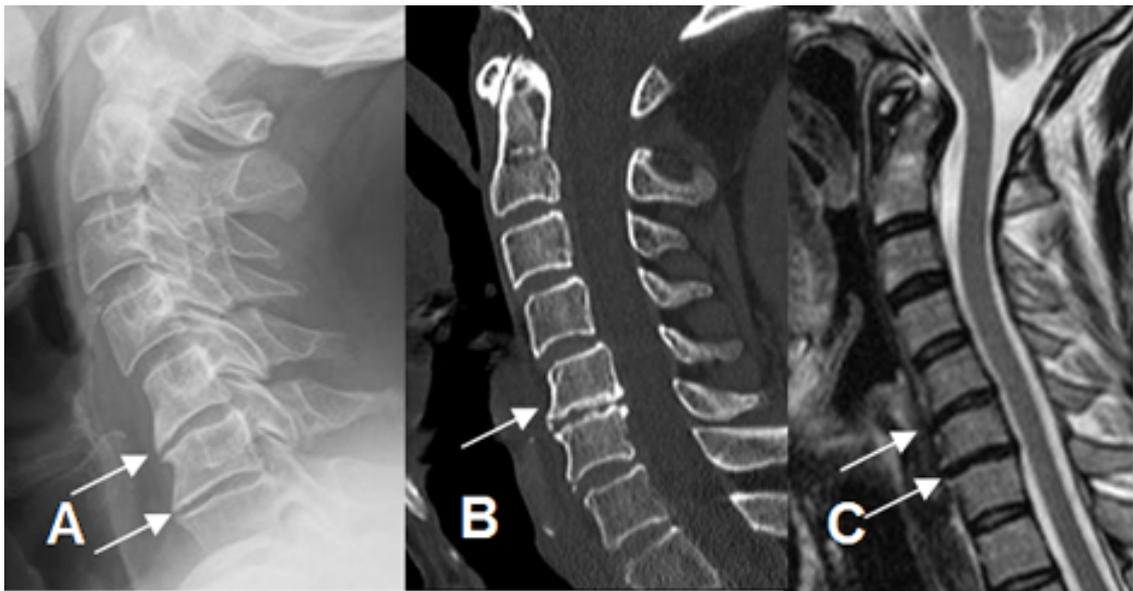


Figura 23. Disminución de los espacios intervertebrales, proceso degenerativo

A: Rx lateral

B: TAC reconstrucción sagital

C: RM sagital en T2

La resonancia magnética, es una herramienta diagnóstica valiosa en la evaluación de la arquitectura interna del disco, dada su sensibilidad inherente con contraste, permite la determinación de la densidad protónica del disco, indicativa del estado de hidratación y también puede identificar, la presencia de desgarros anulares. La RM, no sólo pone de manifiesto alteraciones morfológicas, sino que también aportan información sobre los cambios bioquímicos en el disco en degeneración. Con el envejecimiento y la degeneración, se produce un estrechamiento gradual del disco, con pérdida de la intensidad de señal intradiscal, alta en condiciones normales, en las imágenes potenciadas en T2. Este último cambio, se considera secundario a cambios en la composición de proteoglicanos dentro del disco, más que a cambios absolutos en el contenido en agua. Al progresar la degeneración, se pueden desarrollar pequeñas fisuras rellenas de líquido o roturas que se manifiestan, como áreas intradiscales de alta señal lineal en T2.

Las fisuras (o desgarros) del anillo fibroso, también se visualizan en la RM, donde parecen captar contraste, posiblemente como consecuencia del crecimiento del tejido de granulación dentro de la fisura, durante su curación. Se han descrito tres tipos de fisuras anulares, según la orientación respecto a las fibras anulares concéntricas, siendo las más frecuentes las radiales. La elevada frecuencia de fisuras anulares, asociadas a grandes protusiones discuales, pone en duda el concepto de que el anillo fibroso está intacto en los discos que protruyen, pero que se rompe en los discos herniados. Se ha sugerido, pero de ningún modo se ha confirmado, que la zona de intensidad elevada, está asociada a una raquialgia axial de origen discógeno, por tanto se

desconoce la importancia clínica de las fisuras anulares. La fisura, ruptura del anulus o lesión HIZ (High Intensity Zone), son interrupciones de las fibras o de su inserción vertebral, que se identifica como un área focal de aumento de la señal en T2 (Figura 24).

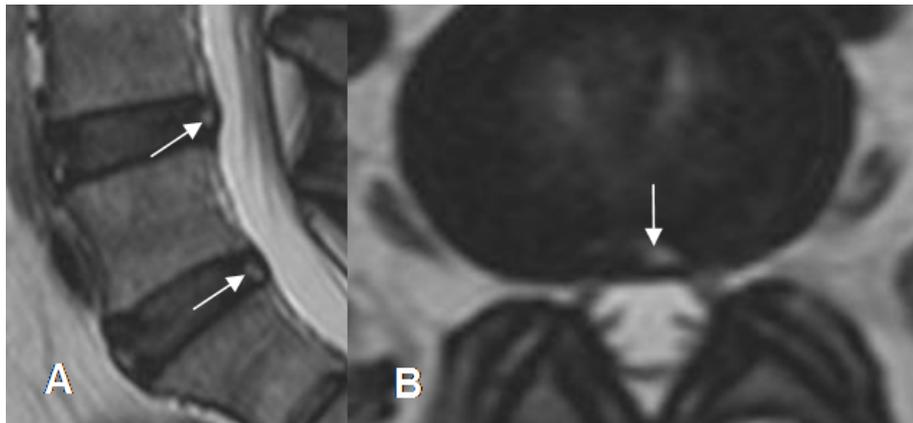


Figura 24. Fisura anular. Lesión HIZ

También pueden aparecer gas (nitrógeno) y calcificaciones dentro del disco en degeneración, lo que se conoce como fenómeno de vacío (Figura 25).

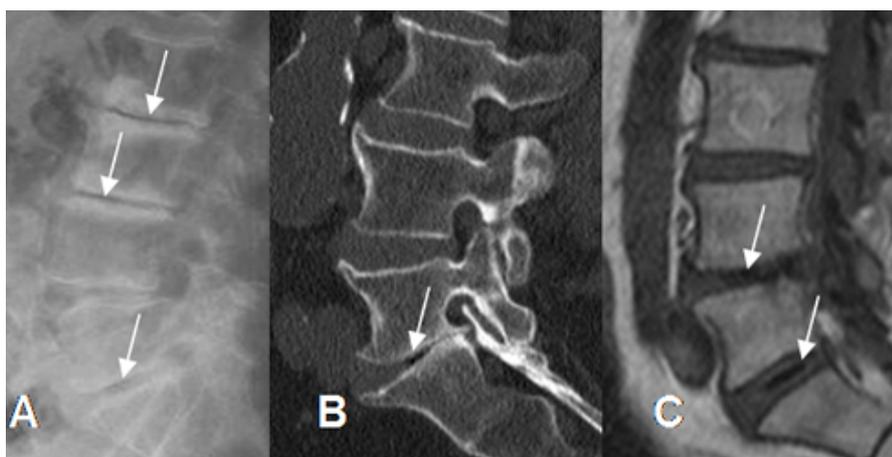


Figura 25. Presencia de aire dentro de los discos, por proceso degenerativo

A: Rx lateral

B: TAC reconstrucción sagital

C: RM sagital en T1

Además de estos cambios observados dentro del disco en degeneración, son frecuentes alteraciones en la señal de la médula ósea vertebral, adyacente a disco. Los cambios en la médula ósea del platillo vertebral, que se asocian a discopatía degenerativa, son los cambios Modic ^[43] y se clasifican en 3 tipos: el tipo I se manifiestan como una señal medular disminuida paralela al platillo vertebral (o los platillos) en las RM potenciadas en T1 y un aumento de la señal en T2. Estos cambios indican la sustitución de la médula grasa normal por médula fibrovascular, que tiene más contenido en agua (Figura 26). Los cambios de tipo II del platillo vertebral, son ligeramente más frecuentes que los de tipo I y muestran un aumento de la señal en T1 y una señal isointensa o levemente aumentada en T2. A nivel histológico estos cambios se asocian a la conversión de la médula ósea hematopoyética roja, en médula grasa amarilla como resultado de isquemia ósea (Figura 27).

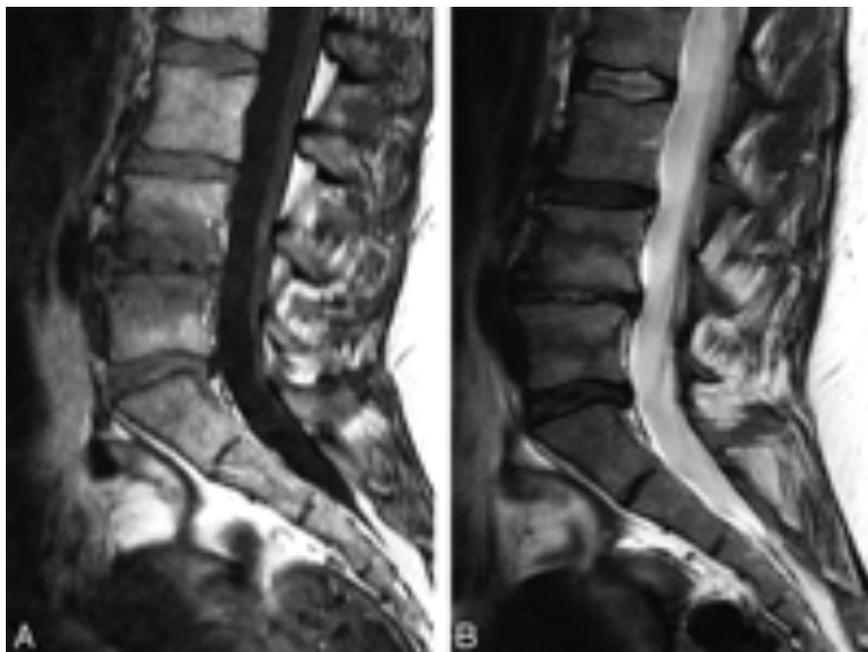


Figura 26. Cambios Modic tipo I. Imágenes hipointensa en T1 (T1WI) e hiperintensa en T2 (T2WI)

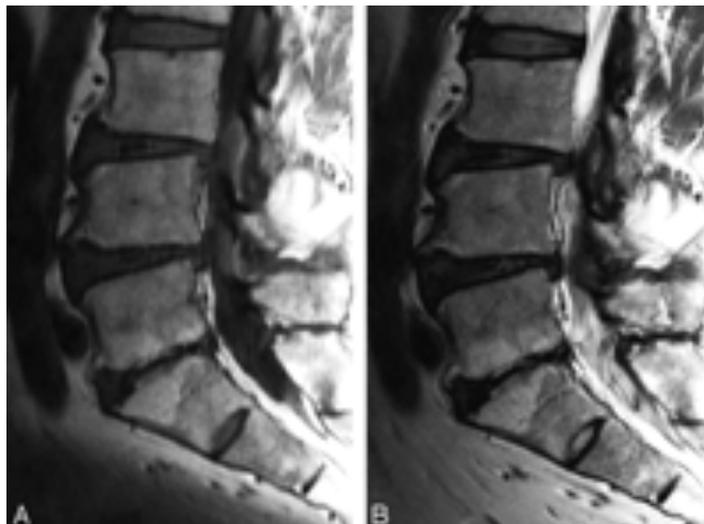


Figura 27. Cambios Modic tipo II. Imagen hiperintensa en T1 e isointensa o ligeramente hiperintensa en T2

A menudo estos dos tipos de cambio, aparecen combinados al mismo nivel o en niveles distintos. Los cambios de tipo III del platillo vertebral corresponden a una menor señal medular en T1 y T2, hallazgo que se correlaciona, con la esclerosis del platillo visualizada en la radiografía (Figura 28), la ausencia de cambios Modic, una apariencia anatómica normal, a menudo ha sido designada tipo 0 [44].

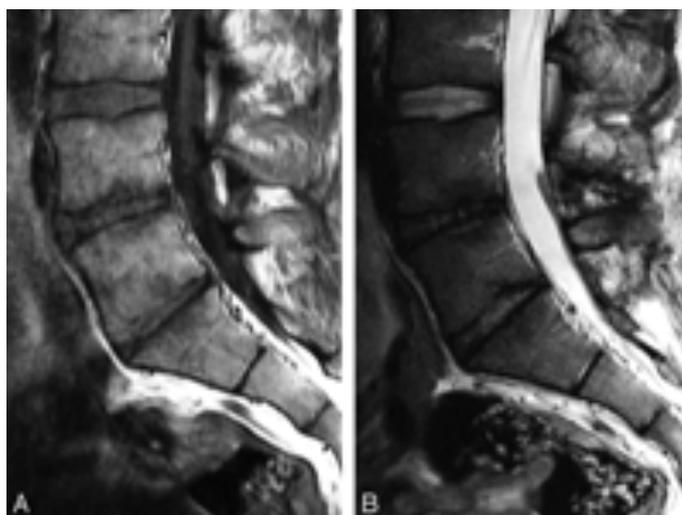


Figura 28. Cambios Modic Tipo III, hipointensa tanto en T1 y T2

En pacientes sin compresión de una raíz nerviosa, el dolor espalda, puede ser secundario, como hemos mencionado, a la irritación de las terminaciones nerviosas en el platillo periférico, por tejido cicatricial dentro de una fisura anular o por herniación de un disco. Esto se denomina “dolor discogénico”, aunque este término se utiliza a menudo para dotar de importancia clínica a estas lesiones, es evidente que muchos pacientes asintomáticos también sufren fisuras anulares.

Además, la enfermedad degenerativa del disco, se puede observar con una resonancia magnética en el 25% de los individuos asintomáticos menores de 40 años y el 60% de las personas de edad superior a 40 años. A nivel cervical, una hernia de disco se puede detectar por imágenes de resonancia magnética sólo en el 2% de los individuos asintomáticos, disminuyendo claramente el número de falsos positivos en RM ^[45].

No existe un sistema de clasificación, aceptado de forma universal, para describir la enfermedad degenerativa de los discos. Se han aceptado unas recomendaciones sobre nomenclatura discal, que afectan a la comunidades ortopédica, neuroquirúrgica y radiológica.

1.2.3.1 Anatomía patológica

Como hemos observado, los hallazgos macroscópicos que caracterizan la degeneración discal incluyen, la formación de desgarros en el anillo fibroso, progresivo desgaste y deshidratación del núcleo pulposo, con pérdida,

finalmente, de la diferenciación entre el núcleo y anillo. Estas alteraciones patológicas, determinan cambios sustanciales en el funcionamiento discal.

Hace más de veinticinco años, se presentó el concepto de una cascada de degeneración de un segmento de movimiento de la columna, invocando el desgaste progresivo del disco intervertebral y las carillas articulares. Se puso énfasis en la interdependencia, del disco intervertebral y las carillas articulares en la función normal de la columna y se descubrió, la manera en que la alteración o la lesión de cualquiera de estas articulaciones, conducen a la aparición de fuerzas anormales y a la afectación de las otras. Aunque perspicaz, este algoritmo era mecanicista y solamente destacaba las alteraciones biomecánicas asociadas a la degeneración del segmento de movimiento. Con el paso de las décadas, la investigación ha revelado, que la degeneración de la columna vertebral implica una compleja relación, entre acontecimientos biológicos y biomecánicos que están genéticamente predispuestos y modulados por influencias ambientales.

Existen numerosas fuentes de dolor de la columna, pero el disco intervertebral es la estructura más frecuentemente implicada. Innumerables técnicas diagnósticas (incluida la discografía) e intervenciones terapéuticas están orientadas al disco. La mayoría de los tratamientos de los denominados “discos dolorosos” han mostrado, no obstante, resultados clínicos inconsistentes, lo que probablemente refleja un abordaje relativamente no sofisticado, para el conocimiento del dolor de la columna vertebral. Los datos recientes, que apoyan la idea de un dolor mediado por la articulación de las carillas

(cigapofisaria), proceden de estudios en pacientes afectos de lesiones por latigazo cervical.

Diversos autores han evaluado el dolor de la articulación cigapofisaria cervical tras un latigazo en un estudio diagnóstico doble ciego sobre anestésicos locales controlados con placebo. En una evaluación de 68 pacientes que referían predominantemente cervicalgia y cefaleas tras una lesión por latigazo cervical, los autores observaron que en los pacientes que presentan un predominio de la cefalea, los bloqueos anestésicos comparativos revelaron que la prevalencia del dolor de la articulación cigapofisaria C2-C3 era del 50%. En conjunto, la prevalencia del dolor de la articulación cigapofisaria fue del 60% (intervalo de confianza del 95%, de 46 a 73%). Estos estudios apoyan aún más, la compleja interrelación del disco intervertebral, las articulaciones de las carillas y la patología de la columna vertebral ^[46].

El conocimiento sobre degeneración vertebral ha avanzado a medida que se ha hecho evidente que la cascada degenerativa implica la relación de factores tanto biológicos como biomecánicos. Los sucesos bioquímicos son importantes en la patogenia del proceso degenerativo, así como en las vías de señalización del dolor, responsables de los hallazgos clínicos en esta patología. A medida que los procesos biológicos de la degeneración vertebral sean mejor conocidos, nuevos tratamientos menos invasivos y no ablativos diseñados para restaurar el disco y el funcionamiento de las carillas se convertirán en una realidad.

1.2.3.2 Degeneración de la matriz desde el punto de vista enzimático

Aparece fragmentación en la mayoría de los componentes estructurales, como el colágeno, proteoglicano y fibronectina, por varias familias enzimáticas que degradan esta matriz. En los discos hay catepsinas D y L y MMPs (MMP 1, 2, 3, 7, 8, 9 y 13) producidas por células del disco y por vasos sanguíneos penetrantes, aumentando su concentración en disco degenerado, lo que no ocurre con las agrecanasas. Las catepsinas, que desarrollan su máxima actividad en entornos de acidez, se inactiva si el pH superior a 7,2, sin embargo las MMP y agrecanasas actúan mejor a pH neutro. En el disco no degenerado, como ya se ha mencionado, estas enzimas participan en el recambio normal de la matriz.

1.2.3.3 Biomecánica del disco degenerativo

La distribución de tensiones, a través del disco intervertebral y el platillo epifisario depende del grado de degeneración discal (Figura 29). Bajo una carga pura compresiva y excéntrica, el disco intervertebral sano demuestra una distribución de tensiones uniforme a través de toda la zona del platillo. Los discos afectados de una degeneración grave, demuestran la misma forma uniforme de distribución de las tensiones bajo una carga compresiva, pero la distribución de la tensión no es uniforme cuando la carga es excéntrica ^[47].

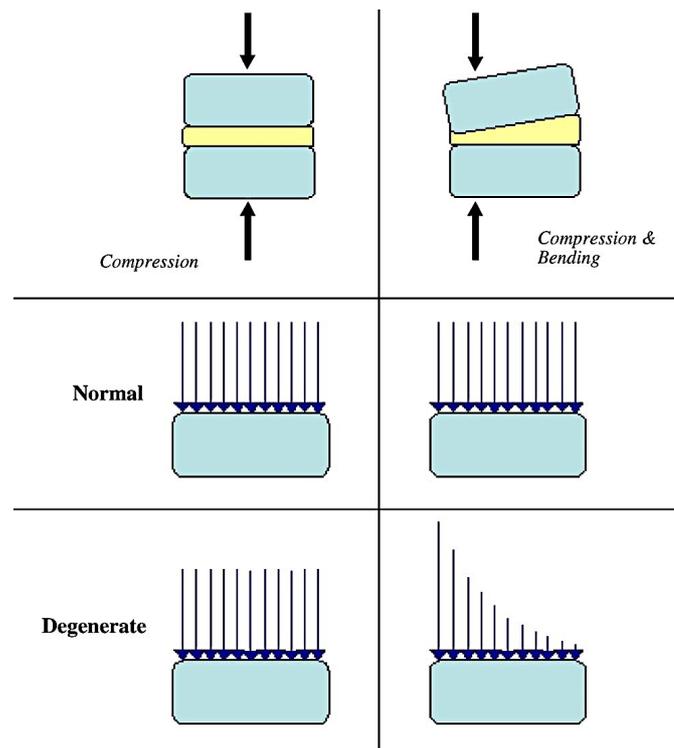


Figura 29. Distribución de la carga en el disco degenerado

Se ha visto, que la asimetría de la distribución de la tensión en los discos degenerativos aumenta tanto con el ángulo de inclinación como con el grado de degeneración. La distribución de la tensión asimétrica presumiblemente se debe a la relativamente sólida naturaleza del disco degenerado y a su incapacidad para configurar cargas excéntricas. A medida que avanza la degeneración, resulta que la proporción de transmisión de la carga cambia hacia los elementos posteriores, lo que ha sido demostrado por diversos investigadores que han medido indirectamente las fuerzas de las carillas mediante el uso de una celdilla de carga intervertebral para medir la carga transferida a través del disco. El modelo predijo, un incremento significativo en la carga de las carillas en los segmentos con discos degenerados ^[48]. Este

incremento fue más prominente a medida que la excentricidad de la carga compresiva aplicada, aumentaba posteriormente.

La secuencia biomecánica de la degeneración discal, que conlleva un soporte de la carga por parte de los elementos posteriores puede ser, de hecho, lo que se observa clínicamente, que la degeneración discal típicamente precede a la artrosis de las carillas. Clínicamente, una degeneración discal inicial o de grado medio, crea una ligera inestabilidad en la columna y por tanto, aumenta la amplitud de movimiento. La relación entre el disco intervertebral geométrico y las propiedades materiales, así como la competencia de las articulaciones de las carillas, son importantes para definir la estabilidad del segmento de movimiento implicado.

Los estudios biomecánicos sugieren que los cambios en la estabilidad del disco intervertebral son muy complejos. A medida que avanza la degeneración, el segmento de movimiento se hace finalmente menos móvil. Sin embargo, el movimiento restante puede ser doloroso. Por ello, el dolor de espalda asociado con una degeneración discal, puede estar relacionado con un incremento del movimiento patológico a pesar de la disminución del movimiento.

Durante décadas, los investigadores han intentado definir una relación entre estas alteraciones morfológicas, biomecánicas del disco intervertebral y síndromes clínicos específicos. En la actualidad, la disfunción discal asociada a una raquialgia axial, que da lugar al denominado trastorno discal interno, está siendo motivo de considerable atención ^[49].

1.2.3.4. Alteraciones morfológicas asociadas a la degeneración del disco intervertebral

Al degenerarse, el disco intervertebral pierde contenido de agua y proteoglicanos. El resultado anatómico es una disminución de la altura del disco intervertebral, lo que determina una disminución de la dimensión craneocaudal del agujero de conjunción (Figura 30). Un estudio anatómico publicó que una altura del disco posterior inferior a 4 mm o una altura del agujero de conjunción menor de 15 mm se correlacionaba con una compresión sintomática de la raíz nerviosa ^[50].

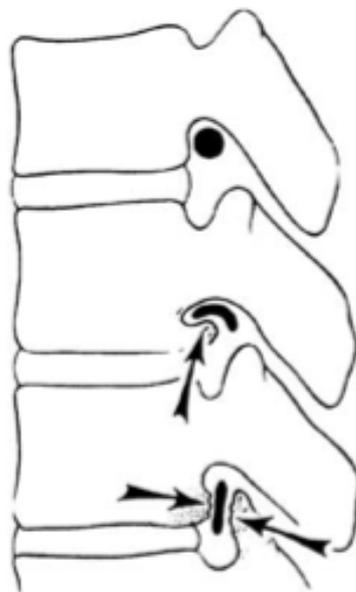


Figura 30. Estenosis foraminal

La disminución de la altura del disco además, ocasiona una pérdida de tensión del ligamento *flavum* o amarillo que determina un abombamiento de este

ligamento dentro del canal raquídeo. Una disminución de la tensión dentro del anillo fibroso posterior también contribuye a la protrusión del disco dentro del canal.

La progresión de la degeneración discal puede conllevar la aparición de desgarros y fisuras anulares. La propagación de estas fisuras hacia la periferia, se ha involucrado en la etiología de las hernias discales y el dolor de espalda de origen discal. Se han descrito tres tipos de desgarros anulares: los desgarros radiales, que se localizan principalmente en el anillo fibroso posterior, son los que se asocian con mayor frecuencia a la degeneración discal. Los desgarros circunferenciales, pueden ser secundarios a fuerzas de cizallamiento interlaminar y se observan principalmente en discos más envejecidos. Y los desgarros del borde periférico, se localizan habitualmente en la parte anterior y pueden asociarse a un traumatismo.

Un estudio reciente que utilizó un modelo de dinámica de fluidos y un análisis de elementos finitos demostró, que una disminución de la presión osmótica realmente, puede aumentar la abertura de pequeñas roturas y fisuras en el anillo. Estas tensiones en áreas dañadas pueden progresar como una falla propagando tensiones interlaminares, provocando delaminación y agrietamiento de la matriz en estas zonas del AF ^[51].

1.2.4 Degeneración de la articulación de las carillas

Se han llevado a cabo estudios biomecánicos y de imagen, en segmentos de movimiento procedentes de cadáveres humanos para determinar el efecto de la degeneración discal y la artrosis de la articulación de las carillas sobre la flexibilidad de la columna lumbar ^[48]. Estos autores observaron que la degeneración discal afectaba principalmente a la rotación axial de la articulación. La degeneración del cartílago de las carillas, especialmente el adelgazamiento del cartílago, provoca una laxitud del ligamento capsular que puede ocasionar una movilidad anormal o una hipermovilidad de la articulación de las carillas y este adelgazamiento del cartílago de la carilla, se correlacionaba de forma lineal y significativa con la degeneración discal en cadáveres varones.

Se han realizado facetectomías en la columna lumbar de conejos blancos inmaduros para crear un modelo degenerativo mediado por las carillas. Se resecaron carillas articulares inferiores de un lado en el nivel adyacente. A los 9-12 meses los discos mostraron un adelgazamiento del anillo fibroso posterior, hendiduras circunferenciales en la periferia del anillo fibroso y un aumento del área y una disminución de la organización del núcleo pulposo. Los autores concluyeron que la articulación de las carillas protegen el disco intervertebral de las tensiones rotacionales ^[52].

Es incuestionable que el complejo de la articulación de las carillas presenta un papel importante en la estabilización de la unidad del segmento raquídeo.

A medida que progresa la enfermedad discal se aplica una mayor tensión sobre la parte posterior, lo que acelera la artrosis de las carillas. La artrosis de la articulación de las carillas resultante probablemente cambia la movilidad del segmento raquídeo lo que alterará las fuerzas mecánicas que actúan sobre el disco intervertebral, haciendo de este un proceso con implicación bidireccional entre disco y carillas.

1.3 Etiología de la degeneración discal

La degeneración discal es una entidad difícil de estudiar sólo por la clínica. Hasta la llegada de la RM, su diagnóstico contaba con las herramientas de la mielografía, los signos, síntomas clínicos y la exploración radiográfica de los pacientes con dolor de espalda. La información detallada concerniente a la cascada de los cambios sucedidos en la estructura y la matriz del disco sólo podía obtenerse a partir de su estudio después de extraerlos en las autopsias. El examen mediante la RM ha mejorado los conocimientos clínicos sobre la degeneración y ha permitido la determinación de los cambios estructurales, como los desgarros anulares, los efectos en el platillo vertebral, los osteofitos, la degeneración de la articulación interapofisaria o la disminución de la señal y de la altura del disco. Sin embargo, esta técnica ha resultado menos satisfactoria para identificar las variaciones bioquímicas cuantitativas. Las modificaciones en la intensidad de la señal parecen una respuesta compleja frente a los cambios de composición y de organización estructural. No obstante, la pérdida de la señal ha ofrecido unos resultados satisfactorios al rastrear las alteraciones diarias en la hidratación de las personas.

Se han concebido esquemas de RM para clasificar la degeneración discal ^[53] que siguen unas pautas análogas a las empleadas en el análisis morfológico. Dicha información ha permitido analizar la asociación entre el dolor de espalda y diversos cambios anatomopatológicos específicos, pero aún es escasa la vinculación entre este síntoma y ciertos rasgos como los desgarros anulares o los defectos en el platillo vertebral.

La etología de la degeneración discal también plantea problemas de estudio, en parte debido a que no existe ningún buen modelo animal al respecto. Los discos de los animales tradicionales de laboratorio como los roedores difieren de los humanos en aspectos importantes. En particular, tanto en los roedores como en muchos otros mamíferos, el núcleo pulposo está poblado por células de la notocorda durante toda la vida adulta, mientras que en el hombre estas células van desapareciendo pasada la lactancia. El estudio de la degeneración en animales con una población celular diferente a los hombres adultos tiene un valor limitado. Además, la frontera entre el hueso y el disco es distinta en el hombre de la que existe en la mayoría de los animales. En el hombre, la lámina cartilaginosa del platillo vertebral actúa como un cartílago de crecimiento para el cuerpo de la vértebra, mientras que en gran parte de los animales las vértebras disponen de dos cartílagos de crecimiento en el interior de su propio cuerpo y la lámina cartilaginosa del platillo vertebral siendo una capa mucho más delgada que la existente en el hombre. Por tanto, aunque el estudio de los animales afectados por la degeneración espontánea y los modelos de degeneración por lesión ha aportado ciertos conocimientos sobre los procesos degenerativos, la mayor parte de la información recopilada sobre la etiología de

la degeneración discal ha procedido de las investigaciones realizadas en el hombre.

En todos los tejidos, el equilibrio entre la síntesis y la degradación de las macromoléculas de la matriz es crucial para la homeostasis tisular. El proceso degenerativo predomina, cuando la síntesis de macromoléculas está disminuida o la tasa de degradación de productos aumenta. La degeneración discal es una de las primeras formas de degradación tisular observada en el cuerpo humano, puesto que los signos iniciales están presentes a menudo en la segunda década de la vida. Sin embargo, el inicio y la velocidad del proceso degenerativo varían notablemente entre individuos.

Uno de los primeros cambios producidos en el disco es la pérdida de las células notocordales grandes, que son abundantes en la infancia pero que prácticamente están ausentes en la edad adulta. Se cree que este cambio es la piedra angular o quizá el inicio de determinados aspectos de la degeneración tisular. Se ha demostrado que factores solubles de las células de la notocorda, disminuyen la expresión de genes de mediadores inflamatorios en el AF y este hallazgo sugiere que la desaparición de las células de la notocorda puede eliminar un estímulo necesario para la salud del disco ^[54].

La población celular del núcleo pulposo cambia espectacularmente a lo largo del tiempo. Se producen tanto necrosis como apoptosis celular (muerte celular programada). La apoptosis de la célula discal, puede ser desencadenada por numerosos estímulos, uno de los cuales es el sistema de ligandos Fas/Fas. La muerte celular rápida se desencadena cuando una célula portadora de receptor

Fas contacta con una célula portadora de un ligando-Fas. No se ha detectado que el receptor Fas esté expresado en un disco normal en cantidades importantes. Si se ha visto un incremento de expresión en los discos con el aumento de edad, pero no con el grado de degeneración ^[55].

Después de una hernia discal, la apoptosis y el proceso inflamatorio del organismo permiten la descomposición y reabsorción del fragmento del disco. Sin embargo, no se ha establecido por completo el papel de la apoptosis en la degeneración discal. Si se han identificado las dos vías principales de la apoptosis mediada por Fas, las células de tipo I llevan el receptor Fas en su membrana celular y las células de tipo II llevan el receptor Fas intracelularmente, a nivel mitocondrial. Un estudio reciente, ha sugerido que las células de tipo II predominan en los fragmentos discales humanos ^[56].

Diversos factores de crecimiento pueden ejercer un efecto protector, disminuyendo la apoptosis dentro del disco. Algunos investigadores se han centrado en la reducción de la apoptosis, como método de tratamiento o para prevención de los cambios degenerativos en el disco ^[57].

Las citocinas inflamatorias y las proteínas catabólicas también intervienen en el proceso degenerativo. Las enzimas catabólicas contribuyen al recambio de macromoléculas como parte normal de la homeostasis tisular. Durante la degeneración discal, la expresión de los factores catabólicos se vuelve excesiva y conduce a la descomposición del tejido. Se ha visto que las enzimas discales, entre las que se encuentran la catépsina, la lisozima, la agreganasa y

diversas metaloproteinasas de matriz, participan en este proceso de degeneración.

El metabolismo discal, está regulado por una gran cantidad de citocinas, entre las que se incluyen interleuquinas, prostaglandinas y factor de necrosis tumoral. Una compleja y mal conocida serie de procesos catabólicos, parece ser integral a la creación de dolor que algunos pacientes experimentan durante la degeneración discal. La interleuquina 1, por ejemplo, disminuye la síntesis de proteoglicanos y regula al alza la expresión de la estromolisina 1 y la prostaglandina E2. La interleuquina 6, el factor de necrosis tumoral alfa y la prostaglandina E2 también parecen intervenir en la producción de dolor discógeno. Las citocinas podrían ser utilizadas en el futuro como dianas de tratamientos para disminuir el dolor relacionado con el disco vertebral.

Tanto los procesos enzimáticos como los no enzimáticos pueden provocar la degeneración de la matriz. En muchos pacientes las macromoléculas del disco sólo son parcialmente degradadas y contienen agregados de proteínas de matriz no funcionales (colágenos, proteoglicanos y fibronectinas). Algunos de los péptidos parcialmente degradados, como los fragmentos de fibronectina, son biológicamente activos y capaces de estimular el proceso de degradación.

La pérdida de proteoglicanos grandes sulfatados afecta estructuralmente al disco pues disminuye su capacidad de contener agua, lo que conduce a una pérdida de la altura discal. Con la degeneración, la demarcación clara entre el núcleo pulposo y un anillo fibroso interno se pierde. La organización laminar

normal del anillo fibroso externo se desorganiza y aparecen gruesas grietas o fisuras en el tejido.

1.3.1 Genes y degeneración discal

Durante la última década ha quedado demostrado que la degeneración discal presenta un potente componente genético. Dos estudios independientes con gemelos descubrieron que su herencia superaba el 60%. La predisposición genética ha aparecido como el factor que tal vez sea más importante para conducir a una enfermedad degenerativa discal sintomática. Con frecuencia se ha detectado la degeneración discal en numerosos miembros de una misma familia ^[58]. Un estudio sobre gemelos idénticos (Figura 31) cuyos factores de riesgo principales fueron opuestos mostraban unos patrones de degeneración discal muy parecidos y los efectos producidos por los factores ambientales, como el trabajo intenso, el tabaco o la conducción, eran menores en comparación con los de tipo genético ^[59].

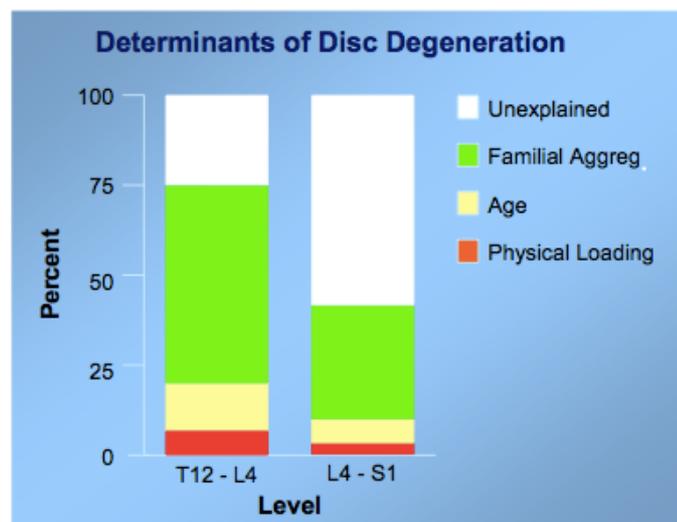


Figura 31. Influencia de los factores de riesgo de degeneración discal en gemelos ^[59]

Se han identificado además diversos polimorfismos génicos asociados a la degeneración discal. En varios estudios han podido observarse dos polimorfismos en el gen para el receptor de la vitamina D que están vinculados con la degeneración del disco y con su hernia. Pero estos trabajos que observaron una conexión entre la degeneración discal precoz y determinados alelos del receptor de la vitamina D están en continua revisión por la comunidad científica a través de metaanálisis ^[60]. No se conoce cuál es el mecanismo por el que este polimorfismo participa en la degeneración discal, pero hasta hoy no parece estar relacionado con ninguna diferencia en la densidad ósea. Además, se ha comprobado que las personas con un polimorfismo en el gen para el agregano o en la región activadora del gen MMP3 corren el peligro de sufrir una degeneración temprana del disco ^[61]. En estudios recientes, se han sugerido la importancia de otros factores genéticos, especialmente en los que codifican los tipos de colágeno IX y XI. Las variantes alélicas en los genes COL9A2 colágeno IX - (Trp2) y COL9A3 (Trp3) han sido identificados como factores de riesgo genéticos para la enfermedad degenerativa discal porque interfieren el entrecruzamiento (cross-linking) entre los tipos de colágeno II, IX y XI, lo que disminuye la estabilidad intervertebral del disco. El colágeno de tipo XI es un componente menor de las fibrillas de colágeno, pero también está presente en el anillo fibroso y el núcleo pulposo de los discos ^[62]. Otros alelos, como el del gen de la interleuquina 6 se han relacionado el dolor de origen discal y la ciática ^[63].

A partir de estos estudios genéticos, queda patente que las mutaciones producidas en diversas clases de genes distintos pueden desembocar en la producción de cambios en la morfología de la matriz, la bioquímica del disco y

su funcionamiento, que son representativos de la degeneración discal. En resumen, los resultados obtenidos con estos estudios genéticos apuntan hacia la naturaleza multifactorial de la degeneración discal e indican que, al menos en algunos casos, las interacciones genes-medio ambiente, intervienen en este proceso.

1.3.2 Vías ambientales para la degeneración discal

Las células del disco que en el fondo son las responsables de sintetizar y mantener su matriz, están sometidas a numerosas señales ambientales capaces de afectar a la biosíntesis de esta estructura, su recambio y que incluso pueden repercutir sobre la viabilidad celular. En la actualidad hay muchos estudios que han demostrado que la renovación de la matriz por parte de las células del disco está profundamente influida, por ejemplo, por las señales mecánicas como la presión, la pérdida de líquidos, el estiramiento, por los niveles de oxígeno o el pH. La respuesta a tales señales ambientales, en realidad, puede estar regida por la constitución genética, pero algunas de ellas parecen aplastantes. Por ejemplo, la pérdida del aporte de nutrientes tendrá carácter letal para todas las células, aunque su sensibilidad frente a ella esté gobernada por el genotipo. Por tanto, los factores ambientales son capaces de propiciar la degeneración del disco al inhibir el metabolismo celular o incluso al provocar la muerte de las células.

1.3.3 Vías nutritivas

Se cree que una de las causas fundamentales de la degeneración discal es el fallo en el aporte de los nutrientes recibidos por las células del disco. Al igual que todos los tipos celulares, las células del disco necesitan nutrientes como la glucosa y el oxígeno para mantenerse vivas y activas. *In vivo*, su actividad es muy sensible al oxígeno y al pH extracelular. Así la presencia de un pH ácido y de una concentración baja de oxígeno provoca un descenso llamativo en la velocidad de síntesis de la matriz. Y las células no sobreviven, tras una exposición prolongada a un pH bajo, ni tampoco a unas concentraciones bajas de glucosa. Por tanto, una disminución en la llegada de nutrientes que desemboque en la reducción de la pO_2 o el pH (a raíz de la elevación en las concentraciones de ácido láctico, dado que el metabolismo celular es esencialmente anaerobio), podría influir sobre la capacidad de las células discales para sintetizar y mantener su matriz extracelular y a la larga desencadenar la degeneración del disco. El lactato aumenta la acidez del disco a un nivel de pH de 7,2 a 6,9, pudiendo verse también estos niveles de pH tan bajos de hasta 6,1 cuando el disco está sometido a tensión. No obstante, el metabolismo celular óptimo requiere una presión de oxígeno baja, niveles de dióxido de carbono elevados y un pH ligeramente ácido, además de diversos factores de crecimiento.

Sin embargo, el disco es grande, avascular y sus células dependen de los vasos sanguíneos situados en sus bordes para recibir los nutrientes y retirar los desechos metabólicos. El camino que conduce desde el riego de la sangre

hasta las células del núcleo es precario porque estas células están irrigadas prácticamente del todo por unos capilares, originados en los cuerpos vertebrales que traspasan la lámina subcondral y acaban justo por encima de la lámina cartilaginosa del platillo vertebral. Puesto que el disco recibe virtualmente todos sus nutrientes a través de la difusión, los cambios que se producen en el platillo epifisario con el envejecimiento pueden afectar en gran manera a la vitalidad de las células discales. Como se ha visto, el aporte de nutrientes controla la densidad de las células del disco. Los nutrientes han de difundirse hasta las células desde los capilares a través de esta lámina cartilaginosa y de la densa matriz extracelular del núcleo, debiendo recorrer unos 8 mm de distancia del lecho capilar.

El suministro de nutrientes hasta las células del núcleo puede estar perturbado en diversos puntos. Los distintos factores que influyen sobre el riesgo sanguíneo que llega al cuerpo vertebral, como la aterosclerosis, la anemia drepanocítica y la enfermedad de Gaucher, parecen favorecer notablemente la degeneración del disco. El ejercicio prolongado o su falta ejerce efectos negativos sobre el desplazamiento de los nutrientes hacia el disco y por tanto sobre su concentración en el tejido. No se conoce el mecanismo implicado, pero se ha propuesto que el ejercicio tiene una repercusión sobre la arquitectura del lecho capilar en la transición disco-hueso. Por último, incluso si el riego sanguíneo permanece íntegro, puede que los nutrientes no alcancen las células discales si la lámina cartilaginosa se calcifica, por ejemplo, en los discos escolióticos, donde se observa una calcificación intensa del platillo vertebral. Todos estos datos refuerzan la hipótesis de que la disminución del

aporte de nutrientes con el tiempo acabará llevando al disco a su degeneración.

1.3.4 Carga mecánica y lesión

Levantar cosas pesadas, las fuerzas de vibración y las cargas de torsión también se han considerado factores de riesgo. Sin embargo, los estudios realizados no han conseguido demostrar una correlación directa entre una carga física pesada y la enfermedad degenerativa discal. Se cree que las cargas mecánicas anormales abren un camino para la degeneración del disco.

Durante muchas décadas, se ha supuesto que una causa fundamental detrás de los problemas de espalda es la producción de una lesión, a menudo de origen laboral, que da lugar a un daño estructural. Se cree que tal lesión pone en marcha una vía que conduce a la degeneración del disco y finalmente a la aparición de síntomas clínicos y del dolor de espalda. Los modelos con animales han respaldado esta conclusión. Aunque el ejercicio intenso no parece influir negativamente sobre los discos justificando su respuesta a ciertas pautas de carga prolongada, produciendo un aumento del contenido de proteoglucanos, sin embargo la sobrecarga experimental o la lesión discal, tienen la capacidad de incluir cambios degenerativos o incluso la muerte celular. Un hecho que apoya el papel representado por las fuerzas mecánicas anormales en la degeneración del disco, procede del hallazgo de que los niveles pertenecientes a los discos vecinos a un segmento artrodesado degeneran a un ritmo anormalmente acelerado.

Este modelo de lesión también está verificado según los numerosos estudios epidemiológicos que han descubierto una asociación entre diversos factores ambientales, la aparición de una degeneración y una hernia discal. Los principales factores de riesgo para el dolor de espalda y la degeneración son: los trabajos físicos intensos, las maniobras para efectuar un levantamiento, la conducción de camiones, la obesidad y el tabaco. Sin embargo, la incidencia de los trastornos relacionados con la degeneración discal ha seguido creciendo pese a las iniciativas para evitar estos factores de riesgo. Durante la última década, a medida que la RM ha perfeccionado las clasificaciones utilizadas sobre la degeneración discal queda claro que así como el dolor de espalda incapacitante posee unos vínculos con el oficio desempeñado, los aspectos de tipo psicosocial y el cobro de subsidios, los factores ambientales, como la conducción o el trabajo intenso, ejercen una escasa influencia sobre el propio patrón de degeneración discal. Esto contradice las suposiciones anteriores e indica la endeble conexión existente entre la degeneración y los síntomas clínicos.

1.3.5 Tabaco

Diversos estudios epidemiológicos han identificado la intervención del tabaco, como un factor de riesgo para el dolor de espalda. Se ha propuesto que, dada su influencia sobre la circulación periférica, produce una limitación en el transporte de nutrientes hasta el disco y en efecto, los estudios experimentados sobre los efectos agudos de su consumo confirman que las concentraciones de oxígeno en el disco disminuyen después de una breve exposición al humo

de los cigarrillos y las de ácido láctico aumentan. Otros trabajos experimentales han demostrado que la exposición prolongada a la nicotina puede dar lugar a cambios más permanentes. Este compuesto influye negativamente sobre la arquitectura de la microcirculación que irriga el disco y origina cambios degenerativos en su matriz. Sin embargo en humanos, las investigaciones dedicadas a las degeneraciones discales identificadas por RM han descubierto que el tabaco sólo ejerce un efecto relativamente escaso sobre el grado y el patrón de degeneración, lo que vuelve a poner de manifiesto la actual falta de conocimientos acerca de la relación entre los cambios evidentes sufridos por el disco y el dolor de espalda.

1.4 Efectos de la degeneración sobre el funcionamiento del disco

La biomecánica del disco depende de su composición y la organización de su matriz. Por lo tanto, cualquier desorganización en su estructura afectará a su capacidad biomecánica y las diferencias biomecánicas de los distintos segmentos raquídeos, que podrían evolucionar en diferentes patrones de degeneración y celularidad, siendo la base de nuestro trabajo.

1.4.1 Modelo estructural del disco, función del agregado y de la red de colágeno

Este modelo se asemeja a una red de cuerdas que encierran una serie de globos. Su estructura se hincha por los globos y es capaz de soportar las cargas externas. Sin embargo, ninguno de sus componentes podrían hacerlo

en solitario. Sin los globos las cuerdas se desplomarían y sin la ayuda de la red de cuerdas, los globos serían expulsados bajo la acción de la carga. En consonancia, la resistencia a las cargas por parte del disco, depende de la organización que posean los principales componentes de su matriz, el colágeno y el agrecano.

Los colágenos fibrilares, forman el armazón estructural del disco, al igual que la red de cuerdas en el modelo citado, resulta potente en tensión pero se hunde cuando se somete a carga. El agrecano presenta una gran presión osmótica procedente sobre todo de su elevada concentración de cargas negativas y por tanto, tiende a absorber agua y a inflar la red de colágeno, tal como los globos hinchan la red de cuerdas. La elevada concentración de agrecano en un disco normal, dota al tejido de una capacidad para soportar las cargas comprensivas sin aplastarse. Las moléculas de agrecano, quedan retenidas en el disco por la red de colágeno al igual que la red de cuerdas detiene los globos. Así pues, la presión de turgencia del disco depende del balance entre, la presión osmótica inherente a la gran concentración de agrecano y la resistencia de la red de colágeno a hincharse, si la red aumenta o se agrieta, los fragmentos funcionales de agrecano van a filtrarse con la correspondiente disminución en la presión de turgencia del disco.

1.4.2 Cargas sobre el disco

Nachemson y cols. ^[64] fueron los primeros en determinar las cargas reales a las que está sometido un disco *in vivo*. Para ello, midieron la presión que actúa

sobre el disco, cuando una persona descansa en diversas posturas corporales o realiza una tarea determinada. Aunque la porción del tronco en torno al disco L3-L4 constituye el 60% del peso corporal total, la carga que recae sobre él, estando sentado y de pie con una flexión de 20° es más o menos del 200% y llega casi al 300% si se añaden 20 kg de peso en las manos. Observaron, que incluso en personas relajadas en decúbito supino, la presión de los discos lumbares inferiores era de 0,1 a 0,2 MPa, mientras que en una posición sentada, sin apoyo de la espalda ascendía hasta 0,6 a 0,7 MPa (Figura 32).

El disco siempre está sometido a una carga *in vivo*, a raíz de los efectos combinados del peso del cuerpo y la actividad muscular. Las cargas aplicadas sobre él, redundan en un aumento de la presión. Las presiones máximas durante la actividad energética pueden subir considerablemente por encima de estos valores. Las recientes mediciones *in vivo* han comprobado los cambios de la presión intradiscal al cabo de 24 horas, para confirmar estos primeros resultados mencionados, siendo menor la presión en los discos degenerados que en los normales. Debido a la relación entre la presión del disco y la postura, la carga de la columna tiende a seguir un patrón cíclico: alcanza su mínimo a lo largo del sueño y después se incrementa de 5 a 6 veces al llevar a cabo las actividades del día.

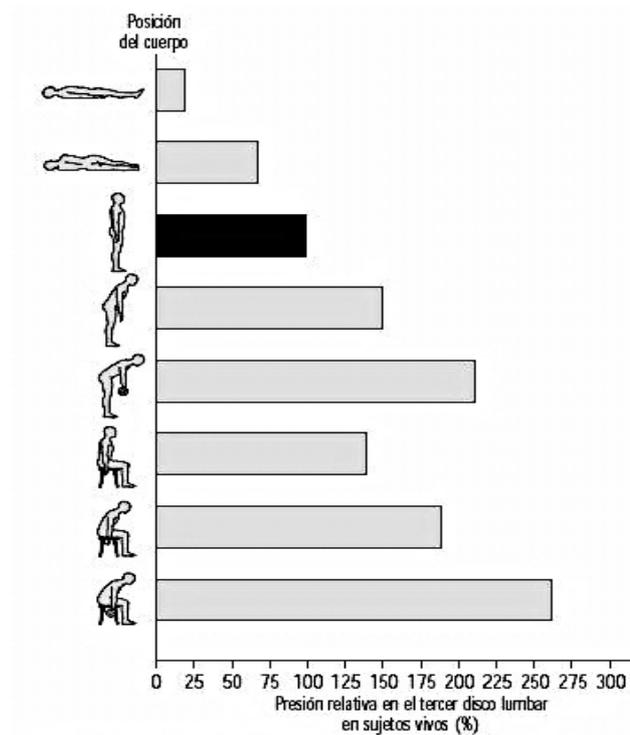


Figura 32. Presiones intradiscales en diferentes posturas (comparadas con la presión erecta en bipedestación (100%))

A diferencia de la mayoría de los demás mamíferos, los seres humanos caminamos en posición bípeda por lo que sobre los discos intervertebrales se aplican grandes cargas compresivas. El núcleo pulposo normal, que es un gel hidratado, puede comprimirse relativamente poco. La carga de compresión provoca una ligera deformación del platillo epifisario cartilaginoso y del cuerpo vertebral, así como una protrusión del anillo fibroso. Los tejidos circundantes deben ser lo suficientemente fuertes, como para resistir las fuerzas de tensión hacia fuera, transmitidas por el núcleo hacia el resto del disco y el hueso circundante. La inclinación lateral y la rotación de la columna vertebral, producen cargas de tensión significativas sobre las fibras del anillo fibroso, que pueden determinar un fracaso de las mismas si la sobrecarga excede la resistencia a la tensión del tejido. Afortunadamente, el anillo fibroso sano es

suficientemente fuerte y capaz de soportar sobrecargas que serían capaces de fracturar el hueso vertebral circundante.

En la degeneración la integridad del anillo fibroso está comprometida por la aparición de fisuras. Para limitar la transmisión de tensiones excesivas al anillo fibroso, las articulaciones de las carillas intactas controlan la movilidad raquídea, especialmente en la inclinación lateral y la torsión. No es sorprendente pues, que cuando se pierde la integridad del complejo de las carillas debido a una espondilolisis vertebral, las fuerzas patológicas aplicadas a los tejidos puedan conducir a una degeneración precoz del disco intervertebral.

Para disipar las cargas de compresión de la columna, el disco normal convierte la carga en fuerzas anulares de tensión sobre la parte más externa del anillo fibroso, mientras que permite el movimiento controlado del segmento intervertebral. Los platillos epifisarios transmiten la carga compresiva al núcleo pulposo, lo que conduce a un incremento de presión sobre el gel hidratado del núcleo pulposo. En un disco joven y sano la carga se transmite más bien de forma uniforme hacia fuera con todas direcciones a los tejidos circundantes del disco. El resultado es una deformación viscoelástica de las fibras circunferenciales el anillo fibroso externo que disipa parte de la tensión. El anillo fibroso presenta unas características de rigidez diferenciales durante la carga que conducen aun fenómeno bifásico, en que el anillo fibroso interno amortigua la transmisión de la tensión al anillo fibroso externo que es más rígido y resiste picos de carga.

Con el envejecimiento y la degeneración discal se producen cambios significativos en la biomecánica del disco. Los cambios parecen empezar en el núcleo pulposo donde la pérdida de proteoglicanos grandes, conduce a una presión de turgencia disminuida y determina una transmisión no uniforme de las tensiones sobre los tejidos circundantes. En el anillo fibroso las fibras de colágeno se deterioran y aparecen fisuras a lo largo de la región interna que finalmente progresan hacia fuera. Como consecuencia el material nuclear puede desplazarse hacia fuera, a la periferia del disco. La pérdida de la función biomecánica normal del núcleo pulposo y del anillo fibroso conduce a una sobrecarga de los platillos epifisarios, los cuales se esclerosan y forman osteofitos periféricos como se observa en la espondilosis raquídea, siendo por tanto la carga un factor agravante contrastado en la degeneración discal.

1.4.3 Efecto de la carga sobre la hidratación del disco

Como el disco es un sistema osmótico la hidratación varía con la carga. Si aumenta su valor, el líquido queda exprimido del tejido lo que concentra el agua e incrementa su presión osmótica. La expulsión de líquido cesa cuando la presión de turgencia asciende lo suficiente como para equilibrar la presión aplicada. A la inversa, si se reduce la carga depositada sobre el tejido el disco se hincha. Este proceso puede adquirir unas dimensiones impresionantes (de un 200% a un 300%) en discos *in vivo* desprovistos de carga.

El patrón diario de la carga ejerce un efecto considerable en la hidratación del disco. La realización de RM *in vivo* permitió calcular que como promedio los discos perdían alrededor del 25% de su contenido líquido durante el día y que esta cantidad era recuperada por la noche con el reposo. Se cree que la pérdida de altura a lo largo del día en parte procede de la deformación inducida por la carga sobre la red de colágeno y en parte obedece a la expulsión de líquido suscitada por su presencia, siendo la disminución media de la talla de 1 a 2 cm/día. Por el contrario los astronautas residentes en el laboratorio espacial que se encuentran en condiciones de ingravidez durante unos 2-3 meses, crecen unos 5 cm. de estatura, quizá en parte debido al rellenado de sus discos bajo la acción de unas cargas externas escasas.

1.4.4 Efecto de la pérdida de agua

La pérdida de agua en los discos degenerados provoca unos efectos importantes sobre su comportamiento destinado a soportar la carga, pues la presión osmótica cae y el disco pierde capacidad para mantener su hidratación bajo el peso. Los discos degenerados tienen un menor contenido acuoso que los normales, dotados de una edad equiparable y al depositar una carga sobre ellos, pierden altura y líquido, con mayor rapidez y tienden a abombarse. Por ende, con la disminución de su hidratación dejan de seguir un comportamiento hidrostático bajo su acción. Así pues, al aplicar la carga puede condicionarse una concentración de la presión a lo largo del platillo vertebral o en el anillo, tal vez este fenómeno explicaría el dolor que se produce durante la discografía.

Estos cambios tan importantes en el comportamiento del disco ejercen una profunda influencia sobre otras estructuras de la columna, pueden repercutir en su funcionamiento y predisposición a la lesión. Hemos comentado como a raíz del rápido descenso experimentado en la altura del disco bajo la acción de la carga en un estado de degeneración, las articulaciones apofisarias vecinas a tales discos pueden recibir unas cargas anormales y a la larga padecer unos cambios artrósicos. La pérdida de altura en el disco también puede afectar a otras estructuras. Produce un descenso en las fuerzas de tensión que recaen sobre el ligamento amarillo, de ahí la posibilidad de causar su remodelación y su engrosamiento. En tales condiciones puede sobresalir hacia el conducto raquídeo y generar una estenosis del canal, un problema creciente a medida que envejece la población.

La desaparición de los proteoglicanos también influye sobre el movimiento de las moléculas hacia el interior y hacia el exterior del disco. El agua debido a su elevada concentración y carga en un disco normal, evita el desplazamiento hacia la matriz de las moléculas grandes carentes de carga, como las proteínas séricas y las citocinas. Su elevada concentración en el disco también repercute sobre la penetración de fármacos como los antibióticos, al favorecer la captación de los componentes degradados de la matriz. De este modo, el disco acumula fragmentos de agua activos desde el punto de vista osmótico. La disminución en el contenido de agua aumentaría el ritmo de desaparición de sus fragmentos y de otros integrantes de la matriz, tal vez al acelerar una cascada degenerativa. Facilitando la

entrada en el disco de moléculas grandes como los complejos de factores de crecimiento y las citocinas, lo que influye sobre el comportamiento celular.

El crecimiento más abundante de vasos y nervios observado en el seno de los discos degenerados está emparentado con el dolor crónico de espalda y probablemente también esté asociado a la desaparición de los proteoglicanos, pues se ha demostrado que el agregado del disco inhibe el crecimiento nervioso en su interior ^[65].

1.5 Patología del disco

1.5.1 Hernia discal

El trastorno discal más frecuente que llega a un cirujano de la columna, es la hernia o el prolapso del disco intervertebral. En estos casos, el disco se abomba o se rompe (parcial o totalmente) en un sentido posterior o posterolateral y presiona sobre las raíces nerviosas contenidas en el conducto vertebral. Aunque muchas veces se piensa que la hernia es el resultado de una rotura de origen mecánico, en discos sanos sólo puede provocarse *in vivo*, mediante la acción de unas fuerzas mecánicas más potentes que aquellas con las que puede tropezar normalmente. En la mayoría de las exploraciones experimentales es el cuerpo vertebral el que falla antes que el disco ^[66].

Parece necesaria la producción de algún cambio degenerativo antes de que el disco llegue a herniarse. En efecto, el examen de las piezas quirúrgicas o

necróticas hace pensar que el secuestro o hernia obedece a la migración de fragmentos sueltos del núcleo pulposo en fase de degeneración, que en condiciones normales ocupa una posición central, a través de unos desgarros preexistentes en el anillo fibroso externo. En este trabajo seleccionamos muestras degeneradas en vivo para su análisis celular en profundidad.

La protrusión es una herniación que mantiene contacto con el disco en el que se origina mediante un puente tan ancho o más que el diámetro del material desplazado. Una extrusión discal es una herniación más grande, de forma que el diámetro del material discal que se sale del espacio intervertebral es mayor que cualquier puente, si existe, de conexión con el disco de origen. Un fragmento de disco libre (secuestro) es una extrusión sin continuidad con el disco de origen (Figura 33). Puede encontrarse anterior o posterior al ligamento vertebral común posterior o en menos ocasiones, ser intradural. El fragmento libre se puede localizar a nivel del disco o desplazarse en sentido craneal o caudal, a menudo lateralizado por la existencia de un tabique delgado de orientación sagital en la línea de la parte discal del espacio epidural anterior.



Figura 33. Fases de la hernia discal

Ahora sabemos que la presión generada por la hernia sobre la raíz nerviosa no puede ser la causa del dolor en solitario, porque más del 70% de las personas asintomáticas “normales” tienen prolapsos discales pero no sufren dolor. En los individuos asintomáticos los nervios están de algún modo sensibilizados, tal vez por moléculas procedentes de la cascada inflamatoria originaria desde el ácido araquidónico hacia la prostaglandina E2, el tromboxano, la fosfolipasa A2, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las interleucinas y las MMP. Estas moléculas pueden aparecer en las células del disco herniado y debido al íntimo contacto físico entablado entre la raíz nerviosa y el disco después de producirse la hernia son capaces de sensibilizarla ^[67,68]

No se ha averiguado ni la secuencia exacta de los acontecimientos, ni las moléculas específicas que participan en ella, pero un estudio preliminar que reunió a pacientes con ciática tratados mediante antagonistas del TNF- α ofrece unos resultados alentadores y respalda la propuesta de ese mecanismo ^[69].

Por desgracia, los ensayos más recientes no han sido capaces de confirmar tales datos. Sin embargo, hay que tener cuidado a la hora de interrumpir la cascada inflamatoria que casi con seguridad desempeña alguna función en la evolución natural de la hernia. Parece probable que moléculas como las MMP producidas en grandes cantidades en los prolapsos discales, cumplan una misión fundamental en el curso natural de la reabsorción que se produce tras la hernia causal ^[70].

1.5.2 Estenosis de la columna

Los síntomas de una estenosis de la columna vertebral pueden ponerse en relación con diversas variaciones sufridas por esta estructura, la mayor parte vinculadas con la degeneración y el envejecimiento ^[71].

La degeneración del disco intervertebral con un gran abombamiento radial, puede traducirse así en una estenosis de la columna localizada aunque haya otros posibles factores con una intervención en este sentido, como un canal anormalmente disminuido (Figura 34) o el estrechamiento central del conducto raquídeo debido al engrosamiento frecuentemente de los ligamentos amarillos ^[71,72]. La estenosis también puede ocurrir en la zona más lateral, ocupando tres zonas posibles en relación con la salida de la raíz nerviosa de la columna (Figura 35).

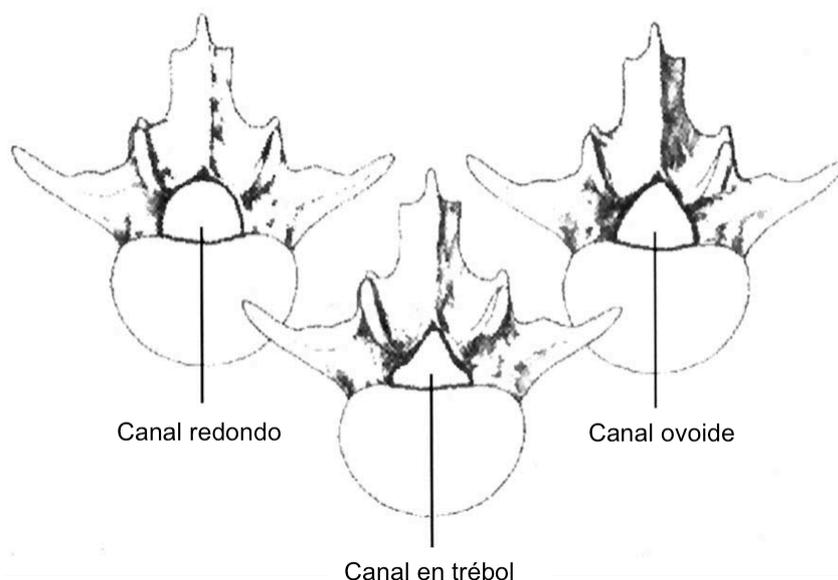


Figura 34. Tipos de canales lumbares. Imagen tomada de: Rothman RH, Simone FA, eds. *The spine*. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 832

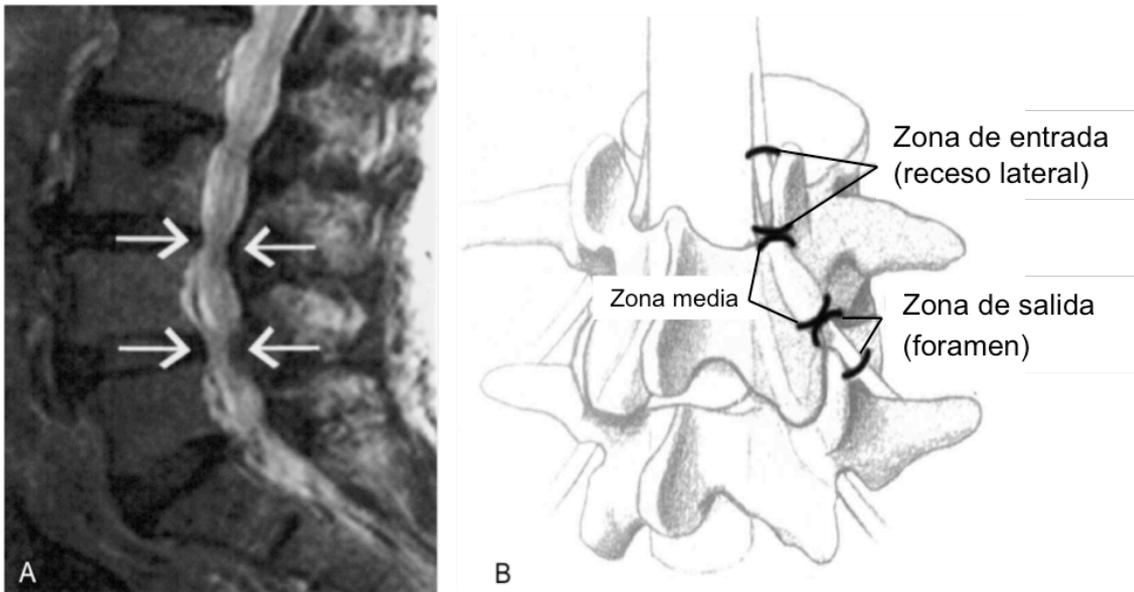


Figura 35. A: Estenosis central por hipertrofia de ligamentos amarillos. B: Los tres tipos de estenosis lateral. Imagen tomada de: Rothman RH, Simone FA, eds. *The spine*. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 832.

1.5.3 Deformidades de la columna

Tanto en la escoliosis como en la cifosis, los discos intervertebrales adoptan forma de cuña al igual que los cuerpos vertebrales (Figura 36). Existen múltiples trastornos congénitos, neuromusculares, etc., que desembocan en una escoliosis, pero la mayoría de las personas afectadas no presentan ninguna causa conocida (idiopática). Hasta donde se sabe hoy, las modificaciones producidas en la estructura y en la composición del disco escoliótico coinciden entre sí, sea cual sea su factor desencadenante.

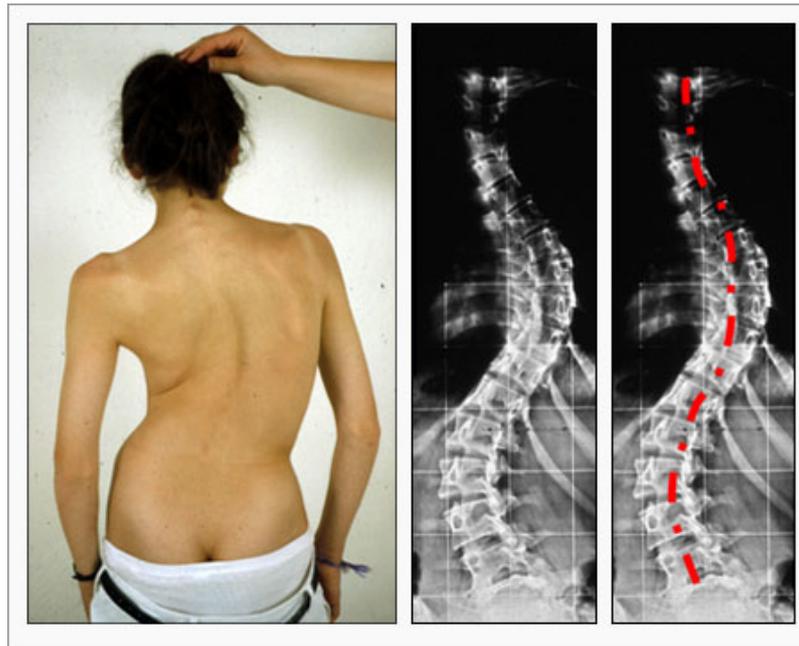


Figura 36. Deformidad de raquis

Se han identificado varios cambios en las propiedades bioquímicas del disco que afectan tanto a sus componentes estructurales principales, como también a los procesos generales de biosíntesis y recambio de los ingredientes que integran la matriz. Así, ha podido observarse que difieren de los discos sin escoliosis de una edad similar y que varían a lo largo de la curva, desde el lado cóncavo al convexo. También se ha descrito que la transformación en el tipo de colágeno producido y en el patrón existente de enlaces cruzados conlleva a una escoliosis ^[73].

El disco escoliótico manifiesta una acusada calcificación sobre todo en el platillo vertebral. Más recientemente, las técnicas empleadas para estudiar las vías seguidas por los nutrientes han revelado su afectación en la escoliosis,

siendo mayor la alteración en el vértice de la curva. Este fenómeno puede ser el responsable directo de la reducción en el número células en estos discos ^[74].

1.6 Abordajes terapéuticos

1.6.1 Tendencias en el tratamiento

Durante décadas, tras presentación por primera vez de la cascada degenerativa, ha parecido evidente que la degeneración discal es el resultado final de la relación entre sutiles alteraciones de las propiedades mecánicas y biomecánicas del disco intervertebral y el complejo de la articulación de las carillas. A medida que los médicos adquiramos mayor percepción de la cascada degenerativa, el tratamiento de la degeneración raquídea sintomática podría finalmente implicar una combinación de manipulaciones biológicas y procedimientos de reconstrucción menos ablativos.

Si bien el diagnóstico y tratamiento de los trastornos raquídeos generalmente se han centrado en aspectos biomecánicos, soluciones de tipo fusión raquídea y el recambio discal, es probable que los futuros tratamientos vayan dirigidos a intervenciones biológicas. Es posible que se disponga de las verdaderas terapias biológicas a medida que el proceso degenerativo y los mecanismos del dolor sean mejor conocidos. Los laboratorios de todo el mundo están siguiendo estrategias, como son el uso de factores de crecimiento, células precursoras y fármacos para tratar el frecuente y vejatorio problema del disco degenerativo doloroso.

A fecha de hoy no existe ningún tratamiento para prevenir, frenar o dar marcha atrás a la degeneración discal. Las opciones quirúrgicas o conservadoras ofrecidas en la actualidad a los pacientes aspiran a mitigar el dolor más que a modificar la evolución del cuadro. Las dos principales operaciones para tratar los procesos relacionados con el disco degenerado, la discectomía y la artrodesis, pueden lograr un alivio eficaz del dolor a corto plazo. Sin embargo, ambas alteran la biomecánica de la columna, con lo que crean el peligro de acelerar la degeneración de los discos que ocupan los niveles adyacentes y también pueden repercutir negativamente sobre otros tejidos de la zona.

Los diversos diseños de discos artificiales encaminados a restablecer la altura y la biomecánica discal después de su extirpación, han tenido aplicación en la clínica durante unos 15 años. Los casos descritos señalan unos resultados favorables, sin embargo no ha habido estudios controlados, ni tampoco se ha evaluado adecuadamente la eficacia a largo plazo de la sustitución discal. Hasta este momento, debería adjudicarse un carácter experimental a estos procedimientos y utilizarse únicamente en estudios clínicos. La reparación biológica del tejido constituye un enfoque alternativo para recuperar el funcionamiento del disco degenerado.

1.6.1.1 Tratamiento conservador

Es el tratamiento casi siempre inicial de duración limitada, 6-8 semanas, en el que empleamos medidas físicas, fármacos o técnicas más invasivas. El

objetivo es prevenir la cronicidad, disminuir el dolor, reincorporación del paciente a sus actividades básicas y laborales precozmente.

Terapia física

Existen ejercicios controlados por rehabilitación que ayudan a mejorar la potencia muscular, flexibilidad articular y estabilidad articular, logrando una mejoría global del segmento raquídeo tratado. Los programas los podemos encontrar en paginas tan completas y desarrolladas como la de la sociedad española de rehabilitación (<http://www.sermef-ejercicios.org>), disminuyendo su efectividad en casos de radiculopatía o en la fase aguda con dolor moderado-severo cervical. Incluimos en este apartado otros tratamientos como collarines, corsés o incluso cabestrillos.

Tratamientos farmacológicos

Encaminado a tratar el dolor y/o la inflamación, siguiendo las indicaciones analgésicas de escala de la OMS ^[75] (Aines, opioides menores, opioides mayores) asociando frecuentemente medicación coadyuvante (corticoides, antidepresivos tricíclicos, anticomiciales o relajantes musculares).

Técnicas invasivas

Radiofrecuencia facetaria, bloqueos epidurales, bombas de infusión espinal, rizolisis, teniendo un porcentaje mayor de complicaciones graves a nivel cervical que lumbar.

1.6.1.2 Discectomía o microdiscectomía

Consiste en retirar la parte del disco dañado y desplazado, cuando la enfermedad está únicamente localizada a nivel discal y es causa de dolor y daño neurológico, como en el caso de las hernias discales aisladas. Es una opción terapéutica quirúrgica con buena aceptación en pacientes jóvenes y a nivel lumbar, este procedimiento puede estar acompañado de flavectomía, mini o maxi laminectomía, por vía posterior. Cuando existen fenómenos degenerativos más extendidos o estenosis foraminales o de canal, la técnica requiere asociar otros procedimientos complementarios.

1.6.1.3 Discectomía y fusión anterior cervical

Smith y Robinson introdujeron la discectomía anterior y fusión en 1955 ^[76], biomecánicamente superior a la anterior es la técnica de elección en el tratamiento de hernias discales y espondilosis cervical. Hasta entonces, existía entre un 3-42% de pseudoartrosis con la técnica clásica, pero añadiendo un cruentando de los platillos hasta hueso subcondral se producía un 95% de fusión. *Cloward* describió posteriormente su técnica alternativa con injerto ^[77] y en la actualidad, con el suplemento de una placa de soporte anterior se disminuye la necesidad de inmovilización postquirúrgica, aumenta la rigidez y es especialmente útil en los casos de cirugía multinivel, mejorando el resultado consiguiendo una tasa de fusión similar a la de un nivel ^[78]. En cuanto asociar en la fusión anterior una resección de osteofitos de las unciformes, hay dispares resultados ya que la distracción que se produce supone una

descompresión indirecta suficiente a ese nivel ^[79] . Debemos tener en cuenta, utilicemos el procedimiento que sea, que hay factores como el tabaco que aumentan las tasas de pseudoartrosis ^[80].

1.6.1.4 Fusión cervical posterior

También encontramos defensores de la técnica posterior cervical, estos autores defienden la fusión vertebral posterior en los casos que precisen fusión multinivel, consiguiendo descompresión directa adecuada y manteniendo la lordosis fisiológica ^[81].

1.6.1.5 Disco adyacente sintomático

Habiendo encontrado un tratamiento eficaz como la artrodesis cervical que ofrece resultados en > 90% de los casos con fusiones > 90% y que parece el pilar del tratamiento actual de la radiculopatía y mielopatía cervical. ¿Por qué aparecen las prótesis de disco?

El concepto de disco adyacente es un concepto basado en publicaciones ya de literatura pediátrica ^[82] . Las artrodesis mostraban alteración de la cinemática y biomecánica *in vivo* creando fuerzas NO fisiológicas intradiscales y en las facetas, dando lugar a un fenómeno en continua evolución denominado disco adyacente sintomático cervical, donde se ha observado mayor incidencia de cambios degenerativos en el segmento vertebral adyacente > 3%/año y un 25.6% acumulativo a 10 años ^[83], llegando a suponer el 25% de las

reintervenciones por degeneración espacio adyacente a 10 años. En el transcurso de esta enfermedad se puede objetivar una disminución de movilidad y degeneración radiológica del segmento adyacente ^[84].

Siendo la incidencia de disco adyacente sintomático del 7-15%, aparece a una media 6.5 años tras la primera cirugía. Parecen ser factores de riesgo, número de niveles fusionados, alineamiento preoperatorio, diámetro del canal o el alineamiento tras fusión. Si bien el 30-63% de los pacientes mejoran con tratamiento conservador ^[85].

Se ha observado que fusiones multinivel tienen menos incidencia de segmento adyacente ^[86]. Aunque esta patología permanece en controversia pudiendo responder a la historia natural de la espondilosis cervical ^[87].

1.6.1.6 Prótesis discales

Las premisas para introducir las prótesis de disco eran que el mantenimiento de la movilidad (Figura 37) disminuía la incidencia de degeneración del disco adyacente comparado con la fusión. Que tenía una efectividad equivalente a la discectomía y fusión anterior, en relación a alivio de la sintomatología. Suponía una disminución de morbilidad perioperatoria (instrumentación, pseudoartrosis, abordaje, injerto óseo, inmovilización postoperatoria), facilidad para su implante, con un índice de complicaciones no mayor que la discectomía con fusión anterior y permitiría la incorporación temprana del paciente a sus actividades.



Figura 37. Movilidad de prótesis discal

Su desarrollo se ha basado en la cinemática de la columna vertebral, vital para el diseño y evolución de cualquier prótesis. Su estructura anatómica está formada por un núcleo el cual se somete a compresión y un anillo que controla el movimiento en todos los planos, precisando una resistencia progresiva y consiguiendo seis grados de libertad para moverse tridimensionalmente.

El disco cervical es el mayor estabilizador de la columna cervical. La prótesis debe mantener la estabilidad espinal, manteniendo el rango de movimiento apropiado, carga fisiológica de las facetas articulares y debe tratar de restaurar el eje instantáneo de rotación sin afectar al movimiento característico de las facetas, de esta forma han ido evolucionando (Figura 38).

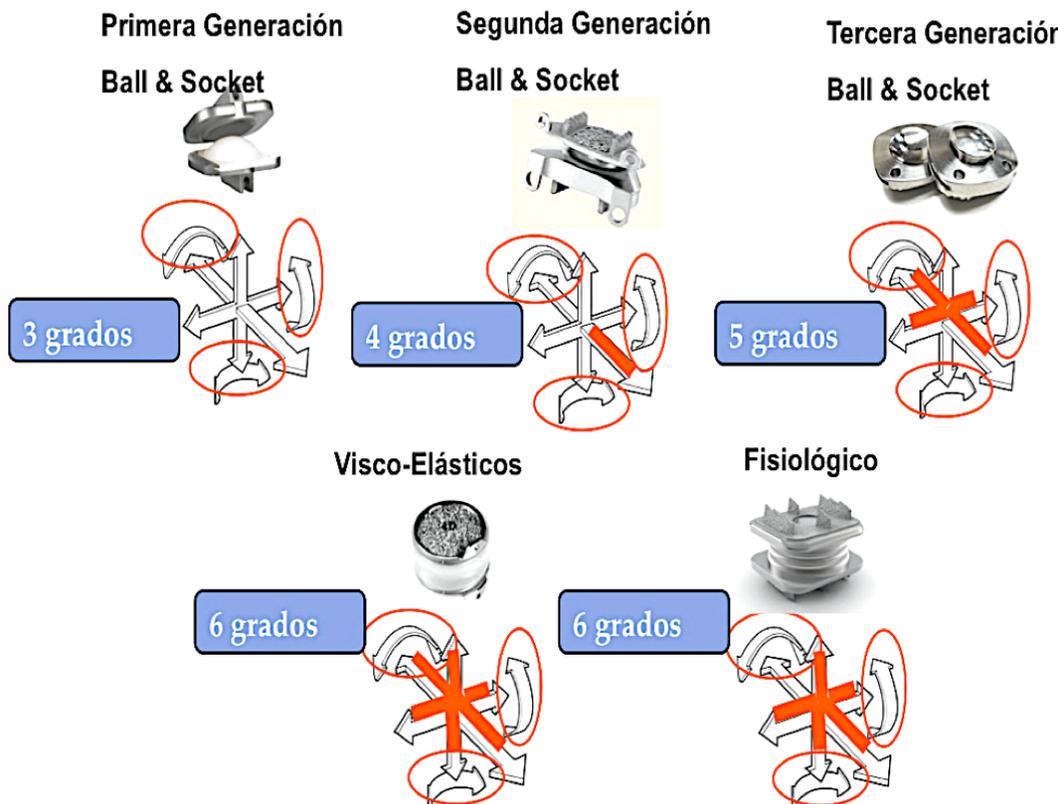


Figura 38. Desarrollo de grados de libertad de las prótesis de disco

Hasta el diseño de las prótesis actuales, más próximas al movimiento fisiológico con seis planos de movimiento (Figura 39) tridimensional, con translación independiente de rotación, un centro de rotación dinámico y con buenos resultados bibliográficos.

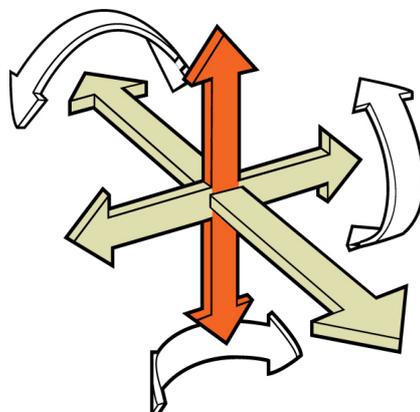


Figura 39. Seis planos de movimiento

Analizando datos de recirugía a 5 años, 2.9% prótesis / 14.5% artrodesis ^[88], incluso mejores resultados con prótesis y mayor supervivencia a largo plazo respecto a la fusión ^[89]. También se presentan buenos resultados y justificación económica, 36.105\$ (prótesis) / 42.944\$ (artrodesis), con estancia media de 1.6 días con las prótesis / 2.1 días con la artrodesis ^[90]. Aunque si bien es cierto, que los pacientes candidatos de prótesis son mas jóvenes, con menos comorbilidad, ocasionando un lógico menor gasto sanitario.

No existen en los estudios diferencias de movimiento en el segmento adyacente en ambos grupos, entre prótesis y artrodesis. Sólo el tiempo parece un predictor significativo de cambios en el rango movimiento del segmento adyacente. El diseño del implante y la técnica quirúrgica carecen de influencia.

Las prótesis no constreñidas pierden más alineamiento sagital a largo plazo. ^[91]. Aun así, los estudios siguen sin encontrar claras diferencias entre disco adyacente tras fusión o prótesis ^[92,93].

En conclusión, hay resultados excelentes inicialmente pero el resultado final depende de demostrar su eficacia clínica a largo plazo teniendo en cuenta la relación coste/efectividad, ya que no se disponen de estudios a más de 10 años. Y la idea que supone, que preservando el movimiento se reduce la enfermedad del segmento adyacente permanece sin poder probarse en la actualidad.

1.6.2 Reparación biológica del tejido

El objetivo final de estos tratamientos radica en conseguir la reparación celular de la matriz perteneciente al disco degenerado con el fin de restablecer las propiedades titulares, el funcionamiento mecánico, la altura del disco y prevenir así, la degeneración de los tejidos vecinos de la columna y la aparición de una estenosis a este nivel.

1.6.2.1 Tratamiento génico

Un planteamiento propuesto ha consistido en estimular las células discales existentes mediante moléculas que influyan sobre la actividad celular. Dos grupos han actuado como dianas, los factores de crecimiento, que son capaces de acelerar la velocidad de síntesis de la matriz hasta cinco veces, y las citocinas que propician una desaparición de la matriz al inhibir su producción a la vez que estimulan la fabricación de compuestos implicados en la degradación tisular. Sin embargo, la inyección directa de factores de crecimiento o de inhibidores de las citocinas ha resultado inútil debido a su eficacia tan efímera en el disco. Las investigaciones recientes con discos de conejo, han descubierto que la inyección del factor de crecimiento OP-1 (BMP-7) permite estimular la recuperación de la altura discal en un modelo de lesión determinado ^[94].

Un método alternativo para activar las células plantea la terapia génica, que posee la capacidad de mantener unas concentraciones titulares elevadas del

factor de crecimiento en cuestión o del inhibidor. En esta técnica se introducen los genes correspondientes a las moléculas elegidas (p.ej., el factor transformador del crecimiento B que inhibe las citocinas, incluida la interleucina) en las células discales que a continuación siguen fabricando estas proteínas. Aunque los experimentos realizados han puesto de manifiesto que la transferencia de genes permite incrementar casi seis veces la producción del factor transformador del crecimiento B en las células discales de un conejo, este tratamiento aún dista mucho de tener una aplicación clínica.

Aparte de las dudas surgidas sobre la inocuidad de los procedimientos actuales después de los recientes problemas clínicos padecidos, todavía han de desarrollarse los métodos para conseguir una administración eficaz de los genes a las células discales humanas. Asimismo, la elección correcta de los genes terapéuticos exige mejorar los conocimientos existentes sobre la patogenia de la degeneración. Conocemos que la densidad celular de los discos humanos normales es baja y muchas de las células que contienen los discos degenerados o deformados están muertas, por lo tanto la estimulación del resto puede no ser suficiente para reparar completamente la matriz.

1.6.2.2 Reparación celular

La implantación de células por sí solas o sumadas a la terapia génica son una solución capaz de superar el problema planteado por la escasez de células en un disco degenerado. En este caso, las células existentes se ven complementadas con la ayuda de otras nuevas. Esta técnica se ha aplicado

satisfactoriamente en el cartílago articular y se ha intentado con cierto éxito en los discos de los animales. Sin embargo, en la actualidad no existe ninguna fuente evidente de células útiles desde el punto de vista clínico en especial para el núcleo, la región que despierta un mayor interés. Además, en los experimentos más recientes consistentes en introducir a los conejos células cultivadas del anillo, aunque la altura del disco se conservaba aparecía un tejido de reparación de tipo hialino, en vez de aquel otro más elástico necesario para el funcionamiento adecuado del disco, lo que indica que la obtención de unos resultados positivos en una reparación exige unas condiciones de cultivo y un tipo de células adecuados.

Otro problema fundamental estriba en que la situación de los discos degenerados, en especial si la vía nutritiva ha quedado dañada, puede no ser la más favorable para la supervivencia de las células implantadas. La transferencia de células discales autólogas se ha aplicado en la clínica sobre un pequeño grupo de pacientes cuyos resultados iniciales han recibido una descripción prometedora, aunque haya pocos detalles disponibles acerca de los propios pacientes o de la medición de sus respuestas.

Hoy por hoy, aunque los trabajos experimentales ponen de manifiesto la capacidad de estos tratamientos basados en las células, tenemos diversas barreras a superar que impiden su aplicación.

1.7. Terapia celular: empleo de las células “stem” en ingeniería tisular.

1.7.1. Concepto y antecedentes

La ingeniería tisular puede definirse como la utilización combinada de células, biomateriales y factores bioquímicos para reparar tejidos lesionados o enfermos. Es un campo multidisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de la biología para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular. Actualmente la ingeniería tisular combina el aporte de células, indiferenciadas o diferenciadas, que se colocan sobre una matriz, a la cual se pueden añadir factores que aceleren su proliferación e indiferenciación para ser trasplantadas a la estructura dañada y conseguir su regeneración. También, las células se pueden tratar en el laboratorio, para que liberen sustancias beneficiosas para la reparación de los tejidos. Estas células se deben combinar con un molde que reproduzca la estructura tridimensional tisular, funcional y semejante al tejido que debe reemplazar.

Se han utilizado estrategias diferentes combinando matrices biocompatibles, factores de crecimiento, trasplantes celulares y terapias de liberación génica. Por su parte, los criterios que se deben seguir son producir un número suficiente de células y tejido para conseguir la reparación completa, mantener y diferenciar las células hacia el fenotipo correcto, asegurar que tanto las células como los tejidos adoptan la organización tridimensional necesaria y producen matriz extracelular. A veces, se requieren moldes biorreabsorbibles hasta que

las células son capaces reproducir su propio medio. Además, las células y los tejidos deben adaptarse e integrarse a las demandas del tejido que van a reparar, conseguir una integración completa y una vascularización adecuada con el tejido local y siempre, hay que valorar el riesgo de un rechazo inmunológico. Por tanto necesitamos células, moldes portadores y factores de crecimiento integrados en la estructura a reparar.

El primer componente y centro de interés de nuestro estudio, son las células troncales pluripotenciales (o CSM, células “stem” mesenquimales, del inglés Mesenchymal Stem Cells, de ahí la abreviatura MSC). Las CSM se caracterizan por tres propiedades: autorrenovación, capacidad de desarrollarse en múltiples líneas celulares y el potencial de proliferar sin límite.

Las CSM poseen una gran capacidad para la autorrenovación y la capacidad de migrar a distintas partes del cuerpo, sobrevivir e incluso establecer nuevas colonias. Son células indiferenciadas, que por mecanismos externos pueden dirigirse, por diferentes vías, hacia distintas líneas celulares de estirpe mesodérmica.

La literatura anglosajona las conoce como “mesenchymal stem cells” (MSC) y son capaces de originar, desde una célula indiferenciada otro tipo de células de diferente fenotipo.

Las CSM postnatales pueden hallarse en diversas localizaciones, como la médula ósea, tejido adiposo, paredes venosas, sangre periférica, placenta fetal y materna, ligamento periodontal, periostio y hueso trabecular ^[18].

Las CSM fueron descritas en 1968, cuando *Friedenstein et al* ^[8] establecieron que había unas células adherentes, que formaban clones, no fagocíticas y fibroblásticas, definidas como *colony-forming units-fibroblastic* (CFU-Fs) que pueden ser aisladas del estroma de la médula ósea de los organismos nacidos.

Como señalaron estos autores, pueden proliferar en condiciones experimentales adecuadas en un amplio espectro de tejidos conectivos, diferenciados, incluyendo cartílago, hueso, tejido adiposo, fibroso y estroma medular.

El empleo de CSM del adulto tiene diversas ventajas pues no plantean ningún problema ético ya que se encuentran en muchos puntos del organismo, son relativamente fáciles de obtener, no tienen problemas inmunológicos y han demostrado una efectividad superior a la de las células embrionarias sin observarse capacidad tumorigénica.

Todas las células mantienen morfología similar e inmunofenotipo, después de muchos pases de cultivo. Sin embargo, las características de las células troncales obtenidas de un sitio o de otro varían, como veremos a lo largo de nuestro trabajo.

Además se ha comprobado, que la celularidad de la médula ósea disminuye con la edad, aunque se pueden obtener en mayor o menor cantidad, en todos los pacientes de cualquier edad. Cabe pensar que las células migran, aunque no se encuentran en mucha cantidad por la sangre periférica. Tampoco sabemos como se integran en la cascada reparadora después de una lesión, ni conocemos los mecanismos de replicación, los factores de crecimiento ni las citocinas que dirigen este proceso, aunque ciertos resultados ya comienzan a vislumbrarse. Lo que permitirá a las nuevas líneas de tratamiento de ingeniería tisular utilizar, factores de crecimiento, células y medios de soporte adecuados.

1.7.1.1. Células madre

Una célula madre (también denominada célula stem) se define como aquella que tiene las siguientes tres características ^[95]:

- Capacidad de autorrenovación o de formar durante su división al menos una copia idéntica de la célula inicial, con las mismas características y propiedades biológicas.
- Capacidad de diferenciación hacia una (o varias) células maduras con función especializada.
- Capacidad de proliferación a largo plazo.

En los años 60, los experimentos de *Till y McCulloch*, basados en el trasplante de células mononucleadas de médula ósea en ratones letalmente irradiados, demostraron por primera vez la existencia de células con estas

propiedades en la médula ósea, las células madre hematopoyéticas ^[96].

Posteriormente, un número creciente de estudios han demostrado que la médula ósea, contiene células madre con mayor versatilidad que las células madre hematopoyéticas, además de las células progenitoras del estroma medular o células madre mesenquimales ^[97]. Hay por ello un interés creciente en el aislamiento y expansión de estos tipos celulares, por su potencial empleo como herramienta terapéutica en programas de terapia celular somática. Entre los tipos celulares aislados en MO con mayor versatilidad se encuentran las MAPC (del inglés “Multipotent Adult Progenitor Cells”), descritas inicialmente por el grupo de investigación de la Dra. Verfaillie ^[95, 98-101] que poseen capacidad de diferenciación *in vitro* hacia tipos celulares derivados de las tres líneas embrionarias. Otro tipo de célula madre que está presente en la MO adulta es el denominado hemangioblasto (célula que previamente se creía limitada a etapas precoces del desarrollo embrionario), con capacidad de diferenciación tanto a línea hematopoyética como endotelial ^[102-105].

Diversos autores, han descrito otros tipos celulares en la médula ósea y dependiendo del método y/o características de los mismos los han denominado de distinta forma. Así, podrían existir en la MO las llamadas células MIAMI (del inglés “human marrow isolated adult multilineage inducible cells”) o las células VSEL (del inglés “very small embryonic-like stem cells”). Finalmente, junto a éstas existen otras células madre más restringidas en su capacidad de diferenciación y descritas con anterioridad, como las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) y las células stem mesenquimales (CSM), sobre las

que profundizaremos en el presente trabajo. Las CPH, son las encargadas de la regeneración del tejido hematopoyético y por tanto, de mantener la producción celular durante toda la vida del individuo para cubrir el recambio celular que se produce continuamente.

El interés por estas células ha ido creciendo debido a las posibles funciones que pueden desarrollar gracias a su papel, como células progenitoras del estroma medular, en el soporte de la hematopoyesis y también por su actividad inmunoreguladora ^[106]. Se ha demostrado también la multipotencialidad de dichas células, la posibilidad de diferenciarse hacia distintas estirpes celulares y su papel en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH). La interacción entre las células del estroma y las CPH es fundamental para mantener una hematopoyesis eficaz ^[107-110].

1.7.1.1.1 Caracterización de las CSM

A la hora de identificarlas, en cultivo estas células suponen una población heterogénea de células de aspecto fibroblástico y morfología fusiforme ^[8]. Ahora bien, los datos existentes sobre su caracterización indican que estas células comparten características inmunofenotípicas con células endoteliales, epiteliales y musculares ^[18,111-119]. Además carecen de marcadores específicos de otros tipos celulares presentes en MO o en sangre periférica, como son: CD14 (monocitos), CD34 (célula stem hematopoyética), CD45 (marcador panleucocitario) o CD19 (linfocitos B) ^[18,95,114-117,119].

Sin embargo, todavía no disponemos de unos criterios fenotípicos bien definidos que caracterice a las CSM, pues no conocemos un marcador de superficie único que identifique correctamente y con seguridad las CSM. Por ello, es necesario efectuar tinciones fenotípicas, positivas y negativas que permitan conocer estas células aunque no están libres de discusión. Esto se complica con el hecho de que las CSM presentan caracteres comunes con otros tipos celulares como pueden ser células endoteliales, epiteliales o musculares. Las CSM expresan varios tipos de marcadores de superficie como CD9, CD10, CD13, CD44, CD54, CD55, CD90, CD105, CD166, D7-FIB y son negativas para CD14, CD34, CD45 y CD133.

Cuando se aíslan por fraccionamiento y gradientes de densidad, permanece una mezcla heterogénea de células con una proliferación variada y diferentes potenciales de proliferación. Sin embargo, para una aplicación terapéutica correcta y una comprensión rigurosa de las CSM, se requiere una mejor definición de qué es una CSM. En la tabla siguiente se establece 16 proteínas de superficie, que permiten conocer por su marcaje o porque no marcan, las CSM. La mayoría de los marcadores son positivos o negativos igualmente en CSM humanas y en ratón, aunque el problema actual es que no disponemos de un marcador positivo, único y característico, para las CSM. *Kolf et al* ^[120] recomiendan Stro-1, CD73 y CD106 como los marcadores con mayor efectividad (Figura 40).

TIPO DE MARCAJE	ANTÍGENO DE SUPERFICIE
Positivo	Stro-1 CD 13 CD 29 CD 44 CD 73 CD 105 CD 106
Negativo	CD 11b CD 31 CD 34 CD 45 CD 117
Variable	SCA-1 CD 10 CD 90 Flk-1

Figura 40. Antígenos de superficie de CSM (*Kolf et al*)

Además, las CSM son positivas para muchos marcadores de superficie: CD105 (SH2), CD166 (ALCAM), CD54 (ICAM-1), CD55, CD13 (APN), CD73 (SH-3, SH-4), CD90 (Thy-1) y CD44 y negativos para marcadores de superficie propios de las células hematopoyéticas, como son: CD34, CD45, CD14, CD31, CD133 y CD50. Las CSM no expresan CD11b, un marcador celular inmunológico, ni glicoporina-A, un marcador de línea eritroide o CD45, un marcador de células hematopoyéticas. Tampoco el CD31, expresado en células endoteliales, hematopoyéticas y progenitoras, aunque hay diferencias entre los diferentes estudios dependiendo por el método de cultivo y el estudio de diferenciación celular. Hay otros muchos marcadores expresados por las

CSM que no son tenidos en cuenta por su falta de consistencia en la expresión, especificidad o por falta de suficientes datos, como son CD271/NGFR, CD44, CD29, CD13, Flk-1/CD309, Sca-1 y CD10 ^[121].

En la actualidad, por tanto, no se conoce ningún marcador específico que defina a las CSM. Por este motivo y para evitar la dificultad a la hora de comparar diferentes trabajos sobre las CSM, la sociedad internacional de terapia celular (ISCT, del inglés “International Society for Cellular Therapy”) propone unos criterios mínimos para definir una CSM ^[17].

Estos criterios son:

1. Las MSC deben tener capacidad de adherencia al plástico, cuando se mantienen en condiciones estándar de cultivo.
2. Deben expresar determinados marcadores (CD105, CD73 y CD 90) y no expresar otros marcadores específicos de diversas líneas hematopoyéticas, como CD45 (panleucocitario), CD34 (células progenitoras hematopoyéticas), CD14 o CD11b (monocitos), CD79 alfa o CD19 (linfocitos B), ni tampoco expresar moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad mayor (HLA-DR).
3. Las CSM deben mostrar capacidad de diferenciarse *in vitro*, hacia osteoblasto, adipocito y condroblasto.

Otra característica interesante de las CSM es la capacidad para secretar múltiples citocinas ya sea en reposo o tras estimulación. Estas citocinas

incluyen, tanto factores de crecimiento hematopoyético como no hematopoyético y sugieren que las CSM están implicadas en el desarrollo del estroma medular y por tanto, de las propias células mesenquimales por mecanismos autocrinos.

Además, se ha demostrado también, la presencia de receptores para citocinas y factores de crecimiento. La interacción entre los distintos factores y sus receptores hace pensar que las CSM están implicadas de forma dinámica en el mantenimiento del microambiente celular ^[18,122].

1.7.1.1.2 Potencial de diferenciación

En los primeros estudios sobre células mesenquimales se estudió la capacidad de éstas para diferenciarse únicamente hacia células del tejido al cual pertenecían. Sin embargo, estudios posteriores han ido demostrando su capacidad de diferenciación hacia múltiples líneas ^[123]. Una de las formas de identificación de las CSM, es su capacidad para diferenciarse *in vitro* hacia hueso, grasa y cartílago ^[124]. Además, las CSM pueden diferenciarse hacia otros tejidos como tenocitos, miocitos esqueléticos y otras células del mesoderma ^[18, 125,126].

Como ya hemos dicho, según la sociedad internacional de terapia celular, la diferenciación a adipocito, osteoblasto y condrocito es necesaria para la caracterización de las CSM:

Diferenciación a osteocito

La diferenciación osteogénica requiere la presencia de β -glicerolfosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona y suero bovino fetal. La diferenciación se hace evidente al adquirir las células, morfología osteoblástica y por la expresión de la actividad de la fosfatasa alcalina, apareciendo incluso depósitos de calcio, que se observan tras la tinción con BCIT-NBT.

Diferenciación a adipocito

Para estimular la diferenciación hacia adipocito, las CSM deben incubarse con dexametasona, insulina, isobutilmetilxantina e indometacina. En este caso se ven vacuolas lipídicas dentro de las células y expresan el receptor PPAR gamma 2 lipoproteinlipasa y la proteína ácida P2 ^[18]. Con el tiempo las vacuolas lipídicas se van agrupando y llenando el citoplasma celular. Estos acúmulos de lípidos se estudian histológicamente con oil red O ^[124].

En distintos estudios, se ha tratado de identificar el mecanismo que regula la conversión de las CSM en adipocito. El PPAR gamma 2, es un activador de la diferenciación hacia adipocito, mientras que actúa negativamente sobre la diferenciación a osteoblasto ^[127].

Esto hace pensar en una relación recíproca entre la osteogénesis y la adipogénesis, de forma que la diferenciación por un camino restringe la expresión de genes específicos del otro linaje ^[128].

Diferenciación a condrocito

Para la diferenciación cartilaginosa la metodología es algo diferente a las anteriores, puesto que debe realizarse en un tubo Falcon para que se pueda expandir en tres dimensiones. De este modo se mantienen las células sin suero y en presencia de TGF- β , hasta que pierden su morfología fibroblástica y comienzan a expresar componentes cartilaginosos específicos.

La presencia de TGF- β siempre se ha considerado necesaria ^[129-131], pero estudios recientes ^[132], con médulas de origen bovino han demostrado que no hay diferencias en los resultados cuando los cultivos se realizan en ausencia de TGF- β .

Además de estos tejidos, el abanico de posibilidades de diferenciación de estas células es muy amplio. Todos los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, demuestran que la población de células mesenquimales puede diferenciarse hacia distintos linajes. Se conoce como mesengénesis, el proceso por el cual se diferencian los distintos tejidos mesenquimales a partir de las CSM. Así durante el estado adulto, los vertebrados conservan la capacidad de reparar sus huesos, cartílagos, tendones, músculos, el propio estroma medular, el tejido adiposo y cualquier otro tejido conectivo ^[133].

1.7.2 Las células estromales de la médula

En el organismo nacido, las CSM residen en la porción luminal de los sinusoides medulares y forman una red celular tridimensional que recubre la red de sinusoides. Estas dos redes salen de la ramificación de las arteriolas terminales de la médula y su capa adventicia respectivamente. Las células adventicias son elementos mielo-soportadores que se pueden convertir directamente en adipocitos y pueden generar osteoblastos *in vitro*. Las células estromales de la médula, se establecen en la cavidad medular al formarse un anillo óseo y antes del comienzo de la hematopoyesis. Paradójicamente, aparece y funciona el tejido en el cual residen los precursores osteogénicos después rediferenciarse los osteoblastos. El anillo óseo primitivo, establecido por estos osteoblastos, se erosiona por los osteoblastos para permitir la invasión vascular y la formación de una cavidad medular. Los vasos traen a la cavidad medular las células osteogénicas, que se han diferenciado previamente en el periostio y se disponen como células perivasculares. El desarrollo de sinuosidades, caracterizados por un fluido vascular lento y muros endoteliales permeables, permiten la siembra en el medio extravascular con las células hematopoyéticas troncales (HSC), que interactúan con el ambiente estromal primitivo que permite la hematopoyesis.

Finalmente, se forma una red continua de células en el espacio medular que se extiende desde el lumen de los vasos hasta las superficies óseas a través de las células estromales entremezcladas con células hematopoyéticas. Esto explica la continuidad física, biológica del hueso y la médula ósea que

constituyen un órgano único. Las células estromales en la primitiva médula ósea no hematopoyética aparecen como preosteoblastos, mientras que las células de la médula activa hematopoyéticamente son quiescentes mitóticamente pero siguen expresando los marcadores osteoblásticos, fosfatasa alcalina a niveles elevados.

1.7.2.1. Células progenitoras mesenquimales

Los estudios de *Friedestein et al* ^[8, 134-136] sirvieron para la identificación de esta población celular, por su capacidad para formar colonias de aspecto fibroblástico *in vitro*, además de cuantificar su presencia entre las células mononucleadas (CMN) de la MO (1 por cada 104-105 CMN). También se demostró su capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares y para generar el microambiente hematopoyético ^[137-141].

La formación de la cavidad medular y el estroma medular requiere el factor de transcripción *cbfa1*, que controla la diferenciación osteogénica y conduce a la formación ósea. La médula ósea es un centro para el desarrollo de ingeniería tisular, no sólo el órgano donde se encuentran dos tipos de células bien diferenciadas (HSC y SSC) (estromales y hematopoyéticas), también donde se pueden encontrar los progenitores de un número muy variado de tejidos. La separación entre tejido mesodérmico, tejido hematopoyético y las líneas celulares está desapareciendo, pues las células capaces de regenerar los vasos sanguíneos, el músculo esquelético y el músculo cardíaco también se encuentran en la médula ósea. El potencial inesperado para la biogénesis y la

cardiomiogénesis se han adscrito tanto a las HSC como a las CSM en la médula. Las SSC pueden, tal vez, transformarse en neuronas o glías, las HSC de ratón pueden regenerar las células hepáticas y también las células capaces de regenerar el hueso se pueden encontrar en la sangre.

Posiblemente las HSC son mucho más de lo que pensamos actualmente, las células multipotenciales troncales verdaderas con mayor potencial, que en condiciones normales están dedicadas a la hematopoyesis. Las células medulares tienen la ventaja de ser fáciles de obtener y cultivar a partir de un organismo adulto y las células HSC pueden ser aisladas y purificadas de un organismo *ex vivo*.

1.7.3 Las CSM y el nicho hematopoyético

La hematopoyesis durante la vida fetal y la diferenciación hacia las células sanguíneas en la vida adulta, depende de la existencia de un microambiente que aporta las señales necesarias a través de factores solubles e interacciones celulares. Las células que constituyen este micro ambiente, definidas como el nicho hematopoyético, derivan de un progenitor común de origen mesenquimal [142]. Atendiendo a la evidencia de que la formación y resorción óseas son necesarias a la hora de establecer el desarrollo hematopoyético, es de prever que los osteoblastos tengan un papel crucial en la hematopoyesis y recientes estudios, demuestran que son un factor importante del nicho hematopoyético [143-144]. Para la hematopoyesis medular se han definido al menos tres compartimentos especializados: nichos óseos, con los osteoblastos; el estroma

medular con células reticulares, fibroblastos, adipocitos, células endoteliales y macrófagos; los adipocitos que constituyen el espacio no hematopoyético dentro de los huesos largos ^[106].

El concepto de nicho en las CSM es importante pues estas células no están aisladas en la médula ósea de los mamíferos. Este concepto lo introdujo *Schofield*, considerando todos los elementos que rodean las CSM cuando están en su estado nativo, incluyendo las células no troncales que están en contacto con ellas, la matriz extracelular y las moléculas solubles encontradas en el mismo medio. Todos los elementos actúan conjuntamente para mantener las células troncales y que se diferencien cuando sea necesaria la regeneración o repoblación de un tejido.

Parece que el nicho de las CSM tiene una naturaleza perivascular basado en la expresión de actina-a de músculo liso (aSMA) en las CSM aisladas y en la localización inmunohistoquímica con CD45-/CD31-/Sca-1+/Thy-1+ en células perivasculares. Además, se ha visto que las CSM se han identificado con marcadores Stro-1 y CD146 formando líneas alrededor de los vasos en la médula ósea y pulpa dental. Estas células expresan aSMA y algunas expresan 3G5, un marcador celular de superficie relacionado con los pericitos. Se ha hipotetizado incluso, que las CSM son de hecho pericitos ya que también se diferencian en osteoblastos, condrocitos y adipocitos. La localización de CSM en los nichos perivasculares le darían facilidad de acceso a todos los tejidos y contribuye a la creencia de que las CSM pueden reparar muchos y diferentes tejidos.

El microambiente de la médula ósea es muy complejo. No sólo contiene HSC y CSM, hay otros muchos tipos de células como son los macrófagos adherentes, antígenos, células dendríticas, endoteliales y células de origen mesenquimal como son los osteoblastos y adipoblastos. Las CSM se diferencian y producen tejido mesenquimal dentro y fuera de la médula ósea incluyendo el propio estroma medular, hueso, cartílago, tendón, grasa y músculo. Sin embargo, las señales extra o intracelulares necesarias para mantener el desarrollo del microambiente de ambas en la médula ósea es muy distinto. Una caracterización de las interacciones celulares, bioquímicas y moleculares de las CSM en su nicho es necesario para entender como se regulan las células *in vitro*.

Liechty et al trasplantaron CSM en el útero de ovejas preñadas, inyectadas en la cavidad peritoneal del feto. La oveja recién nacida fue sacrificada 13 meses después de la inyección. Estudiando el bazo, hígado, pulmón, médula ósea, timo cerebro, corazón, músculo esquelético, cartílago y sangre se analizaron y caracterizaron las CSM, demostrando que contribuyen de alguna forma a la formación de los condrocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos, células estromales de la médula ósea y estroma tímico. No se encontraron signos de rechazo, lo que demuestra que tienen propiedades inmunológicas únicas además de sus características multipotenciales ^[145].

Un aspecto relevante es que el medio medular óseo es hipóxico. Comparando las CSM humanas cultivadas en condiciones de hipoxia frente a condiciones normales (2% y 20% de oxígeno) muestran que su capacidad proliferativa es

muy superior en la primera ^[146]. Es decir, la hipoxia es necesaria para mejorar la proliferación de las CSM y mantener su plasticidad.

1.7.3.1 Otras fuentes de obtención de CSM

La posibilidad de obtener CSM de distintas especies y localizaciones ha sido objeto de reciente interés. Las CSM pueden, por un lado, aislarse de múltiples especies. Las más conocidas son aquellas de origen humano, ratón y rata ^[18,147]. Ahora bien, la posibilidad de aislarlas de otras especies tales como babuinos, ovejas, perros, cerdos, vacas y caballos aportan una mejor oportunidad para comprobar sus posibilidades terapéuticas en mamíferos ^[131,132,148,149].

En cuanto a las localizaciones como es esperable por su fácil accesibilidad, la fuente mejor estudiada es la médula ósea, aun sabiendo que su presencia en dicho tejido representa solamente 0,01-0,0001% de las células nucleadas de una médula ósea humana. Ahora bien, se han conseguido aislar CSM de recolecciones de células madres de sangre periférica movilizada ^[150] (la modalidad de donación de progenitores hematopoyéticos de uso más extendido en la actualidad ^[151]) de muestras fetales obtenidas durante el primer trimestre de embarazo tanto sanguíneas, como de hígado o médula ósea, pulmón fetal, de las vellosidades coriogénicas de la placenta y del fluido amniótico ^[152-155]. Una pequeña proporción de CSM puede también ser aislada de sangre procedente del cordón umbilical, de sangre periférica del adulto y de mujeres sanas durante el embarazo ^[156-158].

En este caso parecen ser células de origen fetal que persisten en el organismo durante más de 60 años ^[106]

Otros trabajos proponen otros tipos de fuentes tan variadas como pueden ser la grasa, folículos pilosos, tejido del cuero cabelludo, ligamentos periodontales y tejidos prenatales como la placenta, medula ósea fetal, sangre, pulmón, hígado o bazo ^[154, 159-161].

1.7.4 Remodelación y renovación

Muchos tejidos con células adultas contienen poblaciones de células con capacidad para renovarse después de un trauma, enfermedad o con la edad. El problema que se plantea es si son sólo las CSM o es el conjunto de células del tejido las que se diferencian, cada una de ellas en dos o tres líneas. Las células postnatales diferenciadas del sistema estromal pueden adoptar fenotipos alternativos de otras células del mismo sistema, tanto *in vivo* como *in vitro*. También las células reticulares adventicias humanas fosfatasa alcalina positivas que normalmente funcionan como elementos mielosoportadores, pueden acumular grasa de forma rápida y aparecer como adipocitos actuando como mielosupresores *in vivo*. Estas células son capaces de girar dinámicamente entre dos fenotipos “terminales” reconocidos (reticular y adipocito) de la progenie de las CSM. Este fenómeno refleja la plasticidad del sistema estromal de la médula ósea y la diferencia del sistema hematopoyético. La plasticidad de los fenotipos diferenciados en el sistema estromal implica que el compromiso y la diferenciación pueden ser no

irreversibles, tanto las células completamente diferenciadas, como en condrocitos hipertróficos o células estromales, que siguen la corriente de una CSM putativa indiferenciada que puede diferenciarse simultáneamente y de forma multipotencial.

La fase sólida de los tejidos mesodermales necesita ser plástica. La relevancia fisiológica de los fenómenos de la remodelación de la matriz en organismos en crecimiento y la integridad de los tejidos se ha ilustrado con el ratón MT1-MMP deficiente, un ratón con un fenotipo de membrana tipo 1 metaloproteinasa de matriz deficiente en el cual la remodelación del tejido conectivo está bloqueada como resultado de una degradación de la matriz, llevando a cambios adversos en el tejido mesodérmico.

La remodelación y adaptación coordinada de tejidos de interfaz (hueso/tendón, hueso/ligamento, hueso/cartílago, tendón/músculo) durante el crecimiento orgánico requiere que las uniones físicas entre los diferentes tejidos sea capaz de girar en el espacio. Plasticidad y multipotencialidad de las células residentes en el tejido mesodérmico puede ser crucial en tejidos conectivos y sus progenitores, como la autorrenovación es para la sangre y las células hematopoyéticas.

La renovación y los patrones asociados de replicación celular y diferenciación, sirve para el relleno de células no adherentes de corta vida en un organismo de larga vida, mientras que la flexibilidad fenotípica y la flexibilidad en el control de la transcripción durante la diferenciación, sirve para la adaptación de los tejidos.

La renovación se refiere a los patrones biológicos y mecanismos que preservan el estado troncal indiferenciado. Se han utilizado “*arrays*” genómicos para identificar firmas moleculares que mantienen el estado troncal de las células, incluidas las CSM.

La liberación de factores que estimulan las células troncales *in situ* para iniciar la regeneración de un tejido, más que su cicatrización, es un hecho que empieza a ser conocido y depende de la dosis, falta de factores locales activos e incapacidad para mantener un factor presente el tiempo necesario. Para superar estos problemas han surgido las “matrices activadas génicamente” que captan las células *in vivo*. Si la reconstrucción fue la frontera inicial de la ingeniería tisular, la corrección génica es la siguiente. Las células troncales son el ingrediente crítico en la regeneración tisular, pero también son la diana crítica de cualquier estrategia llamada a corregir un defecto genético.

Otro aspecto relacionado con el nicho es la transmisión de mensajes de las células troncales a los lugares de lesión y posteriormente, su capacidad de reparar tejidos. Para ello son necesarios señales de las células troncales/progenitoras desde el nicho hasta el lugar de la lesión y capacidad de diferenciarse en el tipo de célula requerida. En animales sanos las CSM son capaces de recibir un mensaje en los diferentes tejidos. Es interesante la capacidad de una CSM para mandar un mensaje y está relacionada en parte, con la expresión de Stro-1. Las HSC que son células Stro-1+ son capaces de establecer señales y anclarse en la mayoría de los tejidos estudiados ayudando en su supervivencia.

Se sabe es que las lesiones alteran el patrón de migración y diferenciación de las CSM añadidas exógenamente. Por su parte, las células dañadas son capaces de secretar también señales de diferenciación. También hay que tener en cuenta que las células maduras no siempre inducen diferenciación de CSM a lo largo de su propia línea. El contacto directo con condrocitos induce osteogénesis pero no condrogénesis. Evidentemente, el medio de una CSM es un factor crítico para definir su identidad ^[162].

Las CSM también se han aislado de otros muchos tejidos de origen no mesodérmico como son el cerebro, el bazo, hígado, riñón, pulmón, timo y páncreas de ratón, todas las células mantienen una morfología similar e inmunofenotipo después de muchos pases. No se han identificado CSM en sangre periférica tras tratamientos de quimioterapia o con factores de crecimiento. *Ojeda-Uribe et al* no identificaron CSM en sangre periférica después de quimioterapia o tratamiento con factores de crecimiento ^[163], tampoco *Wexler et al* demostraron CSM en el flujo vascular periférico ^[164]. Ni *Lazarus et al* consiguieron cultivar CSM de sangre periférica en pacientes tratados con quimioterapia ^[165].

Sin embargo, otros autores han tenido más éxito, *Luria et al* demostraron CFFu junto a las células nucleadas en la sangre periférica del cobaya ^[166] y *Huss et al* aislaron células tipo fibroblásticas adherentes CD34- de sangre periférica del perro ^[167]. *Zvaifler et al* por su parte, estimaron que el número de CSM en sangre periférica en el adulto es muy bajo, entre 0,5 – 5 por millón de las células mononucleadas ^[158].

1.7.5 Aislamiento de las CSM

Se disponen de numerosos protocolos para obtener CSM. Los métodos más sencillos incluyen su característica de células adherentes, por lo que fueron descubiertas por *Fridenstein et al.* Se coloca un pequeño trozo de hueso directamente en el interior de un frasco de cultivo o sobre una placa y las células crecen sobre la base de plástico del frasco.

Una modificación de este protocolo incluye la densidad de centrifugación de la médula ósea, que incluye el uso de soluciones de alta densidad con baja viscosidad y baja presión osmótica para conseguir la fracción mononucleada de la médula ósea que contiene CSM. Subsecuentemente, la adherencia al plástico se produce en la población de CSM. El número inicial de CSM puede aumentar hasta un 36% con la recolección y recolocación en un nuevo frasco de la población celular inicial no adherente, que es lavada.

Con cualquier método, el sistema debe procurar la pureza de las CSM sin contaminación con otro tipo de células como son las hematopoyéticas. Para evitarlo, se han propuesto dos técnicas muy similares, la selección magnética y las células las activadas por fluorescencia. La selección magnética utiliza epítopes positivos para CSM, los cuales están marcados con anticuerpos sobre bolitas magnéticas. La aplicación de un campo magnético externo separa las células marcadas positivas de las negativas. La selección de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método alternativo para aislar CSM por el cual una población de células heterogéneas, de sangre, médula ósea, etc., son

caracterizadas y separadas según la intensidad de la fluorescencia que emitan. El citrómetro aislará únicamente aquellas células cuya emisión de luz se encuentra en los parámetros definidos. Más específico es marcar uno o más anticuerpo monoclonales con una tinción fluorescente para que se adhiera a una población específica de células. Las células según sean negativas o positivas para estos anticuerpos, serán incluidas o excluidas de los tubos colectores. Se han utilizado un gran número de anticuerpos con esta técnica según el perfil fenotípico de las CSM.

Una fuente alternativa para obtener CSM de la médula ósea o también de tejidos sólidos, hueso, cartílago o grasa, es hacer un tratamiento con colagenasas, enzimas capaces de romper las uniones peptídicas en la triple hélice de la molécula de colágeno. De esta forma, las células se liberan del tejido y pueden ser recogidas por medio de lavado y centrifugación.

La cantidad de CSM obtenidas por este sistema es muy superior a la centrifugación de la médula ósea. Aunque diferentes autores sugieren que las células obtenidas de uno y otra son idénticas, tanto en el potencial de diferenciación como de las características fenotípicas. *Thomas et al* ^[168] han llegado a la conclusión que las células aisladas por medio enzimático poseen mayor actividad metabólica, nivel de proteínas intracelulares y producción de calcio comparado con las aspiradas.

1.7.6 Expansión y cultivo

La expansión de las CSM puede estar afectada por diferentes factores dependientes del donante o de la técnica empleada. Pero las CSM pueden expandirse de forma considerable en un corto periodo de tiempo, con aumentos de hasta mil veces, en dos o tres semanas. Además, las CSM pueden proliferar unas 19 veces sin perder su propiedad de proliferar y diferenciarse. Sin embargo, la expansión reduce gradualmente el potencial máximo de diferenciación de las CSM. Las células pueden envejecer perdiendo capacidad para crecer, llegando a la apoptosis. La transcripción retroviral con un gen humano de telomerasa, puede extender las células con más de 260 pases sin pérdida de su capacidad para diferenciarse en diferentes líneas. Por otro lado, hay datos que sugieren que los cultivos prolongados pueden adquirir espontáneamente un potencial cancerígeno. El efecto cardioprotector estudiado de las CSM, se reduce después de 5 a 10 pases, posiblemente por la pérdida de potencial de liberación del VEGF. Estos sueros, no están exentos de problemas cuando se aplican en clínica, por el potencial efecto de transmitir enfermedades y crear posibles reacciones inmunológicas.

Otro tema de interés es la forma de cultivar las células. El cultivo monocapa es el más clásico y económico para expandir las CSM. Los cultivos en monocapa crecen en frascos de vidrio o de poliestireno, discos o frascos de cultivo. Los recipientes de plástico se tratan de forma adecuada para obtener una buena adherencia celular a la pared del frasco. El cultivo celular requiere, además, una temperatura de 37° y una atmósfera humidificada con un 95% O₂.

Generalmente el medio de cultivo se cambia cada 2 o 3 días y cuando las células alcanzan la confluencia son tratadas con tripsina y depositadas en dos nuevos frascos.

También se han propuesto diversos sistemas para cultivar CSM tridimensionalmente incluyendo alginato, ácido hialurónico, colágeno, fibrina y quitosan y formar, así, el andamiaje para encapsular y soportar las CSM. Los inconvenientes encontrados con los sistemas 3D es que la proliferación es más lenta y desigual. Los biorreactores reproducen las condiciones ambientales de las células con una menor tensión de cizallamiento, microgravedad, mejor distribución de los nutrientes y eliminación de desechos.

1.7.7 Factores de crecimiento proliferativos

Durante la expansión se pueden aplicar factores de crecimiento para aumentar el tiempo y mejorar el rendimiento de las células. El FGF (*Fibroblast Growth factor*) es un mitógeno que puede emplearse. Aunque también se ha descrito que produce HLA-DR, induce Stro-1 y disminuye la regulación de CD44, así como los niveles de diferenciación. Es posible utilizar otros factores como PDGF-BB, EGF, IGF, TGF- β 1 o bajos niveles de radiación con láser.

El factor inhibidor de leucemia (LIF), los FGFs y el Wnts (*mammalian homologues of Drosophila wingless*), entre otros factores de crecimiento y citocinas, están implicados en el mantenimiento de la “troncalidad” de las CSM.

El FGF2 mantiene el estado troncal de las CSM, prolongando su viabilidad en los cultivos.

1.7.8 Biología de las CSM

Las células estromales de la médula, un tipo de células que muestra una gran plasticidad son, de hecho, células perivasculares, semejante a los pericitos retinales, las células perivasculares del sistema nervioso central. Se ha propuesto que los distritos microvasculares, pueden constituir el nicho específico donde los progenitores multipotenciales son retenidos en los tejidos adultos.

La característica más importante de las CSM obtenidas en el hueso es su capacidad de diferenciarse indiferentes tipos celulares *in vitro*. Las células aisladas del aspirado de médula ósea es lo que conocemos como CFU-F (*fibroblast colony-forming units*) y muestran un potencial de diferenciación hematopoyética. El comportamiento no hematopoyético de la médula ósea, consiste en una población heterogénea de células. Morfológicamente las CSM son células fusiformes cuboides, como fibroblastos, difíciles de distinguir de las otras células obtenidas del aspirado medular.

Para identificar las CSM *in vitro*, los investigadores se aprovechan de dos características de estas células. En primer lugar la capacidad de adherirse al plástico de cultivo. Excepto los monocitos, las células hematopoyéticas no lo hacen y se pierden con el lavado. La segunda característica es que las CSM

son positivas para un número específico de marcadores de superficie y negativos para los marcadores hematopoyéticos.

Las CSM son células estromales no hematopoyéticas que se aíslan inicialmente de la médula ósea aunque también de otros órganos y estructuras del adulto. Tienen una diferenciación multilineal siendo capaces de alcanzar diferentes tipos celulares como son los osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos, tenocitos y posiblemente, también células neurales.

Las CSM, en el organismo adulto, representan reservorios de células reparadoras sin ninguna característica específica para ningún tejido. Las señales que disparan el proceso podrían ser la propia lesión, la inflamación o la necrosis. Se ha visto que estas células migran y colonizan una lesión después de su inyección intravenosa y acuden a la lesión cuando se inyectan en la cavidad articular.

El trasplante de CSM en un sistema abierto, como puede ser el espacio bajo la cápsula renal que genera un osículo quimérico, es una estructura que reproduce la histología y arquitectura del hueso en miniatura y compromete a los tejidos tanto donantes como receptores. Este resultado puede demostrar que las células estromales huésped proveen la estructura mientras que las células donantes llevan la hematopoyesis. También se pueden trasplantar células en cámaras de difusión que evitan la migración de las células hematopoyéticas en los tejidos estromales. En estas condiciones se producen un abanico de tejidos conjuntivos, cartílago, hueso, fibroso, adipocitos, a partir

de las células donantes. Este hecho provocó que los primeros investigadores considerasen que el cartílago, grasa, hueso y otros tejidos conectivos derivan de un ancestro común, la célula estromal.

La morfología celular y los índices de proliferación cambian considerablemente dependiendo de la habilidad para formar estructuras modulares o multicapa. La expresión de diferentes marcadores de los fenotipos osteoblásticos, condrogénicos y adipogénicos no depende sólo de las diferentes deformaciones celulares sino también del tiempo de cultivo. Es más, en los trasplantes algunos CFU-Fs forman hueso y mantienen la hematopoyesis y adipogénesis, otras sólo forman hueso, mientras que otras construyen tejido conectivo únicamente.

Desde que se comenzaron a utilizar marcadores específicos se han podido conocer mejor las verdaderas células troncales estromales, una población heterogénea de células estromales adherentes que no se renuevan indefinidamente o presentan un multipotencial homogéneo. Las CSM supuestamente purificadas reproducen todas las virtudes conocidas y también los vicios de las CFU-F de la médula como un todo, excepto que estas células se obtienen con una eficacia menor que con los protocolos iniciales.

1.7.9 Biología de las CSM *in vitro*

Cada vez se conoce más el proceso que dirige la diferenciación de los CSM en osteoblastos, condrocitos y tejido adiposo. En muchos casos es un sistema

sencillo el que dispara las señales moleculares requeridas para inducir diferentes tipos de tejidos. La secreción de proteínas conocidas como Wnts están implicadas en diferentes programas de diferenciación como la osteogénesis, mientras que la falta de expresión de la telomerasa aumenta la expansión de las CSM *in vitro* y el potencial de diferenciación osteogénica.

La técnica ideal de ingeniería ósea debe obtener un número suficiente de células progenitoras en la toma inicial, costo bajo y tiempo corto de cultivo celular para poder ser implantado por el paciente en el mismo acto quirúrgico. En los aspirados medulares a pesar de obtener una población heterogénea el proceso es doloroso, la fracción total de CSM presente en la médula es baja (0,001-0,01% o, aproximadamente, 1 CSM por 10⁵ células estromales adherentes) y precisan ser cultivadas un tiempo largo *in vitro* antes de disponer de las suficientes células.

Comparadas con las CSM de la médula ósea, las células adiposas son más fáciles de obtener, con anestesia local, sin provocar dolor al paciente, mínima morbilidad y se disponen en gran número, aproximadamente 4 x 10⁷ células/100 cm³ de los aspirados grasos frente a 1 x 10⁵ células/30 cm³ de los aspirados de médula ósea. Disponer de mayor cantidad de CSM en la obtención reduce la cantidad de tejido necesario y reduce o elimina el coste y una larga expansión de las células ^[121].

1.8. Biomateriales en la terapia celular.

Los biomateriales (BM) son esenciales en la terapia celular ya que son componentes básicos para formar una matriz de sostén y juegan un papel importante en la regeneración tisular. Se usan en múltiples terapias celulares como sustitutos de la función mecánica y de la matriz extracelular del tejido que se desea regenerar. Constituyen la estructura tridimensional para alojar las células y los factores biológicos que generarán los nuevos tejidos ^[169,170].

1.8.1. Principios básicos de los BM

El BM ideal para la terapia celular sería el que presentara las propiedades de biodegradación y absorción, pero sin generar una respuesta inflamatoria que interfiera con la función celular y de los tejidos. Los BM incompatibles generan respuesta inflamatoria y una respuesta de cuerpo extraño que conlleva a su expulsión o necrosis. Los BM deben tener una adecuada integridad mecánica para soportar la formación de tejido ^[171]. Estos materiales requieren tres factores en la terapia celular, que son biocompatibilidad, biodegradación, estabilidad estructural y mecánica. Así, permiten la posible localización y permanencia de las “stem cells” en sitios específicos del cuerpo humano, manteniendo la estructura tridimensional, que permite y dirige la formación de nuevos tejidos con su adecuada función. La estabilidad de los BM depende primariamente de su estructura física, elasticidad, absorción y poder de degradación química. Una microestructura porosa de los BM es considerada como requisito esencial ya que las células lo necesitan para poder activar los factores de crecimiento, oxigenación y nutrición, usando cada BM según las

propiedades del nuevo tejido que se piensa generar.

El mecanismo de biodegradación de los polímeros se produce por una pasiva hidrólisis y como resultado se dan metabolitos como ácidos monoméricos. La degradación depende del peso de las moléculas, del grado de cristalización y el volumen del material. Otros factores que influyen en la degradación son de tipo químico, estructural, condiciones de fabricación, sitio de implantación y propiedades físicas entre otras ^[172].

Los BM son utilizados en terapia celular como una matriz extracelular artificial que suplen las funciones biológicas, químicas y físicas de la matriz nativa. La producción y proliferación de la matriz extracelular es crucial en la terapia celular y se sabe que ésta afecta a la diferenciación y función celular ^[173].

1.8.2. Propiedades de los BM

Los BM pueden dividirse dentro de metales, cerámicas, materiales naturales y polímeros sintéticos. Algunas veces, dos tipos de materiales pueden ser combinados para formar una composición, por ejemplo cerámica o materiales naturales con polímeros sintéticos ^[174]. Ambos materiales sintéticos y naturales tienen algunas propiedades adecuadas para la formación de la matriz extracelular ^[175, 176].

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo y ha sido utilizado en muchas aplicaciones de la terapia celular. Contiene dominios de adhesión

celular que sirven para la interacción celular, es biocompatible y presenta mínima respuesta inflamatoria y antigénica degradándose por lisosomas ^[177].

El alginato es otro BM comúnmente usado, está compuesto por polisacáridos es biocompatible y aprobado por la FDA, a diferencia del colágeno no presenta dominios reconocedores y el grado de la estructura mecánica es limitado, presumiblemente se debe a la menor cantidad de iones.

Las queratinas extraídas desde las fibras del cabello humano han llegado a ser un prometedor BM para la terapia celular por cuatro razones ^[178]:

- Gran biocompatibilidad
- Fácil extracción como solución.
- Contiene sitios de reconocimiento molecular donde se integran las células
- Los BM derivados de las queratinas han sido investigados como aplicaciones médicas como fármacos, ingeniería tisular, piel sintética e implantes cocleares.

Las matrices derivadas desde la submucosa intestinal porcina (SIS) y de la vejiga (BSM) han sido usadas en muchas aplicaciones incluidas la formación de tejido de vejiga, fascias, uretra, vasos, cartílagos y huesos ^[174]. Estos materiales han mostrado ser biocompatibles y poseen habilidad para inducir la proliferación celular. Los polímeros sintéticos son atractivos por sus características de degradación y su consistencia en la producción. Por el contrario, sus productos de degradación causan efectos adversos o alteran el microambiente local.

Los BM más usados en terapia celular son el PGA, PLA y copolímeros. Estos productos están ganando popularidad por su consistencia de fabricación, adecuadas propiedades mecánicas y biodegradación. Estos materiales se están usando en suturas y en fármacos. El poliuretano es uno de los polímeros más usados como BM en biomedicina por su durabilidad, elasticidad, resistencia, compliance y tolerancia ^[179].

1.8.3. Tecnología en la fabricación de los BM

Los BM usados para la terapia celular requieren diferentes configuraciones, dependiendo del resultado que se desea para generar cada tipo tisular. El principal objetivo de la terapia celular es reparar y reemplazar el daño tisular y restituir su función. El sistema de inyección celular ha sufrido muchos avances, es un proceso simple y no producen lesión tisular con su aplicación pero su uso es limitado donde no se puede inyectar. Para inyectar los BM se hacen de forma líquida, gel o de hidrogeles. Para adecuar la función tisular del huésped a la de los BM, se utiliza la biotecnología que modifica la superficie de estos materiales tanto química como físicamente aumentando así su biocompatibilidad. Los procedimientos químicos como la oxidación, hidrólisis y queratinización, cambian la superficie química y modifica la función de los BM ^[180,181].

La adición de moléculas bioactivas como enzimas, proteínas, secuencias peptídicas y antibióticos añaden funciones a los materiales. Modificar la superficie de los BM consigue aumentar la especificidad de afinidad y el control de la motilidad. Moléculas bioactivas como citocinas y factores de crecimiento

son potentes reguladores de la función biológica como es la migración, proliferación y diferenciación celular. Incorporar estas moléculas dentro de los BM es otro de los avances de la terapia celular ^[182].

El BM ideal sería un sinérgico entre un componente con propiedades mecánicas y el otro con compatibilidad biológica y fisiológica. Por ejemplo los BM naturales poseen microestructuras que contienen química y estructuralmente completamente definidos. Combinar este material con otro sintético ofrecerá tanto las ventajas de uno como las del otro. Los BM pretenden simular la matriz extracelular, por eso es muy importante conocer la estructura primaria de la matriz extracelular nativa del disco.

1.8.4. Biomateriales para la terapia celular

Varios materiales han sido usados para la aplicación de la terapia celular en el campo de la traumatología en forma de inyección o implantes. Una de las recientes aplicaciones de la terapia celular ha sido usando células del cartílago suspendidas en alginato cálcico para el tratamiento del reflujo e incontinencia vesicoureteral ^[183]. Otra aplicación de las células derivadas del cartílago es para reparar el cartílago articular dañado. Esta aplicación requiere células capaces de diferenciarse en cartílago que se consigue con la aplicación de factores bioquímicos y una estructura tridimensional porosa, que es aportada por los BM capaces de generar un medio para el crecimiento de los condrocitos y la formación de la nueva matriz extracelular ^[184].

HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

¿Existen células madre en el núcleo pulposos de discos intervertebrales cervicales degenerados, comparables a las de la médula ósea?, al igual que ocurre con las de la región lumbar.

El segmento lumbar está sometido a carga y poca movilidad, el segmento cervical mucha movilidad y poca carga. ¿La diferente biomecánica implica una diferente degeneración discal, pudiendo influir en la caracterización y potencial de diferenciación de las CSM de NP cervical respecto a lumbar?.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS:

Para responder a la hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos.

3.1 General: Identificar en pacientes con patología cervical la presencia de CSM en núcleo pulposo de discos intervertebrales cervicales degenerados.

3.2 Específicos:

1. Aislar células con características de CSM a partir de muestras de NP cervical
2. Tipificar estas células mesenquimales halladas
3. Valorar y definir su capacidad de diferenciación
4. Compararlas con las presentes en médula ósea de los mismos pacientes
5. Comparar los resultados con los obtenidos para la región lumbar en otros estudios.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño

Se realizó el estudio en un grupo de 14 pacientes sometidos a cirugía vertebral por patología degenerativa (discopatía), obteniendo previo consentimiento informado el material extraído del disco cervical que normalmente se desecha, así como 5-10 ml de aspirado de la MO de la cresta iliaca. Las muestras se procesaron según procedimientos estándar establecidos para la obtención de MSC, como nuestro grupo ha publicado previamente ^[22]. El material discal fue disociado mecánica, enzimáticamente y posteriormente cultivado en medio estándar DMEM, con 10% de suero bovino fetal y al mismo tiempo se obtuvieron a partir del aspirado, células mononucleadas de la MO tras centrifugación en gradiente de densidad y posterior cultivo con el mismo medio antes mencionado. Se evaluó la capacidad proliferativa *in vitro* de las MSC de ambos orígenes. Tras tres pases en cultivo las MSC obtenidas de ambas fuentes fueron procesadas para su análisis morfológico e inmunofenotípico y se comprobó la capacidad de diferenciación multilineal (adipocito, osteoblasto) en ambos casos (Figura 41).

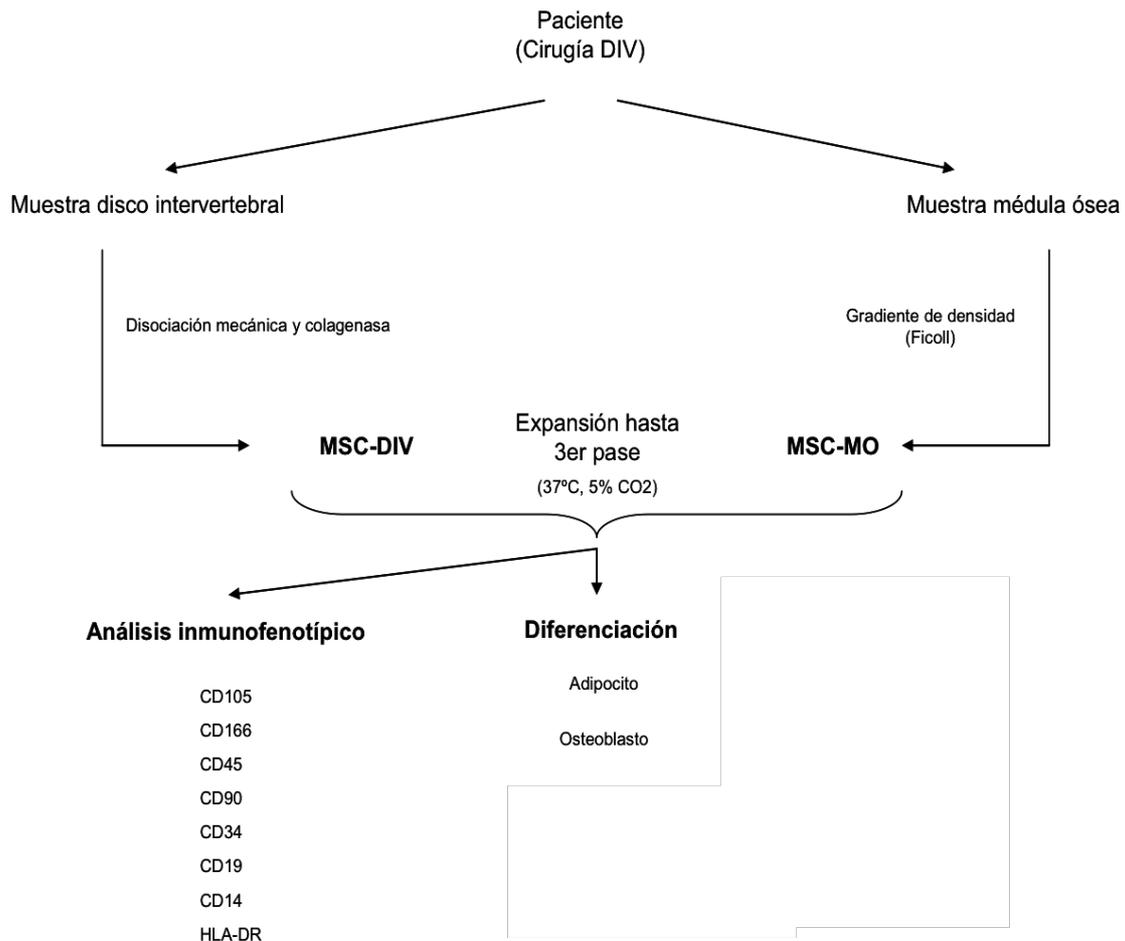


Figura 41. Diseño del estudio

4.2 Sujetos de estudio

Los pacientes incluidos en el estudio tenían edades comprendidas entre los 40 y los 70 años. Todos ellos precisaron una cirugía cervical por presentar una mielopatía o radiculopatía, con degeneración discal cervical. El procedimiento quirúrgico y el seguimiento se realizaron en el Hospital Universitario Fundación de Alcorcón. El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de Terapia Celular del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. A todos los pacientes se les realizó una artrodesis cervical intersomática por vía

anterior, utilizando autoinjerto. Se recogieron datos biodemográficos y clínico-radiológicos como edad, sexo, indicación quirúrgica, nivel fusionado cervical y el grado de afectación discal según la escala de Griffith ^[185] (Figura 42).



Figura 42. Discopatía degenerativa

Se excluyeron pacientes con cirugía previa cervical, donantes de MO, que hubieran recibido quimio o radioterapia, padecido leucemia, discrasia sanguínea, patología traumática aguda cervical, fractura pélvica, procesos tumorales activos, corticoterapia o alcoholismo. Todos los procedimientos, se hicieron bajo aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Fundación Alcorcón y de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2000.

La media de edad fue de 48 años (rango, 34-74) y la proporción mujer/hombre fue 8/6. Once pacientes (79%) intervenidos por radiculopatía (RP) y tres pacientes (21%) fueron intervenidos por mielopatía (MP). Los niveles de fusión fueron, seis C5-C6 (43%), cinco C5-C6-C7 (36%), dos C4-C5-C6-C7(14%) y uno C4-C5-C6 (7%). Respecto al grado de discopatía radiológica ^[185], del disco extraído, siete fueron de grado 5, tres de grado 4 y cuatro de grado 3 (Tabla 1).

Paciente	Edad	Sexo	Diagnóstico	Nivel Iqx.	RM
1	74	XX	MP	C4-C6	5
2	42	XX	RP	C5-C6	5
3	60	XY	MP	C4-C7	5
4	37	XY	RP	C5-C7	3
5	50	XX	RP	C5-C7	5
6	43	XY	RP	C5-C7	3
7	50	XX	RP	C5-C7	5
8	51	XY	RP	C5-C7	4
9	34	XX	RP	C5-C6	3
10	49	XY	RP	C5-C6	5
11	40	XY	RP	C5-C6	3
12	51	XX	MP	C4-C7	5
13	45	XX	RP	C5-C6	4
14	47	XX	RP	C5-C6	4

Tabla 1. Datos recogidos de los pacientes intervenidos

MP: Mielopatía.

RP: Radiculopatía.

Nivel Iqx: Nivel quirúrgico.

RM: Resonancia magnética.

4.3 Desarrollo técnico

Se realizó una primera muestra con cultivo para comprobar técnica adecuada: realizamos la muestra para validar la técnica, completando el procedimiento de forma íntegra, programación, coordinación, cirugía, transporte y procesado de la muestra con cultivo y crecimiento celular. Verificado, el resultado positivo de crecimiento celular con la primera muestra, procedimos a realizar todas las siguientes.

1- Técnica quirúrgica:

Coordinados con el servicio de hematología y el transporte, se programan los pacientes, para realizar un procedimiento por día quirúrgico. Todas las cirugías se realizaron por el mismo equipo quirúrgico de raquis (Figura 43), con el paciente en decúbito supino, bajo anestesia general y control de radioscopia, realizándose discectomía con artrodesis reglada, vía anterior con autoinjerto.



Figura 43. Intervención quirúrgica

Material y métodos

Se extrajeron 5-10 ml de médula ósea mediante un trócar de forma percutánea de la cresta ilíaca, 1/3 posterior de forma unilateral y se repartieron en dos tubos por paciente heparinizados. Se extrajo un único disco por paciente conservado en un bote con medio RPMI (medio Roswell Park Memorial Institute) añadido (Figura 44). Todo debidamente identificado, conservado en nevera 4-8° hasta la llegada al laboratorio, entre 12-24 horas tras la cirugía, donde fueron procesadas como se resume más adelante.



Figura 44. Material de extracción, conservación de tejido y punción cresta iliaca

2- Transporte de muestras:

Cada día de cirugía, las muestras son transportadas desde el quirófano al laboratorio, manteniendo la temperatura óptima y con la correcta identificación de las muestras mediante números, cumpliendo la ley de protección de datos.

4.4 Obtención de células mesenquimales

4.4.1. Aislamiento de CSM en NP:

La muestra del núcleo pulposo se disoció mecánicamente en la campana de flujo laminar y posteriormente digerida en presencia de una solución con 0,02% de colagenasa, durante 1 hora en agitación a 37°C, con 5% de CO₂. Posteriormente, las células obtenidas fueron incubadas en condiciones habituales para la expansión de CSM, en medio DMEM con 10% de suero bovino fetal y en las mismas condiciones de incubación. El medio fue renovado 2 veces por semana y cuando la confluencia de la placa de cultivo superó el 75% de la superficie, tras tripsinización, las células fueron subcultivadas a una densidad de 5×10^3 células/cm².

Aislamiento y expansión

Las CMN se plantaron a una concentración de 106 CMN/cm² en una placa de cultivo que contenía DMEM con 10% de suero bovino fetal (SBF; Bio Whittaker, Bélgica) y 1 % de penicilina-estreptomicina y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. El medio se recambió 2 veces por semana. Tras alcanzar las células adherentes una confluencia mayor del 80% de la superficie de la placa de cultivo, se procedió a subcultivar nuevamente las células a una menor concentración en nuevas placas de cultivo. Este procedimiento se denomina "pase". Para realizar el pase del cultivo, se retiró el medio de expansión, se lavó con PBS y posteriormente se añadió la tripsina (Gibco BRL,

Paisley, Reino Unido) dejándola actuar de 6 a 8 minutos en el incubador a 37°C. A continuación se añadió medio con DMEM y 10% de SBF para neutralizar la acción tóxica de la tripsina, se recogió la suspensión celular obtenida y se centrifugó durante 10 minutos a 1200 rpm, decantándose el sobrenadante y procediendo a contar las células resultantes, para proceder a replantar, esta vez (y también en pases sucesivos) a una concentración de 2.5×10^3 células/cm². En todos los casos, las CSM se expandieron hasta el tercer pase antes de proceder a los estudios inmunofenotípicos y de diferenciación multilineal. En este momento la pureza del cultivo de CSM supera el 98%, pues las células hematopoyéticas residuales se han ido retirando con los sucesivos recambios del medio de expansión.

4.4.2 Aislamiento de CSM en MO:

Con respecto a las células procedentes del aspirado de cresta ilíaca, se procesaron de acuerdo con el procedimiento estándar. Tras centrifugación en gradiente de densidad, las células mononucleadas fueron expandidas (inicialmente a 10^6 /cm²) en el mismo medio y en las mismas condiciones de las especificadas para las obtenidas de núcleo pulposo, hasta alcanzar en ambos casos el tercer pase en cultivo.

Separación de las células mononucleadas

Tras aspirar la MO, se procedió a la separación de las células mononucleadas (CMN) mediante centrifugación en gradiente de densidad (Figura 45).

Para ello se diluyó la muestra en medio Hanks (Gibco, Invitrogen) hasta tener un volumen de 12 ml y se homogeneizó. Esta dilución se añadió a dos tubos a los que previamente se había añadido 4 ml de Ficoll-Hypaque (Biochrom KG, Berlín, Alemania) y se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos. Tras recuperar las CMN de la interfase se realizaron dos lavados con Hanks (10 minutos a 1200 rpm) y se resuspendió el botón celular en 1 ml de DMEM (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido), procediéndose al recuento celular en una cámara de Neubauer.

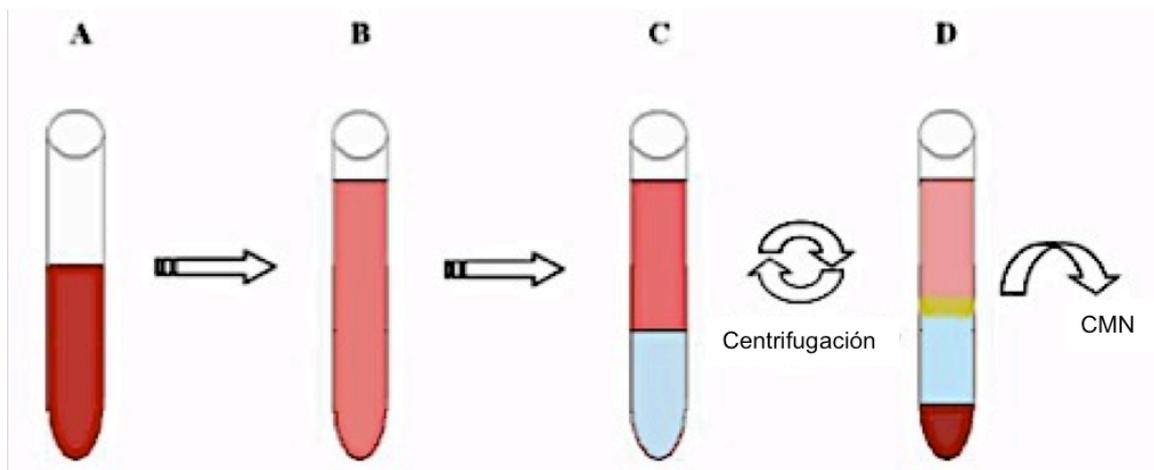


Figura 45. Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad.
A) Muestra MO.
B) Dilución de la muestra con Hanks.
C) Muestra diluida sobre Ficoll.
D) Interfase en la que están presentes las CMN.

Posteriormente y de nuevo, las células obtenidas fueron incubadas en condiciones habituales para la expansión de CSM en medio DMEM con 10% de suero bovino fetal y en las mismas condiciones de incubación. El medio fue renovado 2 veces por semana y cuando la confluencia de la placa de cultivo superó el 75% de la superficie, tras tripsinización, las células fueron

subcultivadas a una densidad de 5×10^3 células/cm². Durante la expansión *in vitro* hasta el tercer pase, se evaluaron las características morfológicas de las células. Tras alcanzar el tercer pase se procedió al análisis inmunofenotípico y diferenciación.

4.4.3 Inmunofenotipo por citometría de flujo:

Las CSM obtenidas de ambas localizaciones fueron incubadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD90, CD14, CD73, CD106, CD166, HLA-DR, CD45, CD34 CD19 y CD105. Las muestras fueron procesadas tal y como se ha descrito previamente ^[150]. Posteriormente, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur analizadas con el programa Infinicyt (Cytognos).

Tras el tercer pase para la caracterización inmunofenotípica en el citómetro de flujo de las muestras obtenidas, los cultivos se tripsinizaron y se resuspendieron en PBS, para el posterior marcaje con los anticuerpos monoclonales conjugados con los siguientes fluorocromos (Tabla 2) de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina-cianina-5(PCy5) y clorofil peridina (PerCP) o alofocianina (APC) según las siguientes combinaciones:

CD90-FITC / CD73-PE / CD45-PCy5 / CD34-APC

CD105-FITC / CD166-PE / HLAOR-PerCP / CD19-APC

CD14-FITC / CD106-PE / CD45-PCy5

Control isotípico

Todos los anticuerpos monoclonales empleados se obtuvieron de BOB (San José, Estados Unidos), salvo el C0105-FITC, que se adquirió a InmunoStep (Salamanca, España). Tras incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad, se retiró el exceso de anticuerpo mediante lavado con PBS. El botón obtenido fue resuspendido en 0.5 ml de PBS, y la muestra fue adquirida en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) que emite a una longitud de onda de 488 nm, adecuadamente calibrado y compensado específicamente para el estudio de las CSM.

	FLUOROCROMO	CLON	ISOTIPO	CANTIDAD /10 ⁶
CD14	FITC	M5E2	Mouse IgG _{2b} , K	10 IJL
CD90	FITC	5E10	Mouse IgG ₁ , K	2IJL
CD105	FITC	2H6F11	Mouse IgG ₁ ,	10 IJL
CD73	PE	AD2	Mouse IgG ₁ , K	10 IJL
CD106	PE	51-10C9	Mouse IgG ₁ , K	10 IJL
CD166	PE	3A6	Mouse IgG ₁ , K	10 IJL
CD45	PE-Cy5	HI30	Mouse IgG ₁ , K	10 IJL
HLA-DR	PerCP Cy5.5	L243	Mouse IgG ₂₃ , K	10 IJL
CD19	APC	HIB19	Mouse IgG ₁ , K	3IJL
CD34	APC	581	Mouse IgG ₁ , K	3 IJL

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio del inmunofenotipo de las células mesenquimales

Se adquirieron al menos 10^5 células por cada muestra. La adquisición se realizó utilizando el programa CellQuest y el análisis de expresión de los marcadores, así como los canales medios de fluorescencia fueron analizados y cuantificados con el programa Paint-a-Gate Pro, ambos de Becton Dickinson Biosciences: BDB). Para cada antígeno se calculó el cociente entre de la intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés "Mean Fluorescence Intensity") para ese antígeno y la intensidad del control isotópico correspondiente.

4.4.4 Diferenciación multilinaje de CSM

Para la diferenciación a adipocito y osteoblasto, de cada muestra se sembraron cuatro placas de cultivo de $9,6 \text{ cm}^2$ de superficie del tipo "chamber slide", a razón de 5×10^3 células/ cm^2 , incubándose hasta obtener una confluencia del 80%. De estas placas dos se usaron para la diferenciación adipocito y dos para la de osteocito.

En el caso de la diferenciación a osteocito, se incubaron con medio de diferenciación <<NH Osteodiff Medium>>, cambiando el medio cada 3-4 días. Transcurridos 10 días se retiró la parte superior de la "chamber slide" dejando únicamente el porta inferior con las CSM adheridas, se lavaron con PBS y se fijaron las preparaciones con una solución de etanol frío al 10% durante 10 minutos; tras lavarlas con PBS se incubaron durante 20-30 minutos con 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato nitro azul de tetrazolio (BCIP-NBT, Sigma-Aldrich) en agitación. Para mejorar la visualización se contrastaron con 1 ml de

hematoxilina durante 2 minutos. Así se comprobó la diferenciación osteogénica mediante tinción con fosfatasa alcalina.

Para la diferenciación a adipocito las muestras se incubaron en el mismo tipo de placas, pero con medio de diferenciación <<NH Adipodiff Medium>>, en las mismas condiciones (37°C y 5% CO₂) durante 21 días. Para la tinción con oil-red de los portas se retiró el medio de diferenciación y se fijaron las muestras con formaldehído al 3.7% durante 2 minutos. Después se añadió 1 ml de solución de oil-red (Merck, Darmstadt, Alemania) previamente filtrado por un filtro de 0.22 micras y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta. Así se comprobó la diferenciación mediante tinción de rojo al aceite (Oil-Red), como se ha publicado previamente ^[22].

En ambos casos, una chamber slide con medio de expansión (DMEM con el 10% de suero bovino fetal descrito anteriormente) y sin medio de diferenciación específico se mantuvo en las mismas condiciones a modo de control de la diferenciación a adipocito y osteocito. Todas las muestras se lavaron y prepararon para su visualización en el microscopio óptico. En este caso utilizamos un microscopio Olympus BX41 utilizando el programa Micro DP70 controller and manager software pack.

4.4.5 Recogida y análisis de datos

La recogida de los datos fue a partir los cultivos valorando presencia celular. Se identificaron las células mediante inmunofenotipo por citometría de flujo,

analizando marcadores celulares para CSM. Se analizaron la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica de las células obtenidas.

4.4.6 Análisis del as variables

Aislamiento CSM en NP:

Durante la expansión *in vitro* hasta el tercer pase, se cuantificó el tiempo hasta alcanzar la confluencia y el número de células obtenidas durante el mismo, además de evaluar las características morfológicas de las células durante la expansión. Tras alcanzar el tercer pase, se procedió al análisis inmunofenotípico y al estudio de diferenciación.

Aislamiento de CSM en MO:

Durante la expansión *in vitro* hasta el tercer pase, se cuantificó el tiempo hasta alcanzar la confluencia y el número de células obtenidas durante el mismo, además de evaluar las características morfológicas de las células durante la expansión. Tras alcanzar el tercer pase, se procedió igualmente al análisis inmunofenotípico y al estudio de diferenciación.

Se evaluaron las capacidades proliferativas *in vitro* de las CSM de ambos orígenes. Tras 3 pases en cultivo las CSM obtenidas de ambas fuentes fueron procesadas para su análisis morfológico e inmunofenotípico.

Inmunofenotipo por citometría de flujo

El análisis de expresión de los marcadores, así como los canales medios de fluorescencia fueron analizados y cuantificados con el programa PAINT-A-GATE, todos ellos de Becton-Dickinson.

Diferenciación multilineal de CSM

Se analizó su capacidad de diferenciación y se comprobará la capacidad de diferenciación multilineal (adipocito, osteoblasto) en ambos casos.

Para el análisis de las preparaciones, éstos se incuban con anticuerpos monoclonales de ratón anti-colágeno humano tipo II seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con Cy2 (Jackson ImmunoResearch Europe. Ud., Suffolk, Reino Unido), procediendo a su lectura en un microscopio de fluorescencia Olympus Provi,s equipado con epifluorescencia y los filtros correspondientes. Las imágenes se tomaron con una cámara digital Olympus adaptada al ordenador utilizando como soporte informático el programa DP Controller.

Análisis Estadístico

Se utilizó la versión 15.0 del SPSS (Chicago IL) para el análisis estadístico. Para cada variable, mediana, rango o media se calcularan \pm dos desviaciones estándar. Para explorar las diferencias de cualquier variable entre CSM de

disco intervertebral y CSM de médula ósea utilizaremos la prueba no paramétrica U-Mann-Whitney. Además para encontrar diferencias en cualquier variable entre las CSM del mismo individuo, pero de ambas muestras, se utilizará el Wilcoxon *signed-rank test*. Las diferencias encontradas serán significativas para una $P < 0.05$.

4.4.7 Fases del proyecto

El proyecto se ha desarrollado en tres fases:

Primera fase:

Se seleccionaron los pacientes que cumplían los criterios de inclusión y dieron su consentimiento, hasta llegar al número deseado de muestras, recogiendo los datos clínico-radiológicos de los pacientes, clasificando la degeneración discal, programando la cirugía y su ulterior realización. En el acto quirúrgico, se extrajo el disco intervertebral degenerativo y 5-10 ml de MO necesarios para la comparación de células mesenquimales.

Segunda fase:

Incluyó conservación y transporte de muestras, con el consiguiente procesado a cargo del laboratorio de Terapia Celular del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, que recibieron las muestras y mediante un proceso mecánico y enzimático complejo, aislaron las células mesenquimales que posteriormente se cultivaron, estudiando la capacidad de diferenciación de las mismas.

Tercera fase:

En los que se incluye, el análisis estadístico de resultados, creación de tablas e imágenes, comparación de resultados, presentando nuestras conclusiones.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Procesamiento

Las 14 muestras pareadas de tejido, procedente del disco intervertebral y de aspirado medular del mismo sujeto de las que se han obtenido células mesenquimales de ambas fuentes, se procesaron en la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca. En cuatro casos, probablemente por la escasa cantidad de la muestra obtenida o por un problema en el establecimiento del cultivo primario, no se dispone de las muestras pareadas de ambas fuentes. En todos los casos restantes las células MSC de disco intervertebral y las de médula ósea se aislaron y expandieron adecuadamente hasta el tercer pase.

5.2 Cultivo

En todos los casos se aislaron y expandieron MSC, tanto de DIV como de MO. En el caso de CSM-NP, se observó una capa de células mononucleares (CMN) adheridas después de dos días del cultivo celular inicial. El tiempo para llegar a la confluencia en cada pase fue similar en ambos grupos.

En cuanto a la morfología, las células de DIV y MO exhiben la característica forma de huso en el cultivo, aunque las primeras eran ligeramente más pequeñas. A continuación, se muestra una imagen (Figura 46) del cultivo inicial de las células procedente del disco intervertebral cervical donde se aprecia

que las células mesenquimales comienzan a identificarse con su morfología característica, en base a su capacidad de adherencia al plástico.

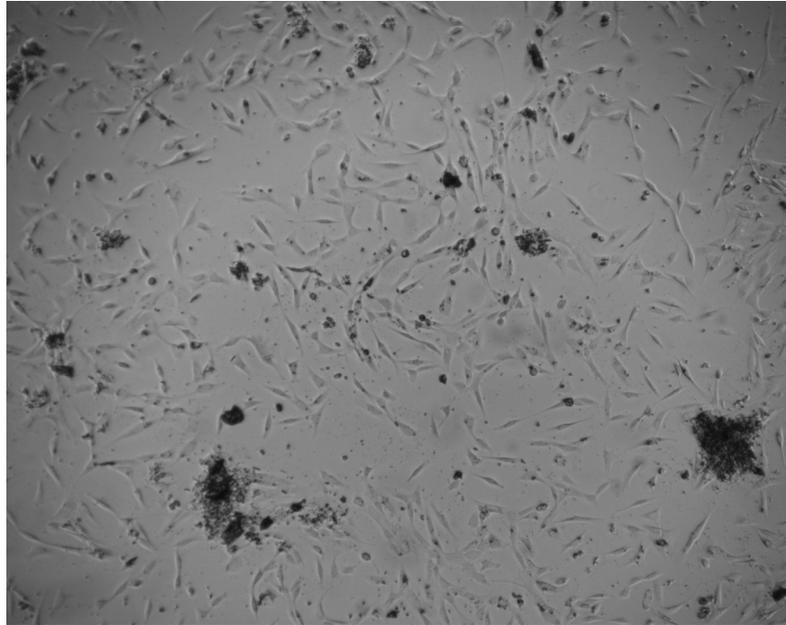


Figura 46: Morfología de las CSM del disco cervical en fase inicial

5.3 Diferenciación multilineal

Se han realizado los estudios de diferenciación multilineal de las células mesenquimales de ambas fuentes, hacia osteoblasto y adipocito. En todos los casos se ha obtenido la diferenciación hacia ambos tipos celulares, si bien la diferenciación adipocítica de las células procedentes del disco es mucho menor que las procedentes de la médula ósea, un dato previo que ya observó nuestro grupo con células procedentes de núcleos pulposos lumbares ^[22].

A continuación se muestra una imagen de la diferenciación adipocítica de células procedentes de disco intervertebral y médula ósea, de uno de los pacientes donde se aprecia esta diferencia (Figura 47). No hemos encontrado estas diferencias en la diferenciación osteogénica.

Tinción Oil-Red-O

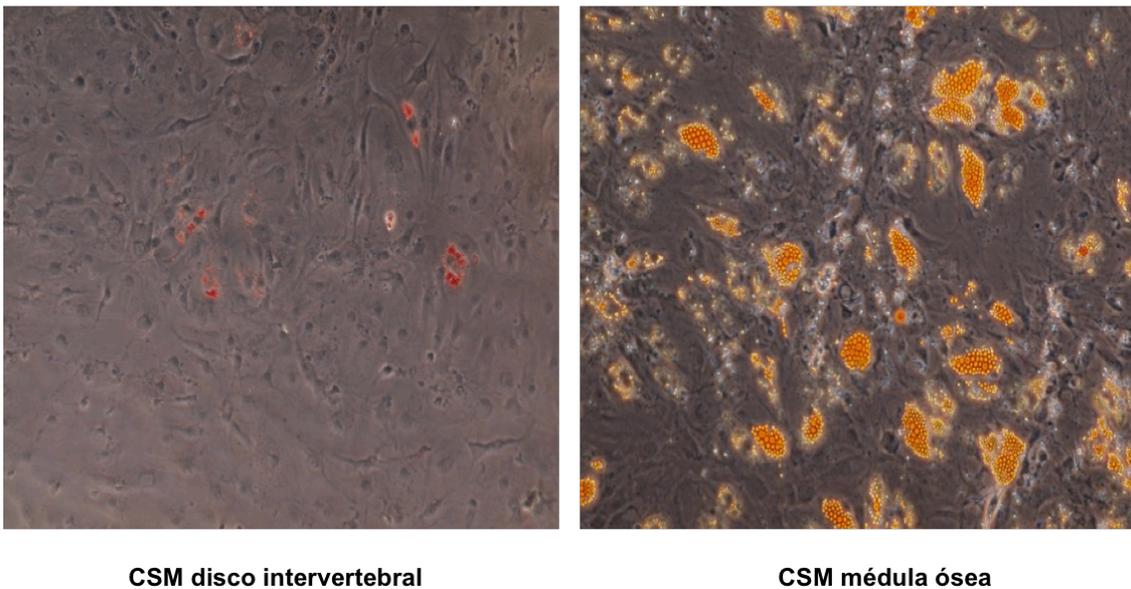


Figura 47: Diferenciación adipocítica de células procedentes de disco intervertebral y médula ósea

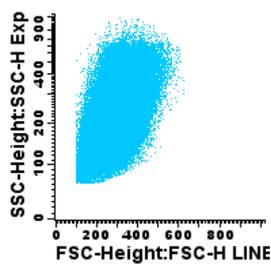
5.4 El estudio inmunofenotípico

Tampoco se han demostrado diferencias en los marcadores inmunofenotípicos, como se puede observar en las siguientes figuras (Figura 48, Figura 49). Las células de ambos orígenes poseen los marcadores inmunofenotípicos característicos de las células mesenquimales, de acuerdo con los criterios de la International Society for Cellular Therapy ^[17]. El marcador de células NP madura CD24 ^[23] fue negativo en todos los casos.

Resultados

Las CSM-NP fueron positivas para CD90, CD73, CD105 y CD166, con positividad para CD106 tenue, mientras que fueron negativos para el marcador panhematopoyético CD45, el marcador de células madre hematopoyéticas CD34, el antígeno monocitario CD14, el marcador de células B CD19 y el antígeno HLA-DR, que es el mismo patrón fenotípico que se muestra en las CSM-MO .

10770 Paciente 1 NP



Viabilidad: 81%

Población	Media
MSC	
FSC-Height:FSC-H	304.16439
SSC-Height:SSC-H	251.97659
FL1-Height:FL1-H	3.99078
FL2-Height:FL2-H	3.24386
FL3-Height:FL3-H	3.60720
FL4-Height:FL4-H	13.12443
CD34 FITC:FL1-H	2.82267
CD73 PE:FL2-H	54.98730
CD45 PerCP-Cy5.5:FL3-H	4.98197
CD106 FITC:FL1-H	2.58751
CD14 PE:FL2-H	2.47001
CD19 PerCP-Cy5.5:FL3-H	3.49001
CD105 APC:FL4-H	19.59647
CD90 FITC:FL1-H	164.57088
CD166 PE:FL2-H	6.33533
Anti-HLA-DR PerCP:FL...	3.30979
7AAD:FL3-H	3.72173

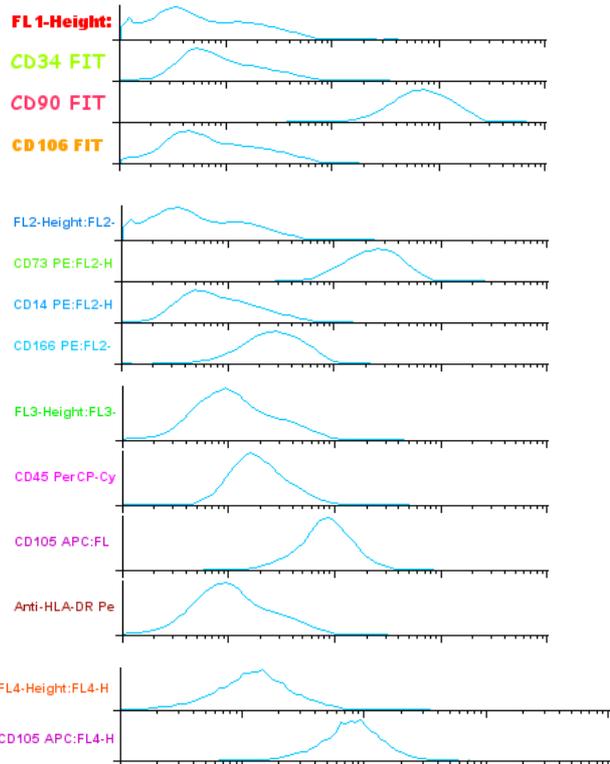
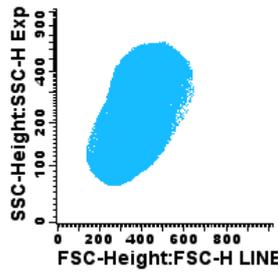


Figura 48. Marcadores inmunofenotípicos de CSM en NP de DIV.



10771 Paciente 1
MO

Viabilidad: 86%

Población	Media
MSC	
FSC-Height:FSC-H	377.29897
SSC-Height:SSC-H	249.03213
FL1-Height:FL1-H	1.41706
FL2-Height:FL2-H	1.23500
FL3-Height:FL3-H	1.35984
FL4-Height:FL4-H	8.90691
CD34 FITC:FL1-H	0.83850
CD73 PE:FL2-H	18.79887
CD45 PerCP-Cy5.5:FL3-H	1.74869
CD105 APC:FL4-H	16.71015
CD108 FITC:FL1-H	0.93895
CD14 PE:FL2-H	0.77543
CD19 PerCP-Cy5.5:FL3-H	1.28488
CD90 FITC:FL1-H	63.98405
CD166 PE:FL2-H	4.63536
Anti-HLA-DR PerCP:FL...	1.51663
7AAD:FL3-H	2.12646

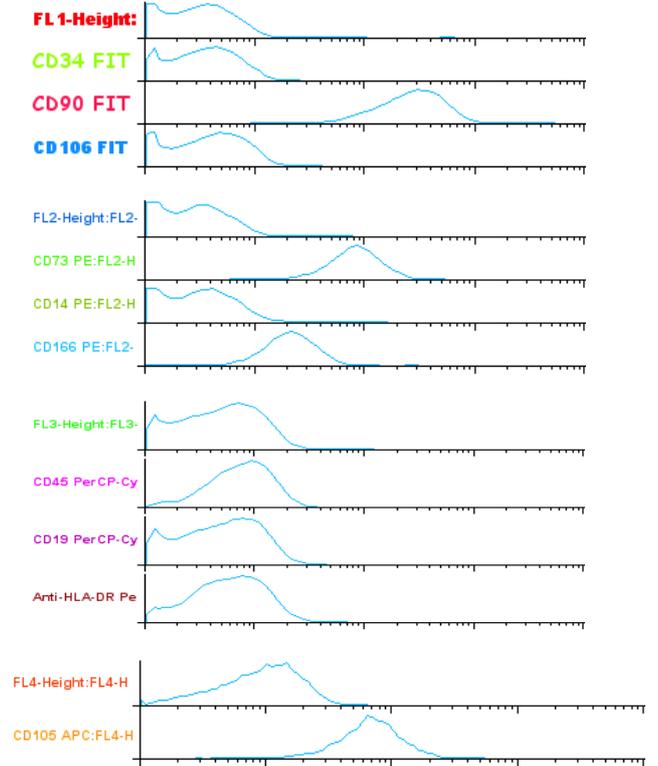


Figura 49. Marcadores inmunofenotípicos de CSM en MO.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Los problemas degenerativos del raquis y en especial la discopatía degenerativa tiene una gran importancia en la sociedad actual, es causa de dolor y discapacidad, siendo una de las causas más frecuentes de consulta médica y de incapacidad laboral. Esto se traduce en empeoramiento de la calidad de vida y en un alto coste sociosanitario. Tanto la espondilosis, estenosis y la discopatía evolucionan de forma paralela.

La discopatía degenerativa, presenta un origen multifactorial y pasamos de conceptos como la deshidratación y pérdida de altura, que no explicaban en profundidad la fisiopatología de la degeneración discal, a tratar de comprender los mecanismos celulares, moleculares, etc., que subyacen al proceso degenerativo, que nos harán avanzar para entender y tratar este problema de salud tan importante.

Hemos estudiado la carga, falta de ejercicio, el tabaco, traumatismos, la edad, los genes como factores de riesgo y actuamos, hasta ahora, sobre los factores modificables realizando prevención y tratamiento.

Datos de un estudio realizado en Estados Unidos, aporta que la mayoría de los adultos experimentarán dolor lumbar durante su vidas ^[186]. Con base a los datos de la Encuesta Nacional de Atención Médica Ambulatoria, en este estudio, se estimó que hubo 42,4 millones de visitas al médico de atención primaria por dolor de espalda entre 2003 y 2.004 ^[187]. Por suerte, se estima que

el 80-90% de gente con experiencia de dolor lumbar, este se resuelve en las 6 primeras semanas y sólo del 5-10% desarrollan dolor crónico ^[186]. En alrededor del 85% de los pacientes no se encuentra la causa de este dolor de espalda ^[188].

Es obvio, que no todos los cambios degenerativos que se pueden detectar con las técnicas de diagnóstico por imagen son sintomáticos o necesitan tratamiento. Pero por esta misma razón, es imprescindible tratar de profundizar en los procesos fisiopatológicos que subyacen en el proceso degenerativo y que pueden quizás explicar esa variabilidad. Y no sólo en cuanto a los síntomas sino también en cuanto a la respuesta al tratamiento.

6.1 Terapia celular

Las “stem cells” o células troncales deben presentar diferenciación hacia línea condral, ósea y adiposa, para actuar mejor en la regeneración ^[189] y esto fue descrito por *Ashton y Johnstone* ^[124,129]. Este tipo de células pueden obtenerse de fuentes embriológicas o de donantes adultos, actualmente las más utilizadas son las adultas ya que desde un punto de vista biológico son mucho más estables que las embrionarias y además no entrañan problemas éticos. De los donantes adultos podemos conseguir “stem cells” de tejido mesenquimales, como del tejido adiposo, médula ósea, sinovial, periostio, entre otros, presentando mejor capacidad de diferenciación condrogénica, las procedentes de sinovial y médula ósea ^[190].

Una alternativa actual son las denominadas células IPS (del inglés: Induced Pluripotent Stem cells) descritas por un traumatólogo Japonés, el *Dr. Yamanaka* ^[191], que mereció el Premio Nobel en el año 2012. Estas células son de origen adulto pero son reprogramadas hasta un estadio “embrionario”, de esta manera tendría las características de estabilidad de las células adultas y la potencialidad de las más indiferenciadas.

Las ventajas reparadoras de las “stem Cells” con respecto a las células diferenciadas se puede ver en muchos escenarios, así la capacidad de diferenciación y proliferación de los condrocitos se ve mermada con la edad, por disminución de las telomerasas, lo que explica porque el ACI en edades adultas, genera resultados muy pobres, que han sido mejoradas con el uso de las CSM ^[192].

Muchas técnicas para la obtención de estas células han sido descritas, siendo la más sencilla y económica la punción aspiración de la médula ósea de la cresta iliaca, también se ha visto que las “stem cells” procedentes de esta vía no pierden capacidad de diferenciación, se obtienen fácilmente, pueden diferenciarse en múltiples linajes y expandirse rápidamente ^[193,194].

Cada fuente tisular para las CSM tienen propiedades diferentes, por tanto para cada tipo de medicina regenerativa se debe usar la fuente de obtención más apropiada, como la empleada en la regeneración osteocondral procedente de la médula ósea, cuyas células pueden diferenciarse tanto en condrocitos como osteocitos ^[195,196],

En el caso de la terapia celular aplicada al disco intervertebral, en la mayoría de los estudios las células proceden de otros tejidos tales como la médula ósea, el tejido adiposo y sinovial ^[197-199].

Si bien lo más llamativo es la terapia celular o la denominada ingeniería de tejidos, es necesario hacer una reflexión previa seguida de un proceso de investigación que justifique el empleo de esas terapias. Por este motivo los estudios encaminados como el presente trabajo a identificar, describir y caracterizar las poblaciones de progenitores celulares, en este caso del disco intervertebral deben de ser la base sobre la que se asiente la terapia en si. En este sentido estamos asistiendo a como cada vez se le reconoce más importancia a la capacidad inmunoreguladora de esas células “stem” sin dejar de lado su potencial de diferenciación ^[200,201].

Pero ha sido la investigación sobre el comportamiento de esas células, sus características, etc., lo que ha permitido su empleo en patología como la Enfermedad del Injerto Contra el Huesped (ICH) o la mejora del rendimiento del trasplante hemtopoyético ^[202-205].

Para nuestro estudio, que pretende confirmar los hallazgos previos obtenidos en el segmento lumbar, ahora en el cervical y que se corresponde con uno de esos intentos de conocer los mecanismos en los que están implicadas los progenitores celulares, hemos realizado un típico examen comparativo al igual que se realiza en otros ámbitos de la ciencia. Para ello, hemos comparado dos tipos de CSM, las procedentes del DIV como objeto de estudio y las

procedentes de la MO de pacientes intervenidos de cirugía raquídea. Esta fuente de obtención, una de las más empleadas ^[193,194], nos parece fácil y resulta abundante ya que al año en España se practican más de 20.000 cirugías de estas características.

Las CSM fueron aisladas, cultivadas y expandidas de forma sencilla, comprobándose también el grado de diferenciación en estirpe adiposa y ósea así como sus características fenotípicas mediante citometría de flujo.

El segundo elemento fundamental en la ingeniería tisular son las sustancias estimulantes, diferenciadoras y microambientales que logran que las células prediferenciadas, se diferencien completamente, proliferen y generen las propiedades necesarias para lograr una matriz, lo más parecida a la nativa y duradera ^[195]. Los primeros factores usados fueron el TGF- β y la desametaxona, usadas por *Johnstone (1998)* ^[129] para inducir la condrogénesis y así lograr mejorar el microambiente tisular y mantener el fenotipo celular ^[206]. Se ha visto que las CSM por sí mismas pueden regenerar el tejido, pero con la asociación de factores los resultados mejoran ^[207]. Otras moléculas investigadas son las proteínas morfogenéticas (BMP), que incrementan la condrogénesis, aumentando los proteoglicanos, acentuándose más con el subtipo 2 que con el 4 y el 6 ^[206]. Otras moléculas estudiadas son el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), que es un mediador anabólico y mitótico del cartílago, que estimula la formación de cartílago y hueso. También el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que estimula las células mesodérmicas

especialmente los fibroblastos y finalmente el factor de crecimiento fibroblástico bFGF, que potencia la mitosis de los condrocitos ^[208].

Ehlicke et al encontraron que el TGF- β 3, factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, también poseían la capacidad de inducir la diferenciación de CSM-MO humana en células de NP ^[209].

Por el contrario, en algún estudio se aprecia que se puede lograr una satisfactoria regeneración sin incorporar este tipo de factores, siendo suficiente para la reparación la estimulación que ejerce el microambiente local de la lesión sobre el biomaterial o las células administradas ^[210].

En los últimos años se ha sugerido que hay células madre o progenitoras que residen en el DIV por varios motivos. En primer lugar, siendo el disco generalmente avascular y aneural, vemos como aparece el tejido fibrocartilaginoso ^[211], la calcificación ^[212], la hipertrofia de nervios y vasos ^[213,214] a menudo en el disco degenerado, sospechándose que estos tejidos patológicos, podrían tener su origen en CSM residentes o células progenitoras.

En segundo lugar, durante el proceso de degeneración, la formación de agrupaciones de células ha sido evidente dentro del NP. Este hallazgo también indica la existencia de una población de células progenitoras de replicación en el DIV ^[215].

Otro argumento a favor lo encontramos tras la aplicación de células cultivadas de disco autólogas, comprobando su beneficio en la regeneración del disco degenerado ^[216], este efecto puede estar relacionado con la estimulación de las células progenitoras residentes en el disco, ayudando a la regeneración y mantenimiento de la función discal ^[197].

En nuestro trabajo se ha podido demostrar que las células con características CSM se pueden aislar de los DIV. De hecho, cumplen todos los requisitos ISCT para la definición de CSM: la adherencia *in vitro* a las superficies de plástico, la morfología característica y el perfil inmunofenotípico, así como la capacidad de diferenciación multilineal, en linajes osteogénico y adipogénico ^[22]. Sin embargo, no se observó a penas la diferenciación en células adipogénicas, lo que se discutirá más adelante.

Además, hemos comparado la morfología, el potencial de expansión, el perfil inmunofenotípico y la capacidad de diferenciación con el CSM obtenidas en condiciones estándar a partir de la MO de los mismos sujetos, que es el control ideal evitando las variaciones interindividuales que pueden limitar la interpretación de algunos resultados.

Risbud et al ^[24] en un artículo reciente describe el aislamiento celular, desde disco degenerado cervical DIV (tanto del AF y del NP) que contenía una población heterogénea de CSM que fueron positivas para CD105, CD166, CD63, CD49a, CD90, CD73, CD133 y negativas para CD34. Ellos aíslan tales células de disco intervertebral moderadamente degenerado, lo que sugiere la idea de que la regeneración endógena, puede ser promovida por la

estimulación de estos progenitores. Además, estas células progenitoras que se aíslan comparten la mayoría de las características con las CSM-MO ^[22].

Recientemente, se han hallado “stem cells” a partir del platillo vertebral cartilaginoso degenerativo, aunque comparten fenotipo y morfología similar con CSM-MO, estas células poseen mayor capacidad de diferenciación osteogénica y condrogénica ^[217].

Nuestros resultados confirman que es posible aislar y expandir las células CSM en una población de pacientes con degeneración discal moderada o severa. Teniendo en cuenta que el NP es uno de los mayores tejidos avasculares del cuerpo, y teniendo en cuenta que en un reciente y provocativo comentario de *Caplan* ^[218], donde se ha especulado, que todos CSM podría ser pericitos en origen, sería difícil explicar su aislamiento en muestras de NP. Este, es de hecho, un tema de debate actual en el campo, pero los hechos son que tanto en nuestro trabajo y también en el artículo de *Risbud y Blanco*, las células que cumplen criterios de definición de CSM son *in vitro* obtenidas de muestras de NP de pacientes ^[22,24].

El hecho de que las células aisladas en DIV degenerado tengan mermada su capacidad de diferenciación adipocítica es argumentado por algunos autores para poner en duda que sean CSM verdaderas, en tal caso, también debería ser identificada la presencia de estas células en un disco sano, a la espera de estudios que así lo demuestren ya que hasta ahora la evidencia es insuficiente. Mientras tanto, en la frontera del AF con la zona de ligamento se han detectado células que expresan marcadores de células madre ^[219], y recientemente hay

estudios sobre las células del AF obtenidos de DIV no degenerado de pacientes adolescentes con escoliosis idiopática que podrían diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, condrocitos, neuronas, y células endoteliales *in vitro* y expresar varios fenotipos similares a los de CSM ^[220].

Si demostramos que las CSM son células que residen en el disco normal o degenerado, se va a proporcionar una herramienta importante para la regeneración del disco intervertebral.

Al comparar las CSM del NP (CSM-NP) con las obtenidas a partir de la MO de los mismos sujetos (CSM-MO), ambos tipos de células tienen la morfología característica y el patrón inmunofenotípico característico, con ligeras diferencias. CSM-NP expresan con una menor intensidad algunas moléculas de adhesión (CD105, CD106, CD166) lo que puede estar relacionado con su ubicación específica. Otros marcadores inmunofenotípicos, como CD146 que se ha relacionado con CSM ^[221], no se incluyeron en nuestro estudio ya que es específica de auto-renovación de CSM y en la actualidad no se considera en el panel de la ISCT, fenotípico recomendado ^[17].

Sin embargo, su evaluación en CSM obtenida de NP sería de interés en los trabajos futuros. En cuanto a la capacidad de diferenciación, es de gran interés el hecho de que en la mayoría de nuestros pacientes muy pocas CSM-NP fueron capaces de adquirir vesículas lipídicas rojo al aceite después de cultivo en medio adipogénico.

Este hecho no se ha descrito previamente y está en desacuerdo con resultados de *Risbud*. Aunque CSM-NP en ambos documentos compartieron los mismos marcadores inmunofenotípicos, ligeras diferencias en el método de diferenciación o la fuente de NP, junto con el hecho de que en nuestros discos de trabajo se encontraban en un estado de degeneración más avanzada, puede dar cuenta de esta alteración en la diferenciación adipogénica.

En estos estados de degeneración discal, la vía de regulación adipogénica Wnt puede actuar como un importante regulador e inhibir la diferenciación de MSC a adipocitos ^[222]. La activación de la señalización de la vía Wnt, inhibe la adipogénesis parda de células cultivadas, al impedir la inducción de los factores de transcripción PPAR y C/EBP ^[223].

Se ha identificado un mediador en esta vía, el Wnt10b como un potente inhibidor de la adipogénesis, que debe ser suprimido *in vitro* para poder diferenciar adipocitos ^[224,225]. Así mismo el análisis molecular ha demostrado que el tratamiento con ATP, modula la expresión de varios genes que regulan (es decir, relacionadas con los genes de la vía Wnt) la diferenciación osteoblástica y adipogénica de las MSC ^[226].

O bien que la limitación de la diferenciación adipogénica se deba a otros motivos. A este respecto, debe señalarse que en contraposición a la MO no hay adipocitos en el medio normal de NP.

También se está investigando la influencia de la estimulación de la osteogénesis que parece suprimir la adipogénesis y viceversa ^[227].

En enfermedades que afectan al raquis como la espondilitis anquilopoyética (EA), la vía de señalización de Wnt involucrada en la morfogénesis ósea y la homeostasis, presenta perturbaciones en la regulación que han sido implicadas en la formación ósea anormal (por ejemplo, osteofitos). Los niveles de proteínas reguladoras en la vía Wnt, como la proteína Dickkopf, se investigan como potenciales biomarcadores de la enfermedad. Esta vía podría estar involucrada en otros aspectos de esta enfermedad, incluyendo la activación de células T, su diferenciación y en la adipogénesis de la médula ósea ^[228].

Los DIV se desarrollan tanto desde el mesénquima embrionario y la notocorda, aunque el origen de las células NP adultos todavía no está claro. Es bien sabido que las interacciones entre las células madre y su nicho circundante, incluyendo la matriz extracelular, son esenciales para modular no sólo morfología y fenotipo sino también su función ^[229], lo cual se ha demostrado recientemente para el NP ^[230].

En la última década las células madre exógenas, especialmente las CSM-MO se han utilizado para la regeneración del DIV con resultados prometedores, incluso se ha avanzado en su aplicación clínica, sin embargo la primera cuestión a resolver es si las CSM-MO pueden sobrevivir en ese microambiente inhóspito y mantenerse activas en la proliferación, la diferenciación, la

producción de prostaglandinas (PGs), para contribuir a la mejora definitiva de la biomecánica y la cinemática de los segmentos espinales.

El ambiente único del DIV podría desempeñar un papel importante. La biología y la implicación clínica de este hallazgo requiere más análisis, tal vez a nivel genómico. En este sentido, varios estudios en la bibliografía ^[231,232] han comparado el perfil de expresión génica de las células aisladas a partir de células diferenciadas de NP a partir de MO y estándar CSM de médula ósea mostrando alguna diferencia. Sin embargo, la metodología y el diseño experimental de estas obras es de hecho diferente a la empleada en el presente trabajo, lo que dificulta cualquier posible comparación de sus resultados.

La terapia con CSM-MO en la degeneración discal, requiere no sólo la supervivencia de estas células, sino también su capacidad para funcionar normalmente en un medio duro, microambiente de hipoxia, baja nutrición, pH ácido, alta carga mecánica, alta osmolaridad y una complicada conexión de proteasas y citocinas ^[233,234].

In vitro, la hipoxia y la privación de suero, han recibido un incremento en el reconocimiento simulando isquemia o baja nutrición, viendo como se inducía la apoptosis en trasplantados con CSM-MO en sólo 24 horas ^[235]. Una exposición más larga, (120 horas) a la hipoxia y la privación de suero da como resultado la muerte celular completa ^[236].

Más allá de la tensión de oxígeno y suero, la glucosa es otra fuente de energía que afecta notablemente la proliferación, apoptosis y la diferenciación, así como la senescencia replicativa de las CSM-MO [233,237].

Sin embargo, las CSM-MO humanas son resistentes a corto plazo (24 ó 48 horas) a la exposición de la glucosa alta sin cambios en su producción de factores de crecimiento y capacidad proliferativa [238,239]. Están aún por desentrañar estos mecanismos subyacentes de la resistencia a la glucosa alta de estas células CSM-MO.

La tensión de oxígeno, suero y la concentración de glucosa son fáciles de controlar y mantener para imitar el microambiente de un disco degenerativo *in vitro*, el mayor obstáculo para las CSM-MO es la acidez de la matriz que va desde un pH de 6.8 hasta 6.2 en el DIV degenerado [240], mientras que en un disco normal se sitúa entre 7.0 y 7.2 [241]. Esto está causado, principalmente por el aumento de la producción de ácido láctico a partir de glucosa transformada por citocinas para mantener el nivel de ATP en el DIV [242,243].

La carga mecánica es un componente natural del DIV y varias publicaciones han demostrado que la carga mecánica estimula de la diferenciación condrogénica de CSM. El efecto de la carga mecánica sobre las actividades biosintéticas de los condrocitos, ha sido ampliamente estudiada en cultivo tridimensionales, especialmente en la formación de la matriz cartilaginosa [244,245]. Del mismo modo, se ha encontrado que la presión hidrostática cíclica incrementa el depósito de MEC en los cultivo de CSM-MO [246].

En conejos, la carga cíclica de compresión mejora la condrogénesis de CSM-MO en agarosa, al promover la producción de TGF- β 1 y la expresión de algunos genes sensibles, involucrados en la diferenciación condrogénica [247,248], observando resultados similares en humanos [249-251].

Es difícil hacer una evaluación cuantitativa con respecto a la elección del parámetro óptimo de carga para la diferenciación condrogénica de CSM-MO, pero estos estudios destacan que la carga mecánica adecuada beneficia la condrogénesis de CSM-MO.

El DIV es un sistema osmótico como cualquier otro tejido cartilaginoso de carga, pero la osmolaridad extracelular no es constante y varía directamente como resultado de la carga en el disco, transporte de iones y la hidratación del tejido [252]. Los cambios osmóticos son un componente vital del DIV y todas las células residentes tienen que adaptarse, alterando la expresión génica y el volumen celular [253,254].

Los medios hiperosmóticos (450 mOsm / kg H₂O) modifican la expresión de genes en las células del disco en la región central del NP, relacionado con la remodelación del citoesqueleto, estabilización, transporte de osmolitos [253] y finalmente regulación del volumen celular [254]. Sin embargo, poca bibliografía ilustra la influencia de la osmolaridad en las CSM-MO. Tras cultivar en una osmolaridad alta (485 mOsm) durante 2 semanas CSM-MO de rata, la proliferación y la viabilidad se inhiben [233]. Pero, curiosamente, cuando la

osmolaridad se redujo desde 370 hasta 250 mOsm, en las CSM-MO no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular a las 24 horas ^[255].

A nivel molecular, un número de proteasas endógenas y citocinas, durante el proceso de la degeneración crean un microambiente complicado también para las CSM trasplantadas. La interacción entre metaloproteasas (MMP) y inhibidor de tejido de metaloproteasas (TIMP) es biológicamente crucial para la remodelación de tejidos ^[256], incluyendo la morfogénesis, la proliferación celular, la apoptosis ^[257], así como la patogénesis de enfermedades ^[258].

Y se asocian también con la gravedad de la degeneración discal ^[259]. Aunque se ha planteado la hipótesis de que el equilibrio entre MMP y TIMP juega un papel esencial en la diferenciación de CSM ^[260], hay pocas evidencias directas.

Durante la formación del esqueleto, las MMP participan en la formación y remodelación ósea y promueven la condrogénesis, se ha hipotetizado además que las MMP pueden regular la diferenciación condrogénica de las CSM-MO ^[261]. Pero hay una escasez de información al respecto, por lo tanto en la actualidad, no se entiende completamente cómo el equilibrio MMP / TIMP modula el destino de las CSM, especialmente la diferenciación condrogénica.

La molécula proinflamatoria de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), se implica en la patogénesis de diversas enfermedades humanas, incluyendo la degeneración discal y se ha confirmado su expresión en las células NP y AF de DIV degenerado ^[262,263], pudiendo afectar además el TNF- α , a la

diferenciación a adipocitos ^[264], así como la adipogénesis de CSM-MO pero sin tener efecto sobre la viabilidad celular ^[265].

Aparte de los efectos de las MMP y TNF en las CSM-MO, las interleucinas y otras citocinas también regulan el comportamiento de estas células en el DIV. La interleuquina 6 (IL-6) regula la pluripotencialidad y la función paracrina de las CSM-MO, se ha demostrado que la IL-6 mantiene la proliferación y el estado indiferenciado por un mecanismo dependiente de ERK1 / 2 ^[266, 267].

Como vemos, la red molecular es complicada en el disco degenerado, los efectos sinérgicos y antagónicos sobre las CSM-MO requieren por lo tanto de una mayor investigación. Además, las células residentes de NP juegan un papel interactivo en la regulación del comportamiento de las exógenas CSM-MO siendo el propósito principal de la terapia, reparar, mantener y mejorar la función de un tipo de célula particular del disco, a largo plazo.

Otro tema de preocupación, es que las CSM de NP son incapaces de controlar el proceso de degeneración DIV en el ámbito clínico, ya sea porque están presentes en números bajos en el DIV o porque puede haber sido alteradas primaria o secundariamente.

En este sentido, se puede barajar la hipótesis de que la senescencia puede desempeñar un papel, en esta capacidad deficiente de CSM-NP en la reparación del disco en degeneración. Sin embargo, no observamos ningún signo de senectud durante el proceso de expansión CSM-NP, aunque no

ampliamos las células durante más de 3 pases en cultivo. Ampliar las células más será por lo tanto de interés para evaluar esta cuestión.

La biomecánica del disco depende de su composición y la organización de su matriz, por lo tanto cualquier desorganización en su estructura afectará a su capacidad biomecánica. Las CSM de NP, pese a que la hipoxia estimula la su proliferación ^[146,268] y el disco degenera por ambiente hipóxico, son incapaces de controlar el proceso de degeneración del DIV a nivel clínico.

Desde MO se puede obtener fácilmente en gran número de células de los mismos pacientes y como hemos visto, son bastante similares a los precursores residentes del NP, por tanto podría ser una fuente alternativa para la terapia celular de la degeneración DIV.

Muchos estudios han demostrado la posibilidad de diferenciar CSM en NP en contacto con células de núcleo pulposo. En el trabajo de *Richardson et al* se mostraron aumento en los niveles de expresión de genes que codifican SOX9, agregano, colágeno I, colágeno II, y el colágeno VI en CSM-MO después de 7 días de un contacto célula-célula, con células de NP ^[269,270]. Además, el contacto directo célula-célula con CSM-MO autólogas aumenta la proliferación, la síntesis de ADN y de las PGs en las células de NP ^[271].

Se ha observado la transferencia de membrana bidireccional entre células CSM-MO y NP durante el cultivo, lo cual puede proporcionar un nuevo mecanismo para la interacción de estas dos células ^[272].

Estos resultados sugieren que la señalización paracrina y la interacción entre estas dos células, beneficia tanto las actividades biológicas de las células NP como la capacidad de diferenciación de las CSM-MO [273].

Todas estas evidencias sugieren que el sistema de co-cultivo es una poderosa herramienta para la regeneración del DIV, no sólo para diferenciar las células injertadas en las células del NP, sino también para generar una nueva matriz extracelular y ya se sugiere su uso clínico para la regeneración discal a partir de CSM de médula ósea [274], incluso es posible que las células mesenquimales de grasa se diferencien en células de NP en contacto con CSM-NP [275]. Por tanto, la utilidad de las CSM de otras fuentes, especialmente derivadas de tejido adiposo, también se debe tener en cuenta en futuros trabajos.

Como resumen, todos los datos actuales indican que sólo las células de NP, hipoxia adecuada, baja concentración de glucosa, la carga mecánica, así como algunos tipos específicos de proteinasas y citocinas podrían ser beneficiosos para las CSM-MO en el microambiente específico del DIV (Figura 50).

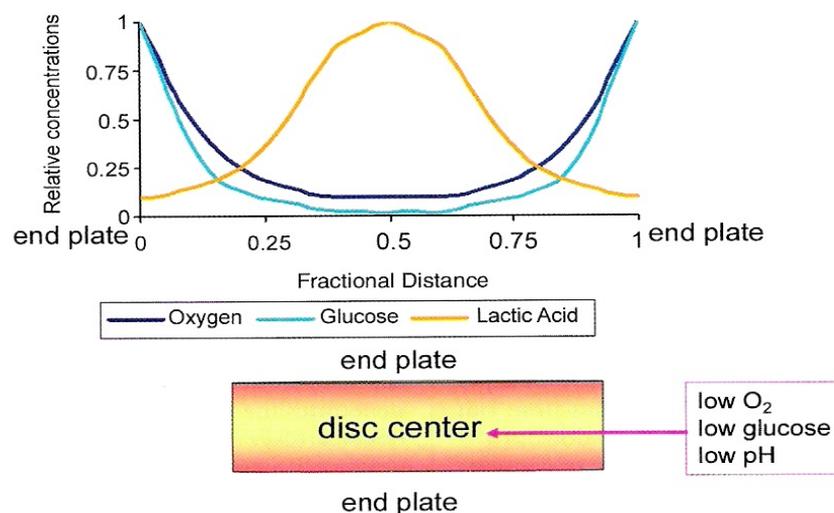


Figura 50. Microambiente discal

Se ha evidenciado que las CSM-MO mejoran la producción de MEC y pueden diferenciarse en células discales, siendo viables en el DIV durante más de 6 meses ^[197,276,277]. La tasa de supervivencia de CSM-MO después de un trasplante en el disco degenerado no ha sido plenamente dilucidada, sabemos que una gran proporción de CSM-MO pueden morir o sufrir apoptosis después del trasplante.

Los estudios *in vitro* con CSM-MO se han centrado principalmente en su supervivencia en el microambiente de DIV, la diferenciación hacia células discales, las propiedades terapéuticas y su aplicación clínica ^[278]. La inyección de CSM-MO o combinada con biomaterial específico en DIV degenerativo, probablemente mejora la MEC y la altura del disco ^[276, 279,280], así como la preservación de la estructura anular ^[281,282]. Es importante destacar como se ha visto en un estudio reciente, que un injerto autólogo CSM-MO puede regenerar el NP, mantener la perfusión y la permeabilidad del platillo vertebral y el hueso subcondral ^[283].

No podemos demostrar en nuestro trabajo que la diferente biomecánica, tan influyente sobre los cambio celulares, moleculares y la expresión genética, suponga una diferencia de potencial de diferenciación en CSM de NP cervical respecto a lumbar ^[25,26].

Las causas de esta degeneración discal, son aun desconocidas si bien existen factores de riesgo como la edad, ambiente mecánico o químico y genética. Desgraciadamente las opciones terapéuticas actuales, no invasivas o invasivas, se limitan únicamente a eliminar los síntomas, descomprimir

espacios, restablecer o modificar biomecánica. Las nuevas líneas de tratamiento de ingeniería tisular están encaminadas a utilizar factores de crecimiento, células y medios de soporte. Precisamos además, el análisis en disco sano, para tener una referencia con la que comparar todos los estudios y análisis, que existen hasta el momento en la bibliografía. Habiendo alejado, un poco más, el tópico que se conforma con explicar el problema principal del disco degenerativo, como una banal deshidratación.

Finalmente, los hallazgos de este trabajo sugieren que es potencialmente posible tratar la degeneración del disco intervertebral por terapia celular (CSM de MO) y/o estimulación de las CSM endógena de NP. Sin embargo se precisa un modelo estructural que controle esta reparación cualitativa, cuantitativa y espacialmente, facilitando el contacto íntimo de estos factores regeneradores con el entorno inmediato discal para que las características sean lo más similares al componente celular local.

Es indudable que las terapias biológicas se harán cargo de muchas de las terapias actuales en el campo de la cirugía ortopédica. Los precursores son los factores de crecimiento y aplicación de las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) que en ensayos clínicos, han demostrado una excelente ventaja en la consecución de la fusión ósea con cirugías de fusión espinal, en comparación con el injerto de hueso autólogo. Recientemente, sin embargo, han aparecido estudios sobre efectos secundarios graves causados por el uso de las BMP con la cirugía de columna ^[284].

Estos incluyen reacciones inflamatorias, radiculitis, la eyaculación retrógrada, retención urinaria, la resorción ósea y el desplazamiento secundario de los implantes. Este hecho nos advierte del uso incontrolado y subestimado de los tratamientos biológicos.

La viabilidad en el uso clínico de las células madre ha sido históricamente investigado en Hematología / Oncología y se ha extendido a diferentes especialidades. Aunque estudios en animales y ensayos clínicos recientes han utilizado células madre en el tratamiento de la degeneración discal, es necesaria una cuidadosa atención en su aplicación. Un estudio experimental por *Vadala et al* ha advertido, utilizando el modelo de conejo, que la fuga de células después de la inyección de CSM al DIV puede causar formación de osteofitos ^[285].

La diferenciación no deseada y la génesis tumoral es otro riesgo potencial con el que la terapia con células madre se enfrenta, necesitando rigurosos y cuidadosos estudio de investigación para la aplicación del trasplante de células madre en tejidos seres humanos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

7.1 General

Con respecto a la presencia de CSM en NP:

Podemos afirmar que el NP de los discos intervertebrales cervicales degenerados contiene células troncales mesenquimales. Estas células halladas cumplen con todas las características exigidas para considerarlas como células madre mesenquimales, atendiendo a las directrices de la Sociedad Internacional de Terapia Celular.

7.2 Específicas

1. Con respecto a la posibilidad de aislar CSM:

Queda demostrada la posibilidad de aislar células troncales mesenquimales en NP de disco intervertebral.

2. Con respecto a la tipificación de estas CSM:

Queda demostrado que estas células halladas cumplen los criterios de células troncales mesenquimales.

3. Con respecto a la capacidad de diferenciación de estas células:

Queda demostrada la capacidad de diferenciación multilineal hacia osteoblasto y adipocito de estas células halladas en el NP.

4. Con respecto a la comparación de estas células con las presentes en médula ósea de los mismos pacientes:

Queda demostrado que estas células son bastante similares a las células mesenquimales de MO, con la excepción de su capacidad de diferenciación adipogénica, claramente mermada.

5. Con respecto a la diferencia entre segmento cervical y lumbar :

No podemos demostrar diferencias. Los hallazgos descritos sobre las CSM de discos cervicales degenerados coinciden con los hallazgos descritos previamente para la misma población celular en discos lumbares degenerados.

No podemos demostrar que la diferencia biomecánica, que influye sobre los cambios celulares, moleculares y la expresión genética celular, afecte a las características celulares de las poblaciones de CSM halladas en región cervical y lumbar.

Estos hallazgos sugieren que es potencialmente posible tratar la degeneración del disco intervertebral mediante la terapia celular, bien sea mediante la infusión de CSM directamente (autólogas o no) o bien estimulando las CSM endógenas del NP. Si bien es cierto, que la población de CSM residente en los discos degenerados presenta alteraciones funcionales de diferenciación, como la descrita previamente.

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

1- Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: part I. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 15–25.

2-Hootman JM, Helmick CG. Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations. *Arthritis Rheum* 2006; 54:226–29.

3- Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis. *Exp Cell Res* 1999;246:129–37.

4- Kim KW, Lim TH, Kim JG, Jeong ST, Masuda K An HS. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs. *Spine* 2003;28:982–90.

5- Chun HJ, Kim YS, Kim BK et al. Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit Model of traumatic degeneration of lumbar discs. *World neurosurgery* 2012; 78: 364-71.

6- Sobajima SG, Shimer A, Kim JS, Gilberston LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *The spine journal* 2008; 8: 888-96.

7- Leung VY, Chan D, Cheung KM. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J* 2006;15 suppl 3:S406 –13.

8- Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 1995;56 Suppl 1:S17.

9- Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R, Reilly TM, Jones AR, Woodbury RA 2nd. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. *Clin Orthop Relat Res* 1992 Feb;(275):287-99.

10- Krampera M, Marconi S, Pasini A et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 2007 Feb;40(2):382-90.

11- Bieback K. Fatty tissue: not all bad? Optimally cultured adipose tissue-derived stromal cells improve experimentally-induced ischemia. *Stem Cells Dev* 2009;18: 531-32.

12- Lee JY, Qu-Petersen Z, Cao B et al. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 2000; 150: 1085-1100.

- 13- Toma J G, Akhavan M, Fernades KJ et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 778-84.
- 14- Nakahara H, Goldberg V M, Caplan A I. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Ortho Res* 1991; 9: 465-76.
- 15- Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K et al. Establishment of tendon-derived cells lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 2003, 287, 289-300.
- 16- Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146 (+) perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 2008; 36: 642-54.
- 17- 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;8:315-17.
- 18- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-47.
- 19- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997;64:295-312.
- 20- Marie PJ, Fromigue O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2006;1:539-48.
- 21- Brooke G, Cook M, Blair C et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin.Cell Dev Biol* 2007;18:846-58.
- 22- Blanco JF, Sanchez-Guijo FM, Muntión S et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects. *Spine* 2010;35(26):2259-65.
- 23- Fujita N, Miyamoto T, Imai J et al. CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338:1890–96.
- 24- Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT et al. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc. *Spine* 2007;32:2537–44.
- 25-Andrew JL, Walsh J. Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading *Journal of Biomechanics* 2004;37:329–37.

- 26- Sasaki N, Henriksson HB, Runesson E et al. Physical Exercise Affects Cell Proliferation in Lumbar Intervertebral Disc Regions in Rats. *Spine* 2012; 37(17):1440-47.
- 27- Makarand V, Risbud IM, Shapiro AR, Vaccaro TJ. Stem cell regeneration of the nucleus pulposus Original Research Article. *The Spine Journal* 2004; 4(6), Supplement: S348-S353
- 28- Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 36: 1179-83.
- 29- Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5(5): 362-69.
- 30- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair and skeletal regeneration. *J Cell Biochem*,1994;56: 283-94.
- 31- Waikitani S, Goto T, Pineda SJ et al. Mesenchymal cell-based repair of large full-thickness defects of articular cartilage and underlying bone. *J. Bone Joint Surg.*, 1994;76: 579-92.
- 32- Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone and Joint Surg* 1998;80: 1745-57.
- 33- Waikitani S, Saito T, Caplan AI et al. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle nerve* 1995;18: 1417-26.
- 34- Young RG, Butler DL, Weber W, Gordon SL, Fink DJ, Caplan AI. The use of mesenchymal stem cells in achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16: 406-13.
- 35- Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science. *Spine* 2002; 27(23): 2631–44.
- 36- Virgin W. Experimental investigations into physical properties of intervertebral disc. *J Bone Joint Surg* 1951; 33B:607.
- 37- Hirsch C. The reaction of intervertebral disc to compression forces. *J Bone Surg* 1955; 37:1188.
- 38- Markolf KL, Morris JM. The structural components of the intervertebral disc. *J Bone Joint Surg* 1974; 56:675.
- 39- Farfan HF. Torsion and compression. In: mechanical disorders of the low back. Philadelphia, Lea & Febiger 1973:82.

- 40- Kazarian LE.. Creep Characteristics of the human spinal column. *Orthop. Clinics North America* 1975; 6(1):3-18.
- 41- Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC. Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus *The Anatomical Record* 1982
- 42- Boos N, Rieder R, Schade V, Spratt KF, Semmer N, Aebi M. The diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging, work place perception, and psychosocial factors in identifying symptomatic disc herniations. *Spine* 1995; 20(24): 2613-25.
- 43- Modic MT, Steinberg PM, Ross JS et al. Degenerative disk disease: asesment of changes in vertebral body marrow with MR imaging. *Radiology* 1988;166:193–99.
- 44- Rahme R, Moussa R. The Modic Vertebral Endplate and Marrow Changes: Pathologic Significance and Relation to Low Back Pain and Segmental Instability of the Lumbar Spine. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008;29:838-42.
- 45- Giuliano V, Giuliano C, Pinto F, Scaglione M. The use of flexion and extension MR in the evaluation of cervical spine trauma: initial experience in 100 trauma patients compared with 100 normal subjects. *Emerg Radiol.* 2002 Nov;9(5):249-53.
- 46- Lord S, Barnsley L, Wallis BJ, Bogduk N. Chronic Cervical Zygapophysial Joint Pain After Whiplash: A Placebo-Controlled Prevalence Study. *Spine* 1996; 21(15): 1737-44.
- 47- Horst M, Brinckmann P. Measurement of the distribution of axial stress on the end-plate of the vertebral body. *Spine* 1981;6(3):217–32.
- 48- Fujiwara A, Lim TH, An HS et al. The effect of disc degeneration and facet joint osteoarthritis on the segmental flexibility of the lumbar spine. *Spine* 2000;25(23):3036-44.
- 49- McNally DS, Shackelford IM, Goedship AE, Mulholland RC. In vivo stress measurement can predict pain on discography. *Spine* 1996; 21(22):2580-87.
- 50- In: Canale ST, Beaty JH, eds. *Campbell's Operative Orthopaedics*. 11th ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier; 2011. 2274-75.
- 51- Latridis JC, ap Gwynnb I. Mechanisms for mechanical damage in the intervertebral disc annulus fibrosus. *Journal of Biomechanics* 2004;37: 1165–75.
- 52- Sullivan J, Farfan H, Kahn D. Pathologic changes with intervertebral joint rotational instability in the rabbit. *Can J Surg* 1971;14:71-9.

- 53- Christian WA, Pfirrmann AM, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic Resonance Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration. *Spine* 2001; 26 (17): 1873–78.
- 54- Hong Joo Moon, Hoon Joe, Taek Hyun Kwon, Hye-Kyoung Choi, Youn Kwan Park, Joo Han Kim. Notochordal Cells Influence Gene Expression of Inflammatory Mediators of Annulus Fibrosus Cells in Proinflammatory Cytokines Stimulation. *J Korean Neurosurg Soc* 2010; 48(1): 1–7.
- 55- Park JB, Chang H, Kim KW. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue. *Spine* 2001 Mar 15;26(6):618-21.
- 56- Park JB, Lee JK, Park SJ, Kim KW, Riew KD. Mitochondrial involvement in fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(6):1338-42.
- 57- Han D, Ding Y, Liu SL et al. Double role of Fas ligand in the apoptosis of intervertebral disc cells in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin* 2009 ;41(11):938-47.
- 58- Battié MC, Videman TJ. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics. *Bone Joint Surg Am* 2006; 88 Suppl 2:3-9.
- 59- Battié MC, Videman T, Kaprio J et al. The Twin Spine Study: contributions to a changing view of disc degeneration. *Spine* 2009;9(1):47-59.
- 60- Xu G, Mei Q, Zhou D, Wu J, Han L. Vitamin D receptor gene and aggrecan gene polymorphisms and the risk of intervertebral disc degeneration - a meta-analysis. *Plos one* 2012;7(11):e50243.
- 61- Yuan HY, Tang Y, Liang YX et al. Matrix metalloproteinase-3 and vitamin d receptor genetic polymorphisms, and their interactions with occupational exposure in lumbar disc degeneration. *J Occup Health* 2010; 52(1):23-30.
- 62- Janeczko Ł, Janeczko M, Chrzanowski R, Zieliński G. The role of polymorphisms of genes encoding collagen IX and XI in lumbar disc disease. *Neurol Neurochir Pol* 2014;48(1):60-2.
- 63- Andrade P, Hoogland G, Garcia MA, Steinbusch HW, Daemen MA, Visser-Vandewalle V. Elevated IL-1 β and IL-6 levels in lumbar herniated discs in patients with sciatic pain. *Eur Spine J* 2013;22(4):714-20.
- 64- Nachemson A. The load on lumbar disks in different positions of the body. *Clinical Orthopaedic* 1976; 45: 107-12.
- 65- Johnson WE, Caterson B, Eisenstein SM, Hynds DL, Snow DM, Roberts S. Human intervertebral disc aggrecan inhibits nerve growth in vitro *Arthritis Rheum* 2002 Oct;46(10):2658-64.

66- Eswaran SK, Gupta A, Keaveny TM. Locations of bone tissue at high risk of initial failure during compressive loading of the human vertebral body. *Bone* 2007;41:733–39.

67- Kawakami M, Tamaki T, Weinstein JN, Hashizume H, Nishi H, Meller ST. Pathomechanism of pain-related behavior produced by allografts of intervertebral disc in the rat. *Spine* 1996; 21:2101-07.

68- Olmarker K, Rydevik B. Disc Herniation and sciatica; the basic science platform. In *In Lumbar Disc Herniation*. Edited by Gunzburg R, Szpalski M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002:31-37.

69- Korhonen T, Karppinen J, Malmivaara A et al. Treatment of sciatica with infliximab, a monoclonal humanised tumour necrosis factor antibody against TNF [abstract 14]. [ISSLS Spring Proceedings 2002.

70- Roberts S, Caterson B, Menage J, Evans EH, Jaffray DC, Eisenstein SM: Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc. *Spine* 2000;25:3005-3013.

71- Kenneth P, Botwin R, Gruber DO. Lumbar spinal stenosis: anatomy and pathogenesis. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2003;14: 1–15.

72- In: Rothman RH, Simone FA, eds. *The spine*. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 832.

73- Miller NH, Mims B, Child A, Milewicz DM, Sponseller P, Blanton SH. Genetic analysis of structural elastic fiber and collagen genes in familial adolescent idiopathic scoliosis. *J Orthop Res* 1996;14(6):994-9.

74- Meir A, McNally DS, Fairbank JC, Jones D, Urban JP. The internal pressure and stress environment of the scoliotic intervertebral disc--a review. *Proc Inst Mech Eng H* 2008;222(2):209-19.

75- World Health Organization. *Cancer Pain Relief*. Geneva. 1986. *Anesthesia & Analgesia*. 1988; 67:1159 - 116.

76- Robinson RA, Smith GW. Anterolateral cervical disc removal and interbody fusion for cervical disc syndrome. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1955;96:223–4.

77- Cloward RB. The anterior approach for removal of ruptured cervical disks. *J Neurosurg* 1958;15:602–17.

78- Bolesta MJ, Rehtine GR, Chrin AM. One- and two-level anterior cervical discectomy and fusion: the effect of plate fixation. *The Spine Journal* 2002;2:197–203.

79- Shen FH, Samartzis D, Khanna N, Goldberg EJ, An HS. Comparison of clinical and radiographic outcome in instrumented anterior cervical discectomy

and fusion with or without direct uncovertebral joint decompression. *The Spine Journal* 2004;4: 629–35.

80- Hilibrand A, Fye M, Emery S et al. Impact of smoking on the outcome of anterior cervical arthrodesis with interbody or strut grafting. *JBJS Am.* 2001 May;83-A(5):668-73.

81- Epstein NE, Epstein JA. Short Form–36 outcomes following focal 1- and 2-level cervical laminectomy with multilevel instrumented fusion. *Surgical Neurology* 2006;66:264–68.

82- McGrory BJ, Klassen RA. Arthrodesis of the cervical spine for fractures and dislocations in children and adolescents. A long-term follow-up study. *J Bone joint Surg Am* 1994;76(11):1606-16.

83- Hilibrand AS, Carlson GD, Palumbo MA, Jones PK, Bohlman HH. Radiculopathy and myelopathy at segments adjacent to the site of a previous anterior cervical arthrodesis. *J Bone joint Surg Am* 1999;81(4):519-28.

84- Katsuura A, Hukuda S, Saruhashi Y, Mori K. Kyphotic malalignment after anterior cervical fusion is one of the factors promoting the degenerative process in adjacent intervertebral levels. *Eur Spine J* 2001;10(4):320-24.

85- Ishihara H, Kanamori M, Kawaguchi Y, Nakamura H, Kimura T. Adjacent segment disease after anterior cervical interbody fusion. *The Spine Journal* 2004;4:624–28.

86- Lawrence BD, Hilibrand AS, Brodt ED, Dettori JR, Brodke DS. Predicting the risk of adjacent segment pathology in the cervical spine: a systematic review. *Spine* 2012; 15(37) 22 Suppl:S52-64.

87- Le H, Thongtrangan I, Kim DH. Historical review of cervical arthroplasty. *Neurosurg Focus* 2004; 15;17(3):E1.

88- Delamarter RB, Zigler J. Five-year reoperation rates, cervical total disc replacement versus fusion, results of a prospective randomized clinical trial. *Spine* 2013; 20;38(9):711-7.

89- McAfee PC, Reah C, Gilder K, Eisermann L, Cunningham BA. Metaanalysis of comparative outcomes following cervical arthroplasty or anterior cervical fusion: result from 4 prospective multicenter randomized clinical trials and up to 1226 patients. *Spine* 2012 ;37(11):943-52.

90- Nesterenko S, Riley L, Skolasky R. Anterior cervical discectomy and fusion versus cervical disc Arthroplasty. Current state and trends in treatment for cervical disc pathology. *Spine* 2012;37:1470-4.

91- Kelly M, Mok J, Frisch R, Tay B. Adjacent Segment Motion after anterior cervical discectomy and fusion versus ProDisc-C cervical Total Disc Arthroplasty. *Spine* 2011;36(15):1171-9.

92- Verma K, Gandhi SD, Maltenfort M et al. Rate of adjacent segment disease in cervical disc arthroplasty versus single-level fusion: meta-analysis of prospective studies. *Spine* 2013;38(26):2253-7.

93- Nunley P, Jawahar A, Kerr E et al. Factors affecting the incidence of symptomatic adjacent-level disease in cervical spine after total disc arthroplasty. *Spine* 2012;37(6):445-51.

94- Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger D. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop* 2007; 31(6): 773–81.

95- Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002;12(11):502-8.

96- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213- 22.

97- Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med* 2006;24(5):379-88.

98- 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):2615-25.

99- Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:231-33.

100- Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:231-34.

101-Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp* 2005;265:55-61.

102- Cogle CR, Wainman DA, Jorgensen ML, Guthrie SM, Mames RN, Scott EW. Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. *Blood* 2004;103(1):133-35.

103- Forrai A, Robb L. The hemangioblast--between blood and vessels. *Cell Cycle* 2003;2(2):86-90.

104- 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):269-77.

105- Loges S, Fehse B, Brockmann MA et al. Identification of the adult human hemangioblast. *Stem Cells Dev* 2004;13(3):229-42.

106- Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006;20(3):161-71.

- 107- Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(18):9836-41.
- 108- Holyoake TL, Alcorn MJ. CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev* 1994;8(2):113-24.
- 109- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87(1):1-13.
- 110- 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.
- 111- Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997;21(3):225-35.
- 112- 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):655-63.
- 113- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28(8):875-84.
- 114- 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.
- 115- 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):715-22.
- 116- 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):879-86.
- 117- 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.
- 118- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71-4.
- 119- 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- 35.
- 120- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9:204-14.

121- Forriol F, Esparza R. Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica. *Trauma Fund MAPFRE* 2008;19(2): 88-101.

122- Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181(1):67-73.

123- Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102(10):3483-93.

124- 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):2739-49.

125- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418(6893):41-9.

126-. 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):386-98.

127- 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):357-71.

128- Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(3):290-94.

129- 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):265-72.

130- 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.

131- Ringe J, Kaps C, Schmitt B et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002;307(3):321-27.

132- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol* 2004;32(5):502-9.

133- Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21(3):429- 35.

134 Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16(3):381-90.

- 135- 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):230-47.
- 136- Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 1997;97(3):561-70.
- 137- 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.
- 138- 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):181-88.
- 139- 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):1060-69.
- 140- 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.
- 141- Zarnett R, Salter RB. Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin. *Can J Surg* 1989;32(3):171-4.
- 142- Arai F, Hirao A, Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15(2):75-9.
- 143- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425(6960):841-46.
- 144- 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):836-41.
- 145- Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans DR et al. Human mesenchymal stem cells en- graft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6:1282-6.
- 146- Grayson, WL; Zhao, F; Izadpanah, R; et al. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol* 2006;207:331–39.
- 147- 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):1235-49.

148- Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001;29(2):244-55.

149- Moscoso I, Centeno A, Lopez E et al. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc* 2005;37(1):481-82.

150- Villaron, EM; Almeida, J; López-Holgado, N; Alcoceba, M; Sánchez-Abarca, LI; Sanchez-Guijo, FM; Alberca, M; Pérez-Simon, JA; San Miguel, JF; Del Cañizo, MC. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2004;89(12):1421-27.

151- Urbano-Ispizua A. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: stem cell source. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20(2):265-80.

152- 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.

153- 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):543-53.

154- 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):845-52.

155- 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):1450-56.

156- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109(1):235-42.

157- 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.

158- Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2(6):477-88.

159- in 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004;22(7):1338-45.

- 160- Lee RH, Kim B, Choi I et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004;14(4-6):311-24.
- 161- Shih DT, Lee DC, Chen SC et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 2005;23(7):1012-20.
- 162- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9:204-14.
- 163- Ojeda-Urbe M, Brunot A, Lenat A et al. Failure to detect spindle-shaped fibroblastoid cell progenitors in PBPC co-lections. *Acta Haematol* 1993; 90:139-43.
- 164- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121:368-74.
- 165- Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL et al. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J Hematother* 1997; 6:447-55.
- 166- Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion* 1971; 11:345-9.
- 167- Huss R, Lange C, Weissinger EM et al. Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells* XX; 18:252-60.
- 168- Thomas CB, Kellam JF, Burg KL. Comparative study of bone cell culture methods for tissue engineering applications. *J ATSM Int* 2004; 1:1-17.
- 169- Atala A. Recent developments in tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Opin Pediatr* 2006;18(2):167-71.
- 170- Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005;23(1):47-55
- 171- Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998;16(5):224-30.
- 172- Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001;7(6):679- 89.
- 173- Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2003;5:1-16.

174- 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):3466-72.

175- Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006;367(9518):1241-46.

176. Murray MM, Forsythe B, Chen F et al. The effect of thrombin on ACL fibroblast interactions with collagen hydrogels. *J Orthop Res* 2006;24(3):508-15.

177- Yang C, Hillas PJ, Baez JA et al. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs* 2004;18(2):103-19.

178- 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):165-70.

179- Zhang JY, Beckman EJ, Piesco NP, Agarwal S. A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro. *Biomaterials* 2000;21(12):1247-58.

180- Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(1):3-12.

181- Stitzel J, Liu J, Lee SJ et al. Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials* 2006;27(7):1088-94.

182- Sakiyama Elbert SE, Hubbell JA. Functional biomaterials: Design of novel biomaterials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31:183-201.

183- Bent AE, Tutrone RT, McLennan MT, Lloyd LK, Kennelly MJ, Badlani G. Treatment of intrinsic sphincter deficiency using autologous ear chondrocytes as a bulking agent. *Neurourol Urodyn* 2001;20(2):157-65.

184- Wang Y, Blasioli DJ, Kim HJ, Kim HS, Kaplan DL. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* 2006;27(25):4434-42.

185- Griffith JF, Wang YX, Antonio GE et al. Modified Pfirrmann grading system for lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 2007;32:E708 –712.

186- Manchikanti L. Epidemiology of low back pain. *Pain Physician* 2000;3(2):167-92.

187- Licciardone JC. The epidemiology and medical management of low back pain during ambulatory medical care visits in the United States. *Osteopath Med Prim Care* 2008;2:11.

- 188- Hu SS, Tribus CB, Tay BK, et al. Chapter 5: Disorders, diseases, and injuries of the spine. In: Skinner HB, ed. CURRENT diagnosis and treatment in orthopedics. 4th ed. The New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2006. p. 221-97.
- 189- Guangdong W, Wei L, Lei C, Xiaoyun W, Tianyi L, Yilin C. Repair of porcine articular osteochondral defects in non weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Ti Eng* 2006; 12(11): 3209-21.
- 190- Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* 2006;97(1):84-97.
- 191- Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*. 2012 Jun 14;10(6):678-84.
- 192- Lee, KB; Hui, JH; Song, IC; Ardany, L; Lee, EH. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. *Stem Cells* 2007;25(11):2964-71.
- 193- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 2002;20(6):530-41.
- 194- Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoned M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(3):199-206.
- 195- Vaquero J, Forriol F. Knee chondral injuries: Clinical treatment strategies and experimental models. *Injury* 2012; 43(6): 694-705.
- 196- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005;52(8):2521-29.
- 197- Yang F, Leung VY, Luk KD, et al. Mesenchymal stem cells arrest intervertebral disc degeneration through chondrocytic differentiation and stimulation of endogenous cells. *Mol Ther* 2009;17:1959-66.
- 198- Ganey T, Hutton WC, Moseley T, et al. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells experiments in a canine model. *Spine* 2009;34:2297-2304.
- 199- Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, et al. Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc de- generation through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R206.

200- Van Laar JM, Tyndall A. Adult stem cells in the treatment of autoimmune diseases. *Rheumatology* 2006;45:1187–1193.

201- Scheinberg P. Stem-cell transplantation for autoimmune diseases. *Cytotherapy* 2003; 5:243–251.

202- Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006;108:2509–2519.

203- Friedrich W, Muller SM. Allogeneic stem cell transplantation for treatment of immunodeficiency. *Springer Semin Immunopathol* 2004;26:109–118.

204- Lundqvist A, Childs R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation as immunotherapy for solid tumors: current status and future directions. *J Immunother* 2005;28:281–288.

205- Baird K, Cooke K., Schultz KR. Chronic Graft Versus Host Disease (GVHD) in Children. *Pediatr Clin North Am.* 2010 Feb; 57(1): 297–322.

206- Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 2005;320(2):269- 76.

207- Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17(11):1289-97.

208- Kerker JT, Leo AJ, Sgaglione NA. Cartilage repair: synthetics and scaffolds: basic science, surgical techniques, and clinical outcomes. *Sports Med Arthrosc* 2008;16(4):208-16.

209- Ehlicke F, Freimark D, Heil B, et al. Intervertebral disc regeneration: influence of growth factors on differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC). *Int J Artif Organs* 2010;33:244–52.

210- Koga, H; Muneta, T; Ju, YJ; et al. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* 2007;25(3):689-96.

211- Sobajima S, Kempel JF, Kim JS, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, x-ray, and histology. *Spine* 2005;30:15–24.

212- Rutges JP, Duit RA, Kummer JA, et al. Hypertrophic differentiation and calcification during intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:1487–95.

213- Nerlich AG, Schaaf R, Walchli B, Boos N. Temporo-spatial distribution of blood vessels in human lumbar intervertebral discs. *Eur Spine J* 2007;16:547–55.

- 214- Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, et al. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet* 1997; 350:178–81.
- 215- Johnson WEB, Eisenstein SM, Roberts S. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation. *Connect Tissue Res* 2001;42:197–207.
- 216- Gruber HE, Johnson TL, Leslie K, et al. Autologous intervertebral disc cell implantation: a model using *Psammomys obesus*, the sand rat. *Spine* 2002;27:1626–33.
- 217- Liu LT, Huang B, Li CQ, et al. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate. *PLoS One* 2011;6:e26285.
- 218- Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell* 2008;3:229 –30.
- 219- Henriksson H, Thornemo M, Karlsson C, et al. Identification of cell proliferation zones, progenitor cells and a potential stem cell niche in the intervertebral disc region: a study in four species. *Spine* 2009;34:2278-87.
- 220- Feng G, Yang X, Shang H, et al. Multipotential differentiation of human annulus fibrosus cells: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:675-85.
- 221- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007;131:324-36.
- 222- Song K, Wang S, Mani M, Mani A. Wnt signaling, de novo lipogenesis, adipogenesis and ectopic fat. *Oncotarget* 2014 Nov 30;5(22):11000-3.
- 223- Kang S, Bajnok L, Longo KA et al. Effects of Wnt signaling on brown adipocyte differentiation and metabolism mediated by PGC-1alpha . *Mol Cell Biol* 2005 Feb;25(4):1272-82.
- 224- Bennett CN, Ross SE, Longo KA et al. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem*. 2002;277(34):30998-1004.
- 225- Ross SE, Hemati N, Longo KA et al. Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* 2000;289(5481):950-953.
- 226- Ciciarello M, Zini R, Rossi L et al. Extracellular Purines Promote the Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to the Osteogenic and Adipogenic Lineages. *Stem Cells and Development* 2013: 1097-1111.
- 227- Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells and Development*. 2015, ahead of print.

228- Corr M. Wnt signaling in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol*. 2014;33(6):759-62.

229- Guilak F, Cohen DM, Estes BT et al. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* 2009;5:17-26.

230- Rastogi A, Thakore P, Leung A et al. Environmental regulation of notochordal gene expression in nucleus pulposus cells. *J Cell Physiol* 2009;220:698-705.

231- Steck E, Bertram H, Abel R et al. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2005;23:403-11.

232- Vadala G, Studer RK, Sowa G et al. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion. *Spine*. 2008;33:870-76.

233- Wuertz K, Godburn K, Neidlinger-Wilke C, et al. Behavior of mesenchymal stem cells in the chemical microenvironment of the inter-vertebral disc. *Spine* 2008;33:1843-9.

234- Urban JPG. The role of the physicochemical environment in determining disc cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 2002;30:858-64.

235- Zhu W, Chen J, Cong X, et al. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24: 416-25.

236- Potier E, Ferreira E, Meunier A, et al. Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng Part A* 2007;13:1325-31.

237- Stolzing A, Coleman N, Scutt A. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res* 2006;9:31-5.

238- Weil BR, Abarbanell AM, Herrmann JL, et al. High glucose concentration in cell culture medium does not acutely affect human mesenchymal stem cell growth factor production or proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296:R1735-43.

239- Li YM, Schilling T, Benisch P, et al. Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:209-15.

240- Diamant B, Karlsson J, Nachemson A. Correlation between lactate levels and pH in discs of patients with lumbar rhizopathies. *Experientia* 1968;24:1195-6.

241- Ichimura K, Tsuji H, Matsui H, Makiyama N. Cell culture of the intervertebral disc of rats: factors influencing culture, proteoglycan, collagen, and deoxyribonucleic acid synthesis. *J Spinal Disord* 1991;4:428-36.

- 242- Holm S, Maroudas A, Urban JP, et al. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connect Tissue Res* 1981;8: 101-19.
- 243- Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001;44:585-94.
- 244- Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Sci* 1995;108:1497-1508.
- 245- Nicodemus GD, Bryant SJ. Mechanical loading regimes affect the anabolic and catabolic activities by chondrocytes encapsulated in PEG hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:126-37.
- 246- Angele P, Schumann D, Angele M, et al. Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology* 2004;41:335-46.
- 247- Huang CYC, Reuben PM, Cheung HS. Temporal expression patterns and corresponding protein inductions of early responsive genes in rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells under cyclic compressive loading. *Stem Cells* 2005;23:1113-21.
- 248- Huang CYC, Hagar KL, Frost LE, et al. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004;22:313-23.
- 249- Li Z, Yao SJ, Alini M, Stoddart MJ. Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells in fibrin-polyurethane composites is modulated by frequency and amplitude of dynamic compression and shear stress. *Tissue Eng Part A* 2010;16:575-84.
- 250- Kupcsik L, Stoddart MJ, Li Z, et al. Improving chondrogenesis: potential and limitations of SOX9 gene transfer and mechanical stimulation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2010;16: 1845-55.
- 251- Li Z, Kupcsik L, Yao SJ, et al. Mechanical load modulates chondrogenesis of human mesenchymal stem cells through the TGF-beta pathway. *J Cell Mol Med* 2010;14:1338-46.
- 252- Urban JP, Maroudas A. Swelling of the intervertebral disc in vitro. *Connect Tissue Res* 1981;9:1-10.
- 253- Wuertz K, Urban JP, Klasen J, et al. Influence of extracellular osmolarity and mechanical stimulation on gene expression of intervertebral disc cells. *J Orthop Res* 2007;25:1513-22.

254- Boyd LM, Richardson WJ, Chen J, et al. Osmolarity regulates gene expression in intervertebral disc cells determined by gene array and real-time quantitative RT-PCR. *Ann Biomed Eng* 2005;33: 1071-7.

255- Walker PA, Jimenez F, Cox CS Jr. Progenitor cell therapy for traumatic brain injury: effect of serum osmolarity on cell viability and cytokine production. *Regen Med* 2010;5:65–71.

256- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267–83.

257- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463–516.

258- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827–39.

259- Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc. *J Pathol* 2004;204:47–54.

260- Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, Papa S. Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24: 475–81.

261- Mannello F. Commentary: multipotent mesenchymal stromal cell recruitment, migration, and differentiation: what have matrix metalloproteinases got to do with it? *Stem Cells* 2006;24:1904–7.

262- Weiler C, Nerlich AG, Bachmeier BE, Boos N. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls. *Spine* 2005;30:44–53; discussion 4.

263- Olmarker K, Larsson K. Tumor necrosis factor alpha and nucleus—pulposus-induced nerve root injury. *Spine* 1998;23:2538–44.

264- Hammarstedt A, Isakson P, Gustafson B, Smith U. Wnt-signaling is maintained and adipogenesis inhibited by TNFalpha but not MCP-1 and resistin. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;357:700–6.

265- Xu F, Yang CC, Gomillion C, Burg KJ. Effect of ceramide on mesenchymal stem cell differentiation toward adipocytes. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;160:197–212.

266- Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, et al. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J Cell Biochem* 2009;108:577–88.

- 267- Herrmann JL, Weil BR, Abarbanell AM, et al. IL-6 and TGF- α costimulate mesenchymal stem cell VEGF production by ERK, JNK, and PI3K-mediated mechanisms. *Shock* 2011;35:512–6.
- 268- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:948–53.
- 269- Richardson SM, Walker RV, Parker S et al. Intervertebral disc cell mediated mesenchymal stem cell differentiation, *Stem Cells* 2006;24:707–16.
- 270- Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell- to-cell contact in coculture system, *Spine* 2004; 29:1508–14.
- 271- Watanabe T, Sakai D, Yamamoto Y, et al. Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2010;28:623–30.
- 272- Strassburg S, Hodson NW, Hill PI, et al. Bi-directional exchange of membrane components occurs during co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells. *PLoS One* 2012;7: e33739.
- 273- Niu CC, Yuan LJ, Lin SS, et al. Mesenchymal stem cell and nucleus pulposus cell coculture modulates cell profile. *Clin Orthop Relat Res* 2009;467:3263–72.
- 274- Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, Freemont AJ, Hoyland JA. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan–glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials* 2008;29:85–93.
- 275- Lu ZF, Zandieh BD, Wuisman PI, Bank RA, Helder NH. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: Configuration effect. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359(4): 991-96.
- 276- Henriksson HB, Svanvik T, Jonsson M, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model. *Spine* 2009;34:141–8.
- 277- Zhang YG, Guo XO, Xu P, et al. Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans. *Clin Orthop Relat Res* 2005;430:219–26.
- 278- Huang YC, Leung V, Lu W, Luk K. The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell–based regeneration of intervertebral disc .*The Spine Journal* 2013;13:352-62. Review article

279- Jeong JH, Jin ES, Min JK, et al. Human mesenchymal stem cells implantation into the degenerated coccygeal disc of the rat. *Cytotechnology* 2009;59:55–64.

280- Crevensten G, Walsh AJL, Ananthakrishnan D, et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng* 2004;32: 430–4.

281- Sobajima S, Vadala G, Shimer A, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2008;8:888–96.

282- Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 2003;24:3531–41.

283- Bendtsen M, Bunker CE, Zou X, et al. Autologous stem cell therapy maintains vertebral blood flow and contrast diffusion through the endplate in experimental intervertebral disc degeneration. *Spine* 2011;36:373–9.

284- Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein- 2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 2011;11:471–91.

285- Vadalà G, Sowa G, Hubert M, et al. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation. *J Tissue Eng Regen Med* 2011. [Epub ahead of print].

ANEXOS

9 ANEXOS

9.1 Abreviaturas

AF: Anillo fibroso

NP: Núcleo pulposo

MEC: Matriz extracelular

MMP: Metaloproteinasas

TIMP: Tejido inhibidor de Metaloproteasas (del inglés :Tissue inhibitors of metallo-proteinases)

PGC: Proteoglicano

GAG: Glucosaminoglicanos

DIV: Disco intervertebral

CSM: Célula “Stem” mesenquimal

MSC: Células troncales pluripotenciales (del inglés Mesenchymal Stem Cells)

CMN: Células mononucleadas

EP: Platinos epifisarios (del inglés End Plates)

MO: Médula ósea

UVF: Unidad Vertebral Funcional

TNF- α : Factor de necrosis tumoral (del inglés Tumor Necrosis Factor)

MAPC: (del inglés “Multipotent Adult Progenitor Cells”)

MIAMI: (del inglés “human marrow isolated adult multilineage inducible cells”)

VSEL: (del inglés “very small embryonic-like stem cells”)

ISTC: Sociedad internacional de terapia celular (del inglés: International Society for Cellular Therapy).

TGF- β : Factor de crecimiento transformante (del inglés Transforming Growth Factor).

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (del inglés: insulin-like growth factor 1)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (del inglés Epidermic Growth Factor)

IGF: Factor de crecimiento insulinoide (del inglés Insuline Growth Factor)

bFG: Factor de crecimiento fibroblástico básico (del inglés Basic Fibroblast Growth factor)

HSC: Célula troncal hematopoyética (del inglés Hematopoietic Stem Cell)

SSC: Célula troncal estromal (del inglés Stromal Stem Cell)

BM: Biomateriales.

CM: Células mesenquimatosas

SBF: Suero bovino fetal

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico (del inglés Fibroblast Growth factor)

FDA: Agencia de drogas y alimentos (del inglés Food and Drug Administration)

PDGF-BB: Factor de crecimiento derivada de las plaquetas (del inglés Platelet Derived Growth Factor)

SIS: Matrices derivadas de la submucosa intestinal porcina

BSM: Matriz derivada de la submucosa de la vejiga

PGA: Ácido ppoliglicólico (del inglés Polyglycolic Acid)

PLA: Ácido poliláctico (del inglés Polylactic Acid)

RM: Resonancia magnética

TAC: Tomografía axial computerizada

Rx: Radiografía

HIZ: Zona de aumento de señal (del inglés High Intensity Zone)

FGF: factores de crecimiento fibroblástico (del inglés Fibroblast Growth Factor)

Wnts: Mammalian homologues of Drosophila wingless

LIF: Factor inhibidor de leucemia (del inglés Leukemia Inhibitory Factor)

CFU-F: Unidades formadoras de colonias fibroblásticas (del inglés Fibroblast colony-forming units)

DMEM: Modificación del medio Basal Medium Eagle (del inglés: Dulbecco's modified Eagle's Medium)

CSM-NP: Células "Stem" mesenquimales de núcleo pulposo. (MSC-NP)

CSM-MO: Células "Stem" mesenquimales de médula ósea. (MSC-MO)

PBS: Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (del inglés: phosphate buffered saline)

FACS: Células activas por fluorescencia (del inglés: Fluorescence activated cell sorter)

MP: Mielopatía

RP: Radiculopatía

ACI: Implante de condrocitos autólogos.

BMP: Proteínas morfogenéticas del hueso (del inglés: Bone Morphogenetic protein).

ATP: Adenosina trifosfato

PPAR gamma: El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (del inglés: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

C/EBP: Proteína potenciadora de unión a CCAAT (del inglés: CCAAT-enhancer-binding proteins)

IPS: células pluripotenciales inducidas (del inglés: Induced Pluripotential Stem cells)

9.2 Índice de tablas

Tabla 1. Datos recogidos de los pacientes intervenidos.....	144
Tabla 2. Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio del inmunofenotipo de las células mesenquimales.....	151

9.3 Índice de figuras

Figura 1. Procesamiento de “Stem Cells” derivadas de un lipoaspirado.....	13
Figura 2. El proceso mesogénico	16
Figura 3. Anfiartrosis (sínfisis).....	17
Figura 4. Disco intervertebral.....	18
Figura 5. Desarrollo embrionario.....	19
Figura 6. Desarrollo embrionario canal raquídeo.	20
Figura 7. Núcleo Pulposo.....	20
Figura 8. Fibrillas anillo fibroso.....	21
Figura 9. Vías de nutrición.....	22
Figura 10. Columna vertebral y médula espinal.....	25
Figura 11. Perfil sagital normal.....	26
Figura 12. Compresión, nódulo de Schmorl.....	28
Figura 13. Tensión-Compresión sobre el disco.....	29
Figura 14. Flexión y torsión sobre el disco.....	30
Figura 15. Disco sano y hernia discal.....	33
Figura 16. Evolución de la degeneración discal hasta la hernia.....	34
Figura 17. Disco intervertebral al microscopio óptico.....	36
Figura 18. Molécula de agregano.....	37

Figura 19. Proporción relativa de los componentes principales del disco y platillo del adulto.....	39
Figura 20. Disminución de la intensidad de señal, imágenes de RM ponderadas en T2.....	41
Figura 21. Plexo vasculonervioso discal.....	42
Figura 22. Discografía.....	43
Figura 23. Disminución de los espacios intervertebrales, por proceso degenerativo.....	44
Figura 24. Fisura anular. Lesión HIZ.....	46
Figura 25. Presencia de aire dentro de los discos, por proceso degenerativo.....	46
Figura 26. Cambios tipo I. Imágenes hipointensa en T1 (T1WI) e hiperintensa en T2 (T2WI).....	47
Figura 27. Modic tipo II. Imagen hiperintensa en T1 e isointensa o ligeramente hiperintensa en T2WI.....	48
Figura 28. Cambios Modic Tipo III, hipointensa tanto en T1 y T2.....	48
Figura 29. Distribución de la carga en el disco degenerado.....	53
Figura 30. Estenosis foraminal.....	55
Figura 31. Influencia de los factores de riesgo de degeneración discal en gemelos.....	63
Figura 32. Presiones intradiscales en diferentes posturas.....	73
Figura 33. Fases de la hernia discal.....	79
Figura 34. Tipos de canales lumbares.....	81

Figura 35. A: Estenosis central por hipertrofia de ligamentos amarillos. B: Los tres tipos de estenosis lateral.....	82
Figura 36. Deformidad de raquis.....	83
Figura 37. Movilidad de prótesis discal.....	90
Figura 38. Desarrollo de grados de libertad de las prótesis de disco.....	91
Figura 39. Seis planos de movimiento.....	91
Figura 40. Antígenos de superficie de CSM.....	103
Figura 41. Diseño del estudio.....	142
Figura 42. Discopatía degenerativa.....	143
Figura 43. Intervención quirúrgica.....	145
Figura 44. Material de extracción, conservación de tejido y punción cresta iliaca.....	146
Figura 45. Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad.....	149
Figura 46: Morfología de las CSM del disco cervical en fase inicial.....	162
Figura 47: Diferenciación adipocítica de células procedentes de disco intervertebral y médula ósea.....	163
Figura 48. Marcadores inmunofenotípicos de CSM en NP.....	164
Figura 49. Marcadores inmunofenotípicos de CSM en MO.....	165
Figura 50. Microambiente discal.....	186

9.4 Méritos

- Beca de investigación MAPFRE/2013. Código del proyecto: SA12AYU/094.
- Publicación del artículo: Trauma Fund MAPFRE (2014) Vol 25 no 3: 127-135.
- Aceptado comunicación en formato poster electrónico. GEERaquis 2015.