

TESIS DOCTORAL

**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS “STEM”
MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL
LUMBAR SANO DE PACIENTES CON ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA.**
Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos
pacientes.

FRANCISCO JAVIER ORTEGA GARCÍA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



SALAMANCA 2019



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS “STEM”
MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL
LUMBAR SANO DE PACIENTES CON ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA.
Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos
pacientes.**

FRANCISCO JAVIER ORTEGA GARCÍA

DIRECTORES:

**JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO
RAFAEL CONRADO GONZALEZ DIAZ**

**TUTOR:
JAVIER DEL PINO MONTES**

SALAMANCA, 2019



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

PROF. DR.

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

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado "**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS "STEM" MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL LUMBAR SANO DE PACIENTES CON ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA. Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos pacientes**". ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Francisco Javier Ortega García en el Departamento de Medicina 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, 2019.

Fdo. Dr. D. Juan Francisco Blanco Blanco.



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

PROF. DR.

D. RAFAEL CONRADO GONZÁLEZ DÍAZ, DOCTOR EN MEDICINA Y
CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado "**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS "STEM" MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL LUMBAR SANO DE PACIENTES CON ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA. Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos pacientes.**" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. Francisco Javier Ortega García en el Departamento de Medicina 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, 2019.

Fdo. Dr. D. Rafael Conrado González Díaz.



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

PROF. DR.

D. JAVIER DEL PINO MONTES

CATEDRÁTICO DE REUMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE
SALAMANCA

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado "**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS "STEM" MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL LUMBAR SANO DE PACIENTES CON ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA. Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos pacientes.**" ha sido realizado bajo mi tutela por el Ldo. D. Francisco Javier Ortega García en el Departamento de Medicina 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, 2019.

Fdo. Dr. D. Javier del Pino Montes.



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

PROF. DR.

D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO

JEFE DE DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE
SALAMANCA

CERTIFICO:

Que el presente trabajo titulado "**HALLAZGO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS "STEM" MESENQUIMALES EN NÚCLEO PULPOSO DE DISCO INTERVERTEBRAL LUMBAR SANO DE PACIENTES CON ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA. Comparación con las células obtenidas de médula ósea de los mismos pacientes.**" ha sido realizado por el Ldo. D. Francisco Javier Ortega García en el Departamento de Medicina 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, 2019.

Fdo. Dr. D. Rogelio González Sarmiento.

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, por su paciencia y acertados consejos.

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.

Al Dr. Diego López González, por su inestimable ayuda y generosidad desde el principio de este trabajo.

A mi mujer, por su apoyo y por sacrificar su tiempo para permitirme realizar este y tantos otros proyectos, y a mis hijos, que espero que alguna vez perdonen la permanente ausencia de su padre.

ÍNDICE

INDICE

0. RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 El segmento móvil: disco, carillas y platillos vertebrales	14
1.1.1 Embriogénesis del disco intervertebral.....	17
1.1.2 Consideraciones anatómicas y mecánicas del segmento básico de movilidad	23
1.1.3 Propiedades biomecánicas del disco intervertebral	24
1.1.3.1 Biomecánica de la estabilidad de la columna vertebral	24
1.1.3.2 Función y biomecánica del disco intervertebral y la columna	24
1.1.3.3 Funcionamiento en compresión del disco intervertebral.....	26
1.1.3.4 Elasticidad y maleabilidad discal	28
1.1.3.5 Comportamiento del disco ante fuerzas de flexión	29
1.1.3.6 Comportamiento del disco ante fuerzas de torsión.....	30
1.1.3.7 Comportamiento del disco ante fuerzas de cizallamiento.....	31
1.1.3.8 Características discales de fluencia y relajación.....	32
1.1.3.9 Característica discal de histéresis	32
1.1.3.10 Comportamiento del disco ante cargas cíclicas.....	33
1.2 Características del disco en la degeneración	34
1.2.1 Componente celular del disco sano	36
1.2.2 Componente matricial del disco	38
1.2.2.1 Proteoglicanos de la matriz.....	38
1.2.2.2 Estructura de colágeno discal.....	40
1.2.3 El disco degenerativo	41
1.2.3.1 Correlación entre mecánica y biología.....	52
1.2.3.2 El proceso enzimático de la degeneración de la matriz extracelular	53
1.2.3.3 Características mecánicas en el disco degenerado.....	54
1.2.3.4. Alteraciones morfológicas asociadas a la degeneración del disco intervertebral.....	56
1.2.4 La degeneración de las facetas articulares	58
1.3 Estudio de las causas de la degeneración discal	59
1.3.1 Participación de la genética en la degeneración del disco	64
1.3.2 Factores ambientales en la degeneración discal.....	67
1.3.3 Nutrición del disco.....	68
1.3.4 Esfuerzos mecánicos	69
1.3.5 Tóxicos	71

1.4 Alteraciones de la biomecánica en el disco degenerado	71
1.4.1 Ultraestructura discal.....	71
1.4.2 Medición de la carga axial del disco.....	72
1.4.3 Variación de la hidratación discal bajo compresión.....	75
1.4.4 Disminución de proteoglicano	76
1.5 Patología del disco intervertebral.....	77
1.5.1 Hernia discal.....	77
1.5.2 Estenosis de canal	80
1.5.3 Deformidad de la columna vertebral.....	82
1.6 Opciones de tratamiento de la patología discal	85
1.6.1 Evolución de los tratamientos.....	85
1.6.1.1 Manejo conservador	86
1.6.1.2 Cirugías conservadoras.....	88
1.6.1.3 Artrodesis.....	88
1.6.1.4 Artrodesis anteriores y circunferenciales	90
1.6.1.5 Abordajes laterales	92
1.6.1.6 Artroplastia.....	93
1.6.2 Tratamientos biológicos de los tejidos.....	96
1.6.2.1 terapias genéticas.....	96
1.6.2.2 Regeneración de la población celular	97
1.7. Ingeniería tisular	98
1.7.1. Definición.....	98
1.7.1.1. Células troncales	101
1.7.1.1.1 Identificación de los progenitores mesenquimales.....	103
1.7.1.1.2 Capacidad de diferenciación	107
1.7.2 Las células estromales de la médula ósea.....	109
1.7.2.1. Células progenitoras mesenquimales.....	110
1.7.3 El microambiente hematopoyético	112
1.7.3.1 Fuentes alternativas de CSM.....	114
1.7.4 Comportamiento in vivo de las CSM	116
1.7.5 Procedimientos de obtención de CSM	119
1.7.6 Expansión y cultivo.....	120
1.7.7 Inductores de la proliferación	121
1.7.8 Morfología y comportamiento de las CSM	121
1.7.9 Comportamiento de las CSM in vitro	123
1.8. Biomateriales.	124
1.8.1. Fundamentos de los biomateriales.....	125

1.8.2. Características de los biomateriales.....	126
1.8.3. Adaptaciones de los biomateriales para la implantación	127
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	131
3. OBJETIVOS	133
3.1 General:	133
3.2 Específicos:	133
4. MATERIAL Y MÉTODOS	135
4.1 Diseño.....	135
4.2 Sujetos de estudio	136
4.3 Desarrollo técnico	140
4.4 Obtención de células mesenquimales	141
4.4.1. Aislamiento de CSM en NP	141
4.4.2 Aislamiento de CSM en MO	143
4.4.3 Inmunofenotipo por citometría de flujo	145
4.4.4 Diferenciación multilinaje de CSM.....	147
4.4.5 Estudio genético.....	148
4.4.6 Recogida y análisis de datos.....	149
4.4.7 Análisis de las variables	149
4.4.8 Fases del proyecto	151
5 RESULTADOS	154
5.1 Procesamiento	154
5.2 Cultivo.....	154
5.3 Diferenciación multilineal	155
Figura 47: Diferenciación adipocítica	156
5.4 Estudio inmunofenotípico.....	156
5.5 Estudio genético	158
6. DISCUSIÓN	160
6.1 Terapia celular	162
7. CONCLUSIONES.....	180
7.1 General	180
7.2 Específicas	180
8 BIBLIOGRAFÍA	183
9 ANEXOS	206
9.1 Abreviaturas.....	206
9.2 Índice de tablas.....	209
9.3 Índice de figuras.....	209
9.4 Méritos	212

RESUMEN

0. RESUMEN

Justificación: En el momento actual la degeneración del disco intervertebral no tiene un tratamiento curativo si entendemos como tal la "restitutio ad integrum" del tejido dañado. El tratamiento conservador actual es puramente sintomático, mientras que el tratamiento quirúrgico pretende, bien eliminar fragmentos de disco deteriorados que están lesionando estructuras cercanas, como en el caso de la discectomía, bien la anulación de la función del disco, como en el caso de la artrodesis posterior, bien la eliminación completa del disco y su sustitución ya sea por una prótesis o por hueso y elementos espaciadores en el caso de la artrodesis circunferencial. Los avances actuales en el conocimiento de la biología y la genética celulares abren un horizonte realmente ilusionante de posibilidades de tratamientos dirigidos al origen primordial del problema degenerativo. El OBJETIVO de esta Tesis Doctoral es describir las características de las células mesenquimales progenitoras en el núcleo pulposo de discos intervertebrales lumbares sanos obtenidos a partir de pacientes intervenidos de escoliosis idiopática y comparar sus características con los progenitores celulares obtenidos de médula ósea de los mismos sujetos.

Métodos: Hemos realizado un estudio descriptivo con 16 pacientes que precisaron cirugía de columna vertebral por estar afectados de escoliosis. Se analizó la presencia de células "stem" mesenquimales (CSM) en el núcleo pulposo (NP) del último disco intervertebral incluido en el bloque de instrumentación de la curva escoliótica, en los mismos pacientes se ha obtenido una muestra de aspirado de médula ósea (MO) de la cresta ilíaca

posterior durante el mismo acto quirúrgico y se ha realizado una comparación cualitativa de las poblaciones de CSM. Se aislaron y expandieron las 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 lumbar sano de los pacientes. Las células de ambos orígenes (disco degenerado y médula ósea) se diferencian in vitro hacia ambas líneas celulares, si bien la diferenciación adipocítica y osteoblástica 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. Desde el punto de vista genético expresan de manera similar genes que codifican para Agrecano, colágeno tipo II, COMP, SOX6 y SOX9, pero presentan una menor expresión genética de genes que codifican para colágeno tipo I.

Conclusiones: El NP de disco vertebral lumbar sano contiene células troncales mesenquimales. Estas células son similares a las células de MO, con la excepción de su capacidad disminuida de diferenciación adipogénica y osteoblástica y su menor expresión genética de colágeno tipo I. Estos datos son coincidentes con los hallazgos obtenidos en el segmento cervical en otro estudio previo. No podemos demostrar que haya diferencias en el

comportamiento biológico de la CSM de segmentos biomecánicamente diferentes como son el cervical y el lumbar.

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

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La patología osteoarticular es una causa importante de dolor crónico y limitación funcional en la población mundial en general. Debido a su alta incidencia, les supone a las sociedades del primer mundo una importante carga en forma de absentismo laboral y gasto sanitario. De todas estas enfermedades, se estima que sólo la artrosis es responsable del 50% de las enfermedades crónicas en la población envejecida, superior a las patologías cardiopulmonares y los tumores malignos. En los próximos años se espera que su incidencia sea aún mayor, debido, en parte al aumento de la esperanza de vida de la población y en otra parte a la disminución de la incapacidad debida a las otras enfermedades para las que sí se dedica una gran inversión en investigación y tratamientos. En Estados Unidos en el 2015, la artrosis afectaba a 91.2 millones de personas, de las cuales 61.1 eran adultos menores de 65 años ^[1], en un estudio que incluye estimaciones sobre todos los casos de dolor articular y cambio degenerativo, independientemente del grado de limitación funcional, lo que supera con creces los datos de muestreos más conservadores hechos con anterioridad ^[2].

Dentro de la afectación osteoarticular, la patología de la columna vertebral supone la causa principal de dolor crónico en adultos jóvenes y ancianos, tanto a nivel lumbar como cervical. La etiología que produce la degeneración discal, a menudo presente en los pacientes con dolor crónico, es multifactorial y no bien conocida.

El daño discal se produce de forma lenta por la pérdida progresiva de su estructura, composición y función. La degeneración de las células notocordales que estabilizan la matriz extracelular y protegen la integridad del disco ^[3] y la pérdida de condrocitos en el núcleo pulposo (NP) y su sustitución por fibroblastos, parecen asociarse a una degeneración discal precoz ^[4].

La degeneración de los discos vertebrales ocurre de forma silente durante muchos años hasta que, en un momento dado se nos hace evidente por la aparición de sintomatología dolorosa, bien a nivel local, bien a distancia, como ocurre cuando la inflamación afecta a una raíz nerviosa. Generalmente el síntoma se acompaña de unos cambios histológicos que podemos evidenciar de forma no cruenta mediante estudios de imagen, aunque sabemos que, hoy por hoy, la correlación entre sintomatología, histología y pruebas de imagen no es perfecta. La tendencia del dolor lumbar es a la resolución espontánea en un periodo más o menos variable de tiempo, en el cual hay que ofrecer un tratamiento que calme las molestias, disminuya la limitación y, si es posible, limite el número de nuevos episodios en el futuro, esto incluye analgésicos antiinflamatorios, analgésicos mayores, fisioterapia, escuela de espalda, ejercicio de potenciación muscular, ortesis externas y también medidas más heterodoxas con eficacia menos demostrada, como acupuntura, medicinas alternativas, masajes y ozonoterapia, entre otras. En un número no desdeñable de casos, el dolor no tiende a mejorar, o los tratamientos comentados no son eficaces para conseguir un efecto satisfactorio para el paciente, podemos entonces, ofrecerle una solución quirúrgica, oferta que debe ser responsable, definitiva y de contrastados resultados a largo plazo. Las distintas modalidades de cirugía siempre van a suponer una agresión para el paciente. Desde la

simple microdiscectomía, en la que únicamente se extirpa el fragmento de disco degenerado y protruido con el ánimo de liberar de la compresión a la raíz nerviosa, hasta la más compleja artrodesis circunferencial, en la que se elimina todo el tejido discal, las articulares posteriores y, si es necesario, las estructuras óseas y ligamentosas que puedan estar comprimiendo el canal lumbar, pasando por las descompresiones simples sin o con instrumentación y las grandes correcciones en las escoliosis degenerativas, ninguna técnica quirúrgica regenera los tejidos dañados, sino que anula su función o los sustituye por implantes u otros tejidos, como son las masas de fusión ósea.

La tendencia actual en investigación pretende descubrir los mecanismos de la regeneración tisular, empezando por identificar células multipotenciales en distintos órganos del cuerpo, en tejidos embrionarios, como el cordón umbilical, en médula ósea hematopoyética y también en los discos intervertebrales [5].

Las células multipotenciales mesenquimales, o células troncales "stem cells" (CSM) son la herramienta base sobre la que se pretende evolucionar hacia las técnicas de regeneración tisular. En la actualidad ya ha sido comprobada su capacidad para migrar e implantarse en tejidos distantes, requisito básico para buscarles un uso terapéutico [6].

A excepción del hueso, que repara las lesiones que sufre mediante la formación de nuevo tejido óseo que es capaz de remodelar con el tiempo hasta recomponer una estructura histológicamente idéntica a la previa, y los epitelios y endotelios, que se regeneran de forma completa siempre que no haya lesiones de la lámina basal, el resto de los tejidos reparan las lesiones mediante la formación de un tejido fibroso cicatricial que sustituye al previo en

el espacio, pero no en la función. Esa capacidad de regeneración completa, y no sustitución por una cicatriz, es la que queremos reproducir con la utilización de CSM.

Existen células multipotenciales de estirpe hematopoyética y de estirpe mesenquimal, centrándonos en estas últimas, las podemos encontrar en médula ósea fundamentalmente, pero también en otros tejidos del adulto. Son capaces de diferenciarse hacia adipocitos, condrocitos, miocitos, fibroblastos o células neurales.

A través de la terapia celular se pretende abordar la patología degenerativa creando líneas de tratamiento precoz, poco agresivo y altamente resolutivo. Es fundamental, para conseguir el objetivo de regenerar un tejido, el entender primero los mecanismos fisiopatológicos por los que dicho tejido se degenera. Sabemos que los tejidos humanos tienen una capacidad de regeneración limitada, tanto menor cuanto más diferenciado y especializado es dicho tejido. Conseguir utilizar de forma controlada las cualidades de invasión tisular, diferenciación y reparación de las CSM, evitando a la vez la formación de tejido de granulación y cicatrización fibrosa es el objetivo final de la terapia celular.

Aunque ya se ha insinuado con anterioridad, es necesario definir dos conceptos que marcan la razón de ser de esta tesis doctoral antes de que finalice esta introducción. Primero, la **reparación** de un tejido biológico es la restauración de este, tras una lesión, sin necesidad de que este conserve su arquitectura ni su funcionalidad original, es la reacción más habitual en la

mayoría de los tejidos lesionados, y da como resultado una cicatriz. Segundo concepto, la **regeneración**, se puede hablar de ella cuando la restauración del tejido produce otro con propiedades indistinguibles del original. La ingeniería de tejidos pretende conseguir la regeneración de las lesiones tisulares [7].

Las CSM, descritas por primera vez por Friedenstein [8] son células no hematopoyéticas cuya principal ubicación es la Médula Ósea, tienen aspecto fibroblástico y características de célula pluripotencial, esto es, son capaces de dividirse, proliferar y diferenciarse hacia varias líneas de tejido mesodérmico. Se han identificado en MO [9], grasa [10,11], músculo [12], piel [13], periostio [14], tendón [15], y tejido nervioso [16]. De todos estos tejidos, donde son más abundantes y fáciles de obtener, por la menor morbilidad que conlleva el proceso de extracción es en la médula ósea y el tejido adiposo [8].

Para que una célula pueda ser considerada multipotencial mesenquimal según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) debe comprobarse su capacidad de diferenciarse hacia diferentes estirpes mesodérmicas [17]. Desde su descripción inicial, el interés que han levantado estas células ha ido en aumento, se han desarrollado diferentes métodos de cultivo y diferenciación y se ha ido aprendiendo sobre sus propiedades y características. En la siguiente figura se representa un extracto de CSM obtenido a partir de una de las dos fuentes principales que se han mencionado previamente, en este caso, un lipoaspirado (Figura 1) [18].

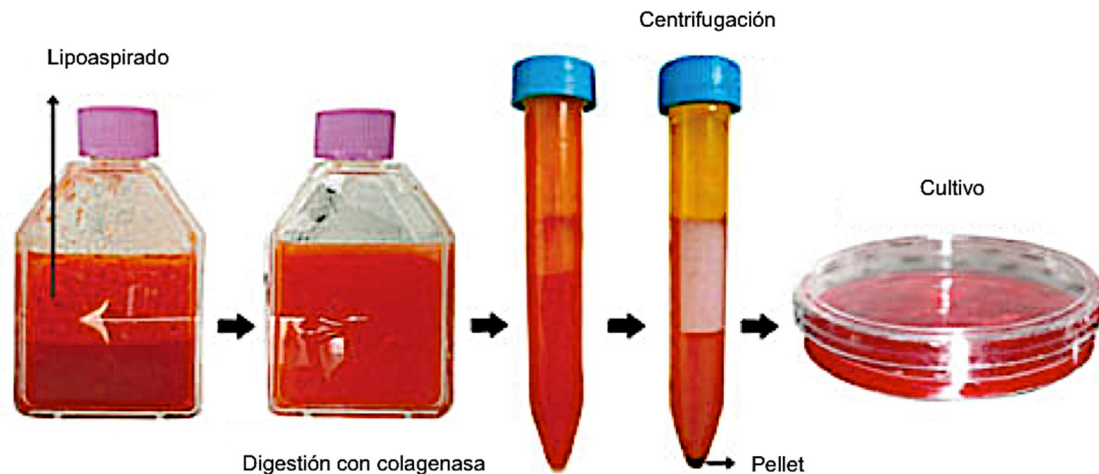


Figura 1. Procesamiento de “Stem Cells” derivadas de un lipoaspirado.

Hay estudios preclínicos y clínicos que avalan la utilidad de las CSM para el tratamiento de enfermedades degenerativas o de base autoinmune, principalmente a nivel cardiovascular, de aparato locomotor, para trasplante hematopoyético, en tracto gastrointestinal, páncreas y sistema nervioso central [19,20]. aprovechando su capacidad de proliferación, diferenciación e implantación, se han manipulado para ser administradas, tanto por vía intravenosa como local directo en el tejido diana.

Está publicada la influencia que tienen las CSM en la homeostasis del tejido óseo, de lo cual se puede inferir que las patologías que cursan con degeneración a este nivel podrían tratarse con dichas células multipotenciales adecuadamente modificadas [21]. Igualmente hay estudios que demuestran ya la existencia de este tipo de células en el núcleo pulposos (NP) de los discos intervertebrales (DIV), [22-24]. En este trabajo dirigimos nuestra atención a los discos intervertebrales lumbares sanos, queremos descubrir y describir la existencia de células multipotenciales y caracterizarlas antes de la

degeneración de dichos discos, que sabemos que está mediada por la carga mecánica ^[25], y haremos una breve comparación con estudios previos que caracterizan estas mismas células en discos degenerados a nivel cervical.

El área cervical, se comporta de forma diferente, desde el punto de vista mecánico al área lumbar, es sobre todo móvil. La influencia de la movilidad se ha analizado con el ejercicio físico, que parece estimular la reparación del disco y la proliferación de CSM en modelos animales, de forma diferente a lo largo del raquis ^[26].

El NP discal es un entorno avascular y, por lo tanto, hipóxico, sometido a cargas mecánicas. En principio debe ser un ambiente poco favorable para la invasión de células con intención regeneradora, el paso terapéutico inicial pasa por mejorar el microambiente desfavorable en el que se ha iniciado la degeneración discal, para, de forma precoz, implantar células troncales que se diferencien y recompongan la arquitectura del tejido discal ^[27]. Usamos indistintamente los términos “troncal”, célula madre o “stem cell”, para definir una célula progenitora, autorrenovable, capaz de regenerar uno o más tipos celulares diferenciados.

Casi cada tejido adulto tiene una población de células multipotenciales, en mayor o menor concentración, que le son características. Estas células participan del mantenimiento de dicho tejido y de su regeneración en caso de producirse algún pequeño daño tisular. Inicialmente se creía que las células troncales de cada tejido adulto eran tan específicas que sólo se iban a diferenciar hacia células maduras de ese tejido, y que sólo las células

embrionarias tenían la capacidad de diferenciarse hacia múltiples líneas celulares. Sin embargo, 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, dependiendo de su grado de multipotencialidad. [28]. El hecho de que podamos aislar células madre en discos degenerados nos crea 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].

Varios grupos han investigado el potencial de las células troncales mesenquimales en la reparación y regeneración de tejidos, evidenciando la capacidad de diferenciación de estas células. Se han definido in vitro, las rutas de diferenciación de estas células, en concreto para reparar patología esquelética [30,19], lesiones en cartílago [31,32], musculares [33] y tendinosas [34]. En la siguiente figura se representa un esquema básico de diferenciación de las CSM (Figura 2).

LA GÉNESIS DEL TEJIDO MESODÉRMICO

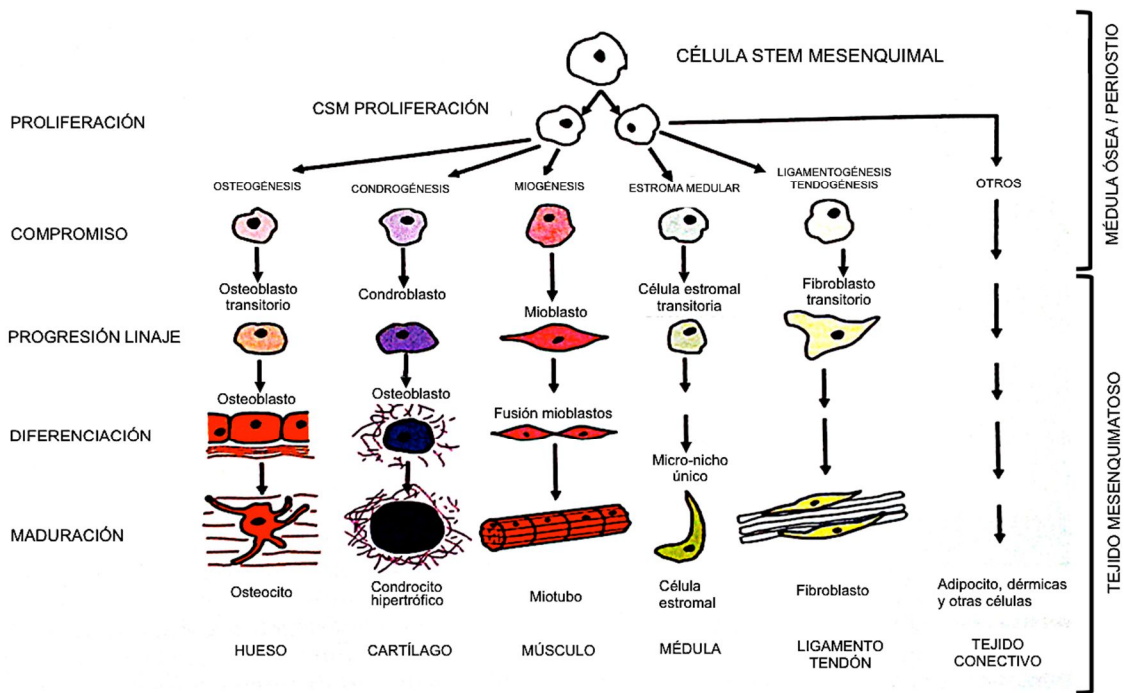


Figura 2. El proceso mesogénico (según los conocimientos en 1980). Imagen tomada de “Principles of Regenerative Medicine”, second edition. Academic Press. Figura 14.1 p.254 parte II capítulo 14: MSCs in Regenerative Medicine.

1.1 El segmento móvil: disco, carillas y platillos vertebrales

La articulación formada por el disco intervertebral y las dos vértebras adyacentes, superior e inferior es del tipo anfiartrosis, parecido, por ejemplo, a la sínfisis del pubis (Figura 3), la suma de todos los discos de la columna vertebral supone la mayor estructura avascular del organismo en cuanto a tamaño, al final del crecimiento puede suponer hasta un tercio de la altura total de la columna vertebral, aunque a medida que avanzan los años van perdiendo altura, de hecho, al final de la vida se pueden haber llegado a perder hasta 30

cm de estatura total solamente debidos a la degeneración discal y a los microaplastamientos vertebrales producidos por la osteoporosis.

La función principal del disco es transmitir y amortiguar cargas axiales, hasta el 80% de las cargas se transmiten a través de las columnas anterior y media de la columna vertebral y, por tanto, a través del disco, el 20% restante de las cargas axiales se transmite a través de la columna posterior, donde se encuentran las articulares posteriores o articulaciones facetarias. Se ha calculado que la columna vertebral es capaz de soportar cargas axiales a compresión superiores a 300 kg; en distracción, sin embargo, las cargas que soporta en los modelos experimentales son aproximadamente la mitad.

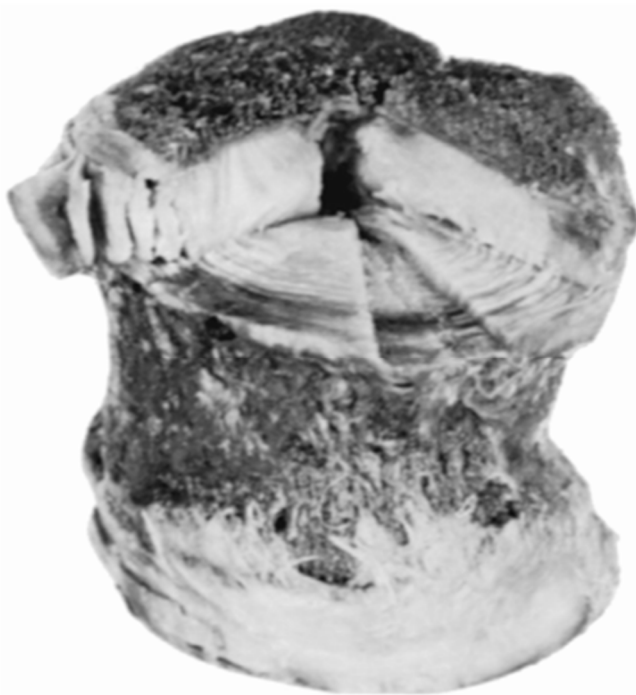


Figura 3. Anfiartrosis. Disección de la unión disco-platillo vertebral. (Tomado de The Spine. Rothman-Simeone 6ª Ed. Saunders, p.49).

A nivel general se considera que el "envejecimiento fisiológico" empieza al final de la tercera década de la vida, cuando el balance metabólico global pasa del anabolismo a catabólico, se deja de ganar masa muscular y masa ósea, se van perdiendo capacidad pulmonar y cardíaca, empieza la hipertrofia prostática y otros efectos. El proceso es inicialmente lento y sus efectos no se nos hacen evidentes hasta unas décadas después. Sin embargo, a nivel discal hay evidencias de que la degeneración puede iniciarse incluso en edades más tempranas ^[35]. Clínicamente los fenómenos más precoces de deterioro suelen ser las hernias discales y los lumbagos asociados, bien a deshidratación discal sin pérdida de altura ni protrusión, bien a hipertrofia de las facetas, bien a ambas.

La estructura del disco intervertebral está formada por un anillo exterior de fibras de colágeno tipo I entrelazadas en varias capas con direcciones ligeramente diferentes que se unen a los platillos vertebrales superior e inferior en su zona más periférica formando un recipiente hermético que contiene en su interior una estructura gelatinosa derivada de la notocorda embrionaria, el núcleo pulposo (NP). Éste último, está formado por un tejido blando, pero de estructura similar al cartílago, con células similares a condrocitos dispersas por una gran matriz extracelular de proteoglicanos de alto peso molecular interconectados por hialuronatos de menor peso molecular, toda una arquitectura diseñada para absorber y retener agua junto con la que formar una almohadilla perfecta para la función que tiene encomendada.

La nutrición y oxigenación de las células de la matriz interna del disco intervertebral se realiza a través de difusión pasiva atravesando los platillos

vertebrales, ya que no hay evidencia de la existencia de vasos sanguíneos funcionantes en el interior de los discos después de su formación completa en el periodo embrionario. (Figura 4).

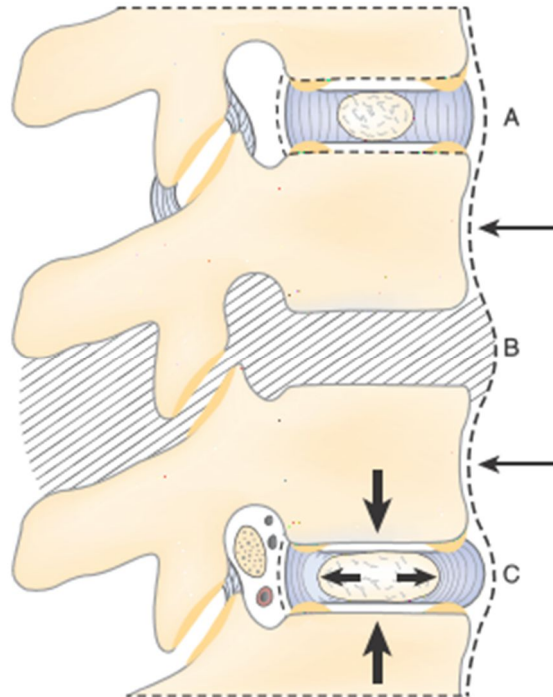


Figura 4. Disco intervertebral. Facetas, ligamentos y sus relaciones.
A: núcleo pulposo, anillo apofisario, platillo condral. B: Componentes del segmento de movilidad descrito por Junghands. C: Comportamiento del núcleo pulposo ante la compresión axial y sus relaciones con estructuras foraminales.

1.1.1 Embriogénesis del disco intervertebral.

Ya en la tercera semana de gestación se observan estructuras de lo que luego será la columna vertebral completa, la notocorda es el eje sobre el que se articulará la formación del esqueleto axial. Las tres capas embrionarias, ectodermo, mesodermo y endodermo participan de la formación de las distintas estructuras (Figura 5).

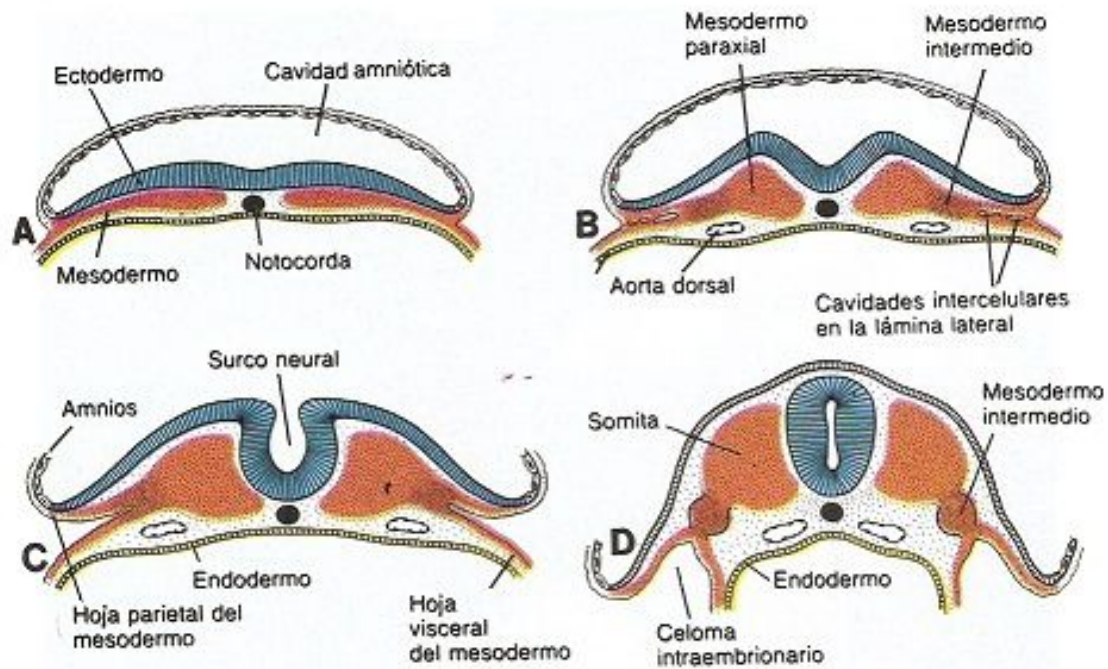


Figura 5. Desarrollo embrionario. A: 17 días. B: 19 días. C: 20 días. D: 21 días. Tomado de Langman, Embriología Médica. 5ªEd. Ed. Panamericana 1990.

Las estructuras de soporte de la columna, esto es, cuerpos vertebrales y discos se forman a partir de especializaciones de células del mesodermo, se producen unas segmentaciones con diferentes características tincionales que más adelante se diferenciarán en discos y cuerpos vertebrales. (Figura 6)

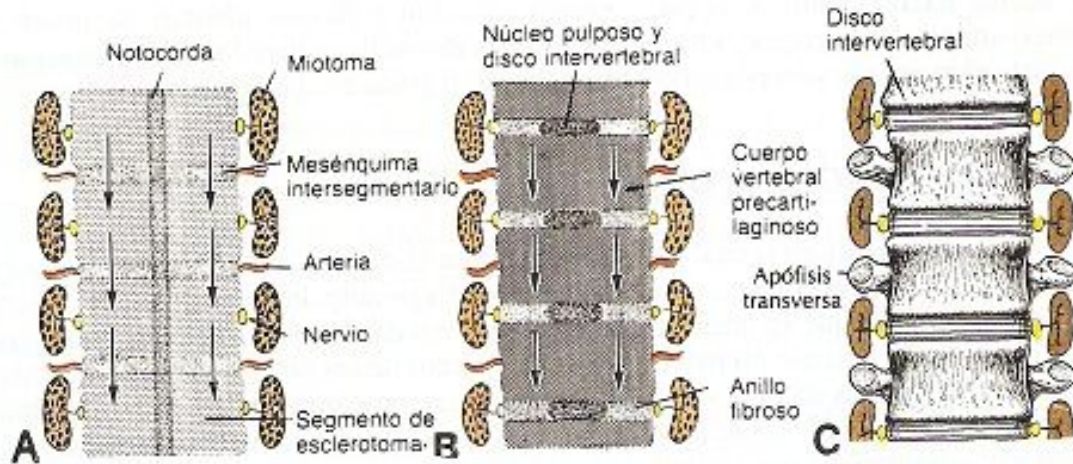


Figura 6. Desarrollo embrionario canal raquídeo. A: cuarta semana. Tejido intersegmentario poco compacto. B: formación de los discos. C: formación de los cuerpos vertebrales. Tomado de Langman, Embriología Médica. 5ªEd. Ed. Panamericana 1990.

El núcleo pulposo se forma por expansión y condensación de estructuras cartilagosas que rodean la notocorda embrionaria, las células se agrupan formando la llamada chorna reticulum y son las responsables de la formación y mantenimiento de la matriz extracelular (Figura 7). En individuos normales se han observado células notocordales activas incluso en la segunda década de la vida, en los pocos y lamentables casos en que se ha observado persistencia y actividad de estas células en edades más avanzadas ha sido en la formación de cordomas, tumores con importante agresividad local.

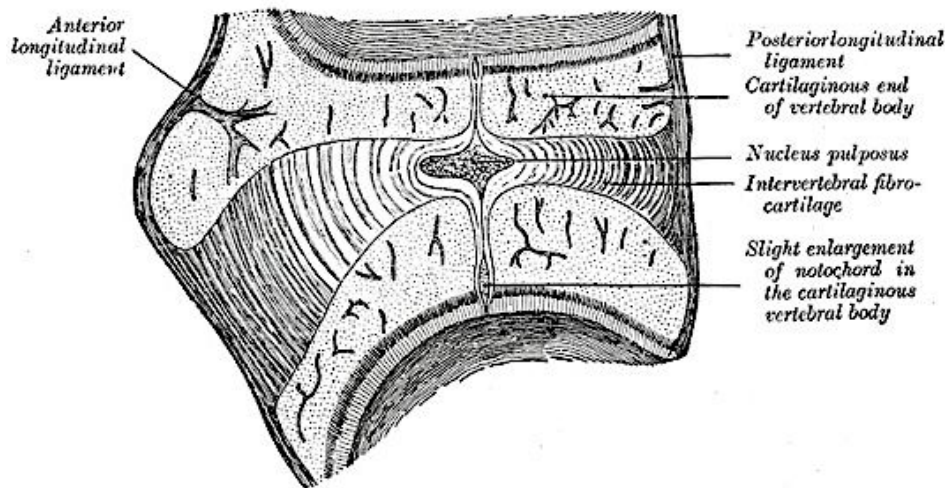


Figura 7. Núcleo Pulposo y sus relaciones.

Como la mayoría de los tejidos conectivos, en el disco intervertebral una pequeña población celular es la responsable de fabricar y mantener un gran volumen de matriz extracelular que es la que proporciona sus características y función al tejido. Como ya se ha citado previamente, el anillo fibroso está formado por fibroblastos que sintetizan fibras de colágeno tipo I orientadas verticalmente, con anclaje en la periferia de los platillos vertebrales superior e inferior, con una inclinación variable entre ellas de unos 30°, de forma que se crea una celosía multicapa que sella herméticamente el contenido del anillo y confiere una excepcional resistencia a las fuerzas desde todas las direcciones. (Figura 8). El anillo fibroso tiene menos capas y, por tanto, menor espesor en la parte posterior de los discos que en la parte anterior, lo cual tiene implicaciones en la génesis de las hernias discales.

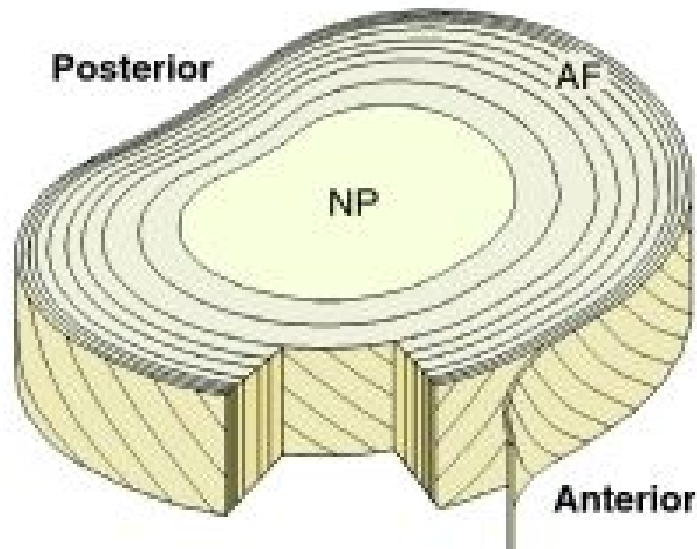


Figura 8. Fibrillas anillo fibroso

Entre las fibras del AF más internas y el NP propiamente dicho existe una delgada zona de transición. El interior del NP es una amalgama de fibras de colágeno tipo II dispuestas de forma amorfa y una matriz de proteoglicanos y de hialuronato con escasa células redondeadas dispersas y aparentemente aisladas entre si en la matriz.

El disco intervertebral se ancla en la periferia de los cuerpos vertebrales superior e inferior mediante la interdigitación de las fibras de colágeno del anillo a través del periostio que recubre el hueso con las propias osteonas, este anclaje es tremendamente resistente, hasta el extremo de que en las lesiones por extensión-distracción de la columna vertebral, la rotura ocurre a través del centro del cuerpo vertebral o por el centro del anillo fibroso, no por la inserción. En la periferia del cuerpo vertebral el platillo es más grueso, para cumplir su función de transmitir cargas y soportar el peso del cuerpo, la parte central del

platillo tiene la responsabilidad de permitir el paso por difusión de nutrientes y oxígeno para mantener la biología del interior del disco intervertebral, el platillo está tapizado en su interior por un auténtico cartílago hialino, una fina capa similar al de las articulaciones diartrodiales, cuya función es servir de barrera para impedir la salida de grandes moléculas, permitiendo solo la difusión de pequeñas moléculas sin carga electrostática desde el interior del disco intervertebral (Figura 9).

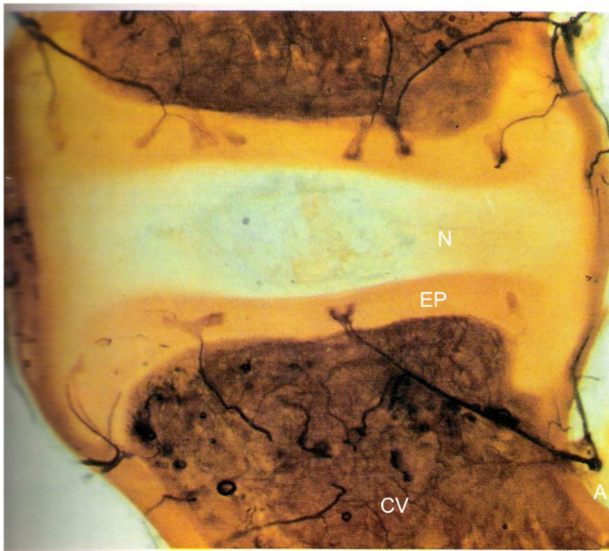


Figura 9. Vías de nutrición

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

Resulta, pues, evidente que la nutrición del disco intervertebral es precaria en condiciones normales, permitiendo solo la persistencia y supervivencia de una pequeña población celular en su interior, con unas necesidades biológicas en el rango del mantenimiento, pero que difícilmente pueden asumir la sobrecarga metabólica que supondría una reparación. Con el paso de los años, además va ocurriendo una esclerosis y engrosamiento de la fina cortical central de los platillos, lo cual dificulta más el aporte de nutrientes y la eliminación de productos de deshecho.

1.1.2 Consideraciones anatómicas y mecánicas del segmento básico de movilidad

Las tres articulaciones que forman el segmento básico de movilidad de la columna vertebral son, por delante el disco intervertebral con las dos vértebras adyacentes, superior e inferior y, por detrás, las dos carillas diartrodiales o facetas de los arcos posteriores. El disco asume la mayor parte de las cargas, como ya se ha comentado, las facetas permiten los movimientos de flexo extensión, inclinación lateral y cierta rotación de las vértebras entre sí.

En lo que es el propio disco, el núcleo pulposo trabaja absorbiendo y dispersando cargas gracias a sus propiedades viscoelásticas, mientras que el anillo fibroso es el encargado último de frenar y contener dichos esfuerzos mecánicos.

Las facetas son auténticas articulaciones sinoviales y, por tanto, susceptibles de sufrir artrosis. Cuando el disco empieza a fracasar y va perdiendo cualidades mecánicas, las carillas van asumiendo una carga de trabajo mecánico para la cual no están diseñadas y empiezan a reaccionar, como ocurre en otras partes del organismo, hipertrofiándose, lo cual, a parte de poco eficaz, genera otros problemas de compresión de estructuras neurales nada deseables.

1.1.3 Propiedades biomecánicas del disco intervertebral

1.1.3.1 Biomecánica de la estabilidad de la columna vertebral

Es preciso introducir la descripción del movimiento y la estática normales de la columna vertebral antes de iniciar la descripción de la patología. Las alteraciones de las condiciones mecánicas de la columna son la base para entender las alteraciones fisiológicas y biológicas, y no se entienden las unas sin las otras. La columna es una estructura de soporte sometida a esfuerzos y que genera fuerzas y momentos de fuerza sirviéndose de puntos de apoyo, y músculos para vencer resistencias mediante brazos de palanca.

1.1.3.2 Función y biomecánica del disco intervertebral y la columna

La columna vertebral tiene como funciones soportar el peso de la cabeza y del tronco con los órganos torácicos y abdominales, permitiendo a la vez cierta movilidad y, además, servir de estuche de protección a la médula espinal (Figura 10). En la mayoría de los individuos sanos, se compone de 7 vértebras cervicales, 12 torácicas, 5 lumbares, 5 vértebras sacras fusionadas entre si y tres o cuatro segmentos coccígeos también fusionados. En el plano coronal no tiene curvaturas de forma fisiológica, o de aparecer alguna curvatura en este plano en un estudio de imagen, debe ser menor de 10° para considerarse normalmente fisiológica.

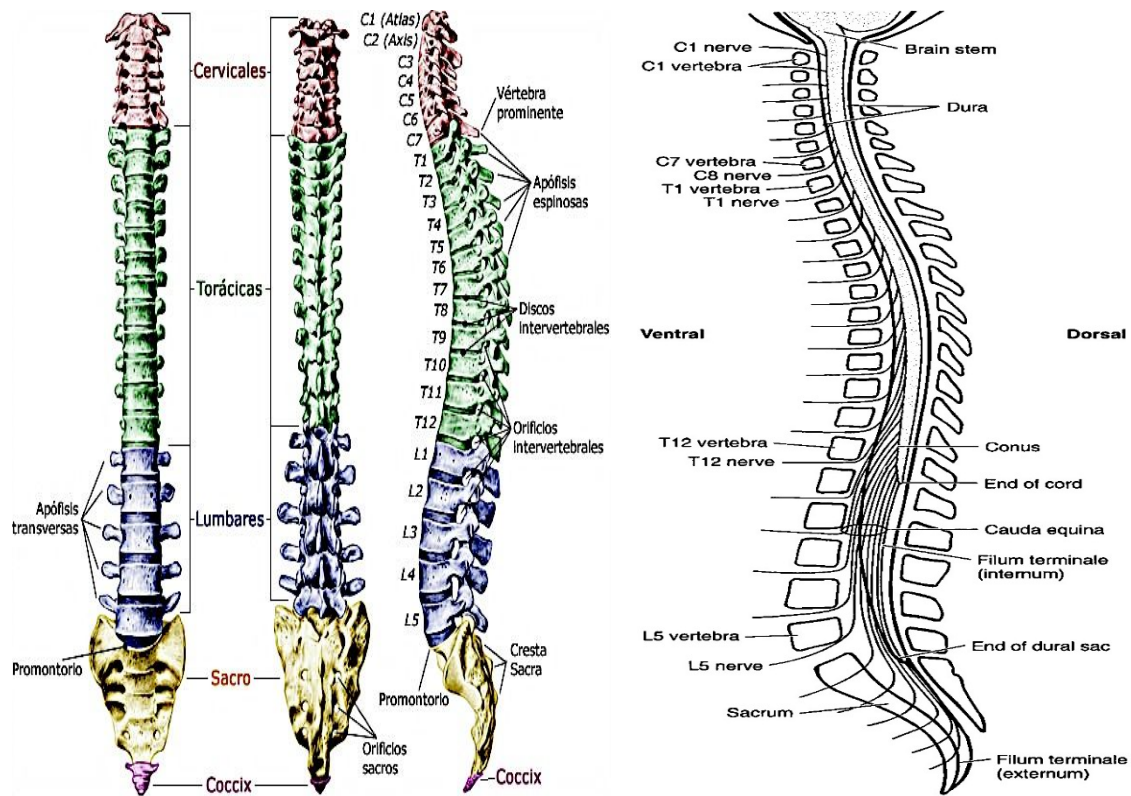


Figura 10. Columna vertebral y médula espinal

En el plano sagital, la columna vertebral humana presenta cuatro curvas de manera fisiológica (Figura 11). Esta disposición, característica de los bípedos auténticos, no está presente en otros primates bípedos ocasionales. Biomecánicamente las curvas fisiológicas dotan a la columna de una mayor resistencia tanto a la tracción como a la compresión axiales que si fuera completamente recta o si tuviera una única curva amplia como ocurre en otros animales que necesitan distribuir las cargas durante la deambulación de manera diferente a los humanos.

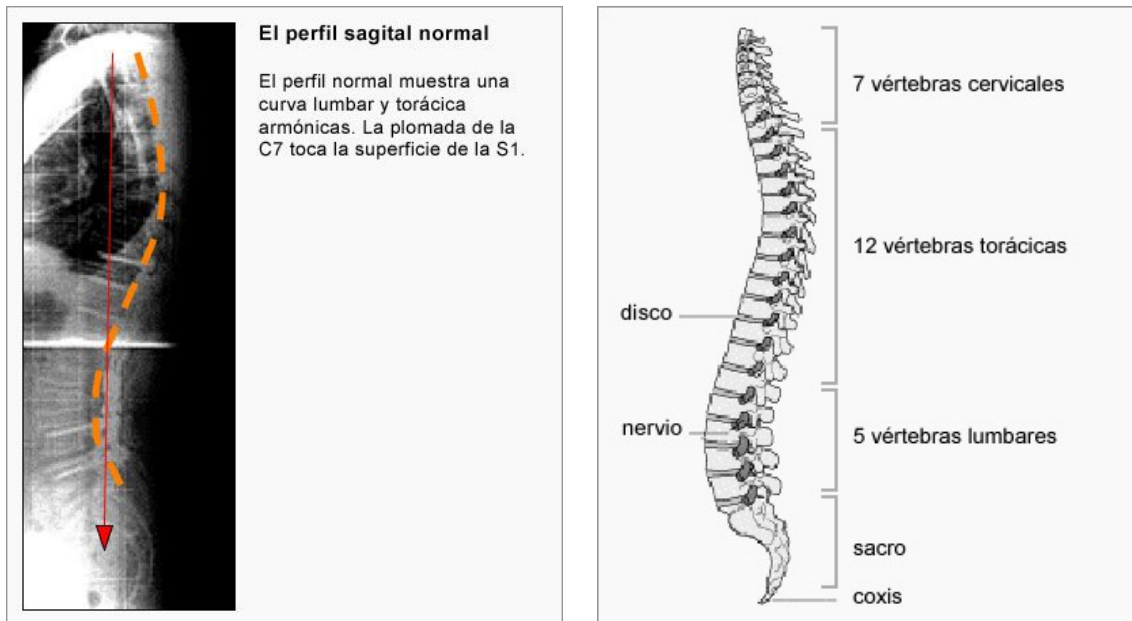


Figura 11. Perfil sagital normal

Entre los cuerpos vertebrales, las cargas se transmiten y amortiguan gracias a la combinación de discos intervertebrales y articulaciones facetarias, junto con los ligamentos y cápsulas articulares. Durante un movimiento concreto de flexión o extensión, partes del disco intervertebral se ven sometidas a fuerzas de compresión, mientras que otras porciones son sometidas a fuerzas de distracción, en los movimientos de rotación se añaden fuerzas de cizallamiento a las distintas zonas del disco intervertebral.

1.1.3.3 Funcionamiento en compresión del disco intervertebral.

En las tres primeras décadas de la vida, mientras el balance entre anabolismo y catabolismo del organismo es positivo, el interior del disco posee suficiente hidratación para actuar como una masa viscoelástica. La transmisión de cargas axiales se realiza desde el centro hacia la periferia, donde la contención de las

capas del anillo fibroso produce un aumento de la presión hidrostática en el núcleo gelatinoso del disco que se transmite al centro de los platillos vertebrales. Con el paso de los años, la degeneración fisiológica del disco intervertebral produce un deterioro en sus cualidades mecánicas, disminuyendo su capacidad de retener líquido y, por tanto, su capacidad de transmitir cargas basado en el aumento de la presión hidrostática como respuesta a la compresión. En el nuevo escenario la altura discal está disminuida, la presión en el centro del disco es menor y, a la carga axial, se produce una dispersión de las fuerzas hacia la periferia, en la zona ocupada anatómicamente por las inserciones del anillo fibroso. Cuando el disco está degenerado, en sus capas externas recae menos tensión periférica, más presión axial y más fuerza de compresión sobre las fibras, las cuales, como se ha visto, están diseñadas para trabajar a distracción de forma óptima, pero no a compresión.

Estudios experimentales desarrollados con intención de conocer la estructura y funcionamiento de los discos intervertebrales, como los desarrollados por Virgin^[36] muestran como las cargas elevadas y continuadas no son suficientes para explicar uno de los primeros estadios de degeneración del disco, como es la herniación del núcleo pulposo, ni siquiera pequeñas incisiones en discos por otra parte completamente sanos, producen salida de contenido discal. Otros estudios experimentales en la misma línea coinciden en que sólo los factores externos no son suficientes para explicar la degeneración discal, tales son los escritos de Hirsch ^[37], Markolf y Morris ^[38] y Farfan y cols. ^[39], curiosamente, sí aceptan la posibilidad de formación de hernias intraesponjosas debidas a causas mecánicas-ambientales (Figura 12).

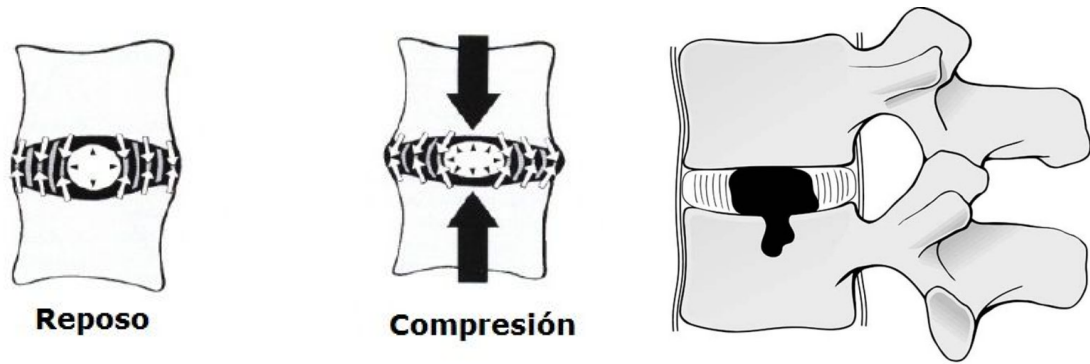


Figura 12. Compresión, nódulo de Schmorl

1.1.3.4 Elasticidad y maleabilidad discal

La columna vertebral en humanos trabaja mecánicamente en condiciones de compresión, son pocas las situaciones en las que puede encontrarse trabajando en distracción pura, sin embargo, como se ha comentado anteriormente, sí se dan circunstancias en las que una parte del anillo discal esté trabajando en distracción y la otra en compresión, como es el caso de todos los movimientos de flexo-extensión y lateralización. Markolf ^[38] estudió las propiedades elásticas del disco y describió como el mismo es más rígido en compresión que en condiciones de distracción. Esto se explica por el aumento de la presión hidrostática en el interior del núcleo al recibir la carga de compresión. El disco se abomba en compresión, hasta donde le permite la rigidez de las fibras del anillo y se estrecha en distracción. (Figura 13).

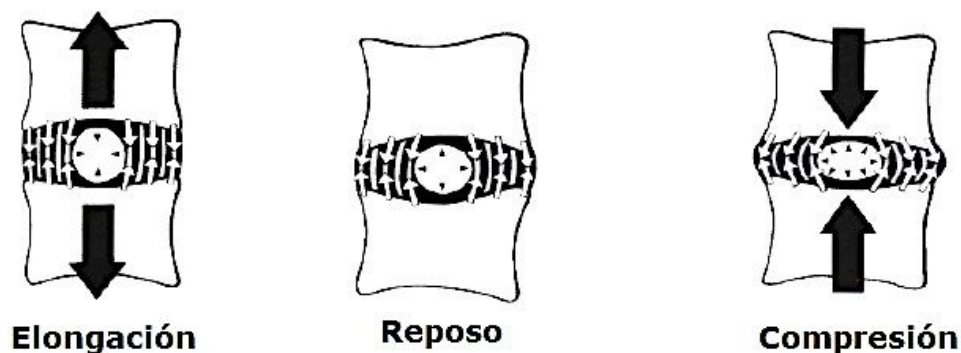


Figura 13. Comportamiento del disco en situaciones de tensión y compresión.

1.1.3.5 Comportamiento del disco ante fuerzas de flexión

Salvo en condiciones experimentales en laboratorio, en las que se pueden analizar aisladamente los distintos vectores de fuerza que pueden actuar sobre el segmento de movilidad de la columna vertebral y, más concretamente, sobre el disco, en situaciones fisiológicas el tipo de cargas a las que se ven sometidas las estructuras discales suele ser muy complejo y variable, flexiones, tracciones, compresiones axiales, compresiones asimétricas, resulta, por tanto, fundamental analizar separadamente cada vector de fuerza para llegar a comprender cual está relacionado con la degeneración y el fallo discal. (Figura 14). El disco intervertebral está muy bien diseñado para soportar y transmitir cargas axiales simétricas, estudios experimentales de Farfan y cols. ^[39] analizaron el comportamiento del segmento de movilidad y del disco en flexión y extensión. En cualquiera de los planos de movimiento, una angulación de entre 6° y 8° no produce fallo de estructuras. Si se eliminan las estructuras articulares posteriores para conseguir aumentar la movilidad segmentaria se producirá un fallo en las estructuras discales a partir de los 15° de angulación.

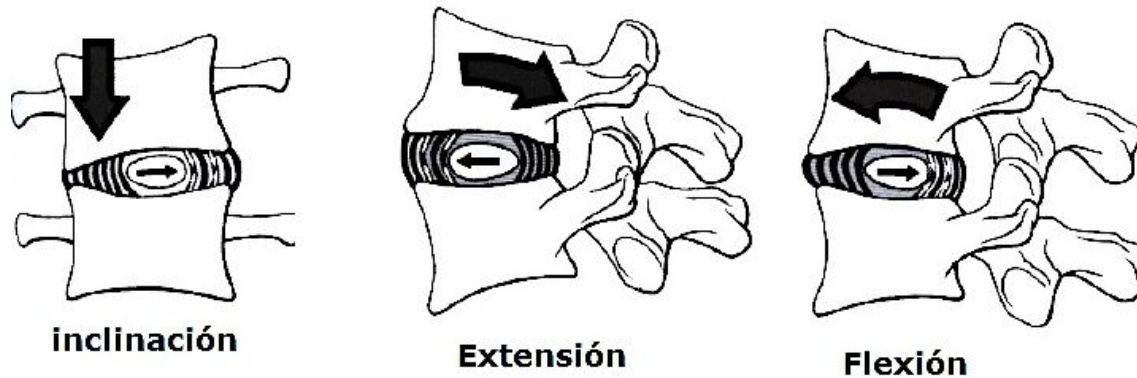


Figura 14. Flexión y torsión sobre el disco

1.1.3.6 Comportamiento del disco ante fuerzas de torsión

En el experimento de Farfan y cols. ^[39] se propuso que la torsión, esto es, fuerzas de rotación sobre un eje vertical podría estar en el origen de la lesión de las estructuras discales. La torsión ocurre de forma normal en los movimientos de la columna que implican giros en el plano coronal, es decir, en situaciones en que el eje de los hombros rotará con respecto al eje de la pelvis, situación muy habitual. En este tipo de movimientos la intensidad de las fuerzas será tanto mayor cuanto más alejado se esté del centro de rotación, tal y como corresponde a la definición física de momento de fuerzas. El estudio realizado sobre especímenes compuestos por un segmento de movilidad, esto es, dos vértebras con su disco y articulares posteriores y los ligamentos que los unen, sin la participación de la musculatura paravertebral, sobre los que se aplicó una fuerza de torsión con el centro de rotación en la parte posterior del disco, demostró que la relación entre momento aplicado y deformación seguía un patrón sigmoideo, con una zona inicial entre los 0° y 3° de angulación en que un pequeño momento era suficiente para conseguir la deformación, seguido de una zona más amplia en la que la relación entre momento aplicado y

deformación obtenida era lineal entre los 3° y 12°. La última fase de la deformación ocurría entre los 12° y 20° en discos sanos, antes de la rotura con un nuevo aplanamiento de la curva. También se comprobó el comportamiento de discos degenerados, observándose que el límite hasta la rotura era en torno a un 25% menor que en los discos sanos.

1.1.3.7 Comportamiento del disco ante fuerzas de cizallamiento

Las fuerzas de cizallamiento son aquellas que se producen simultáneamente en el mismo plano y en direcciones opuestas sobre una estructura. Ocurre cizallamiento en el plano axial, perpendicular al eje mayor de la columna vertebral, en esencia supone la creación de una fuerza de corte generalmente homogénea en toda la circunferencia del anillo fibroso discal. En las direcciones anteroposterior y lateral, la fuerza de cizallamiento que es capaz de soportar un espécimen experimental de columna vertebral como el que se ha descrito en los puntos anteriores es de en torno a 260N/m² lo que resulta un valor considerable, por tanto, la resistencia del segmento de movilidad al deslizamiento anteroposterior y al lateral, denominados listesis en la clínica, es elevada, y superior a las fuerzas que aparecen normalmente en situaciones fisiológicas. Se puede afirmar que el fracaso del segmento de movilidad debido a fuerzas de cizallamiento puras es muy poco frecuente, aunque, como ya se ha comentado previamente, los movimientos puros fuera del ámbito experimental son raros, lo más frecuente es la combinación de vectores de fuerzas sobre una o distintas partes de un disco, de manera simultánea en condiciones de funcionamiento normales.

1.1.3.8 Características discales de fluencia y relajación

La fluencia o cedencia se define en física como la deformación irrecuperable de una estructura, a partir de la cual sólo se recuperará la parte de su forma correspondiente a la deformación elástica. A partir del punto definido como límite de fluencia, la deformación que ocurre se denomina deformación plástica. Hasta el punto de fluencia el material se comporta de manera elástica, después lo hará de manera plástica en aquellos materiales, como es el disco intervertebral que presentan esta característica. Kazarian ^[40] realizó pruebas de fluencia sobre unidades vertebrales funcionales (UVF). Analizó separadamente cuatro grados de degeneración discal, de 0 a 3, siendo cero el disco normal. Observó una relación, entre las características de fluencia y el grado de degeneración 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 en el 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. Por lo que se deduce que, según avanza la degeneración, el disco pierde su capacidad para atenuar los impactos y repartir las presiones por el platillo vertebral de forma homogénea.

1.1.3.9 Característica discal de histéresis

La histéresis se define como la tendencia de un material a conservar una de sus propiedades en ausencia del estímulo que la ha generado. El disco intervertebral, como estructura viscoelástica, tiene esta tendencia en

determinadas condiciones. En condiciones de ciclos repetitivos de carga y descarga sobre el disco este va precisando progresivamente menor energía para deformarse a medida que progresan los ciclos, y también aumenta el tiempo requerido para recuperar su forma previa de reposo cuando cesan dichos ciclos. La fuerza deformante será diferente en función de las características viscoelásticas del disco, por tanto, los discos degenerados necesitan menos ciclos y menos fuerza para deformarse y permanecer deformados (histéresis) en condiciones de cargas cíclicas, que los discos sanos. Igualmente, la histéresis puede variar entre unos discos y otros a lo largo de la columna vertebral. 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. Es decir, a igual grado de degeneración, el comportamiento viscoelástico es diferente entre los discos de distintos niveles.

1.1.3.10 Comportamiento del disco ante cargas cíclicas

En todos los materiales o compuestos de materiales se pueden producir fallos, fracasos o roturas por dos tipos de mecanismos, por un lado, una fuerza puntual excesiva que supere el límite de resistencia del material, por otro, la aplicación de una fuerza cíclica, inferior al umbral de rotura, pero de forma continua, acaba produciendo el fallo por fatiga del material. El disco intervertebral (Figura 15), puede lesionarse por cualquiera de estos dos mecanismos. De hecho, la rotura por un evento puntual de elevada energía solo se ve en grandes traumatismos, como accidentes de tráfico o caídas de altura, mientras que las lesiones atribuibles a cargas cíclicas están

seguramente en la génesis de la degeneración discal atribuida al "envejecimiento" que ocurre en todas las personas a partir de cierto momento de la vida.

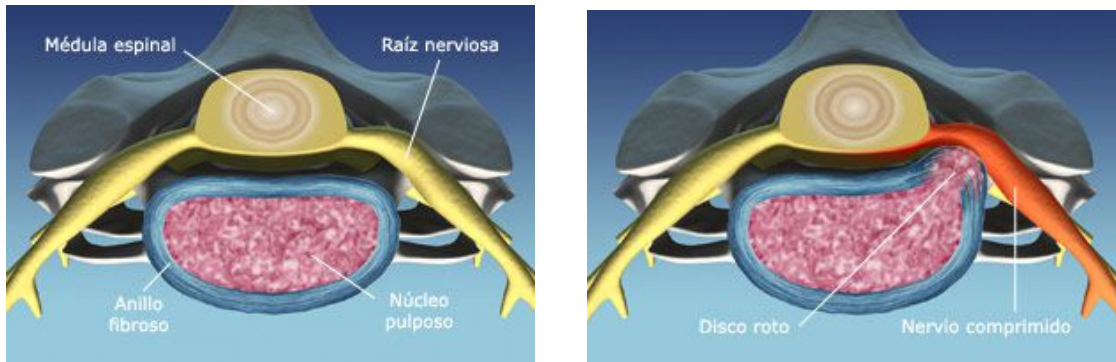


Figura 15. Disco sano y hernia discal

1.2 Características del disco en la degeneración

La degeneración discal implica un cambio en la composición de los elementos del interior del disco. Se producen modificaciones tanto en la composición de la matriz extracelular como en la cantidad y viabilidad de las células de la matriz. En los años setenta del pasado siglo se publicaron las teorías que describen la posible génesis de la degeneración discal. Según Naylor y cols ^[41] en 1975 la génesis de la degeneración discal se iniciaba con la fisuración del anillo fibroso y la invasión de la zona lesionada por tejido de granulación vascularizado que, al ponerse en contacto con el interior del disco, que se había mantenido aislado del resto del organismo desde el final del periodo embrionario, producía una reacción autoinmune que ocasionaba la degeneración de los proteoglicanos y

la consecuente pérdida de capacidad funcional del disco. El año siguiente, en 1976, Gertzbein ^[42] propuso que era la extrusión o el secuestro del núcleo pulposo en el interior del canal vertebral durante la aparición de una hernia de disco lo que provocaba una reacción de cuerpo extraño y posteriormente una activación del sistema inmune contra las estructuras intradiscales. En 1977 Pritzker ^[43] centró el inicio del proceso degenerativo en la degeneración del cartílago hialino que tapiza los platillos vertebrales, puesto que es a través de este cartílago, por difusión de nutrientes, como los condrocitos que forman y mantienen la matriz discal se nutren, una alteración de las características del cartílago y del hueso subcondral sobre el que asienta produciría una disminución de los condrocitos discales y una disminución de la calidad de la matriz extracelular. Al deteriorarse las cualidades mecánicas del disco se produce una reacción en cadena que afecta al resto de estructuras de la unidad funcional. Las articulaciones facetarias en la parte posterior de los arcos vertebrales se sobrecargan mecánicamente y reaccionan, como lo hace todas las articulaciones diartrodiales, generando osteofitos, hipertrofiando las cápsulas articulares y los ligamentos amarillos y generando, por tanto, el cuadro clínico de la discopatía degenerativa.

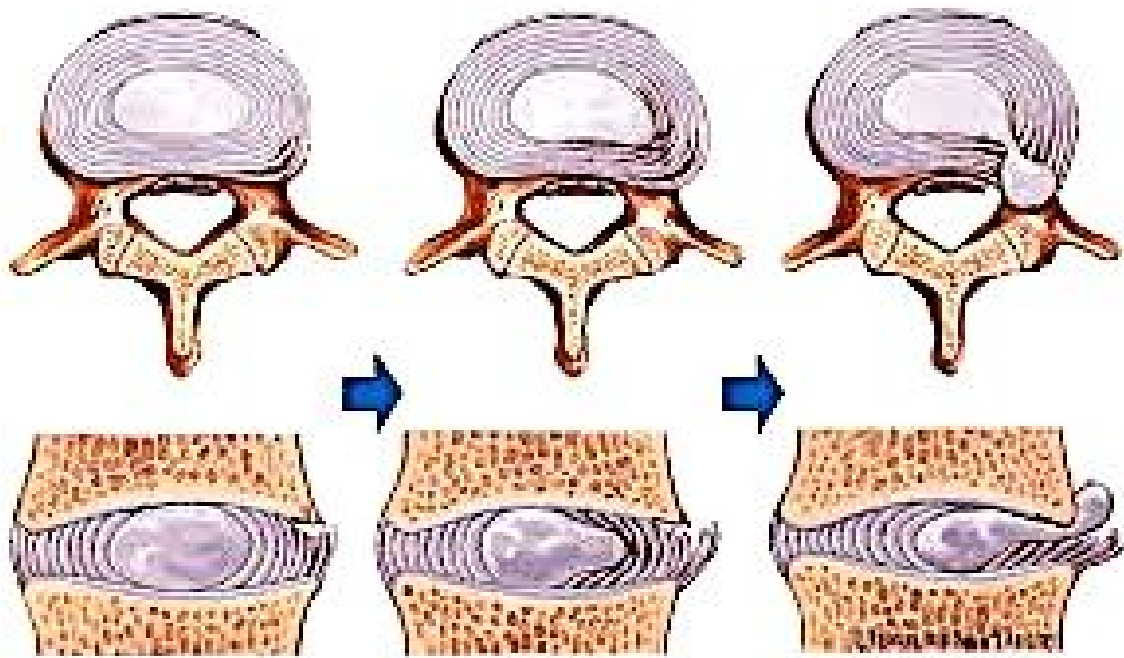


Figura 16. Evolución de la degeneración discal hasta la hernia

1.2.1 Componente celular del disco sano

El disco intervertebral tiene dos regiones diferenciadas con características histológicas, estructurales y, por tanto, funcionales diferentes. Por un lado, el anillo fibroso está formado por capas alternas de colágeno fundamentalmente tipo I dispuestas en direcciones ligeramente diferentes entre si, esta estructura está mantenida por una matriz celular de fibroblastos fusiformes dispuestos longitudinalmente con respecto a los haces de colágeno, de manera similar a lo que ocurre en otros tejidos fibrosos como son los tendones o los ligamentos. En el interior de este anillo fibroso se dispone otra región histológica con consistencia de gel formada por fibras de colágeno en menor densidad flotando en una matriz de agua y proteoglicanos. Para nuestro estudio es básico

conocer y comprender la estructura y celularidad del interior del disco intervertebral.

Existen diferentes tipos celulares dentro de la matriz discal, en una densidad de 5500 células/mm², los condrocitos, más abundantes en la periferia, tanto cerca de los platillos vertebrales como del anillo fibroso, donde los nutrientes que acceden al interior del disco y la oxigenación son más elevados, son los encargados de mantener la matriz.

Las células puramente notocordales, procedentes del neuroectodermo embrionario, desaparecen en el ser humano en la primera década de la vida en condiciones normales. (Figura 17).

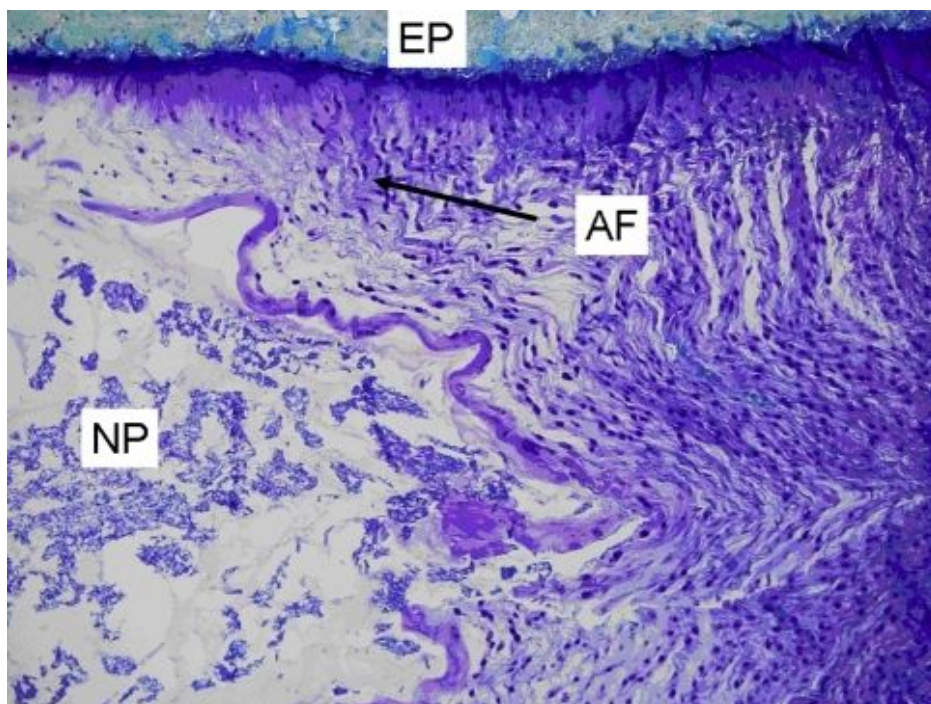


Figura 17. Disco intervertebral al microscopio óptico
NP: Núcleo Pulposo
AF: Anillo Fibroso
EP: Endplate (platillo vertebral)

1.2.2 Componente matricial del disco

La matriz extracelular está estructurada de forma compleja como se describirá en los siguientes apartados, los condrocitos emiten unas prolongaciones que les permiten, mediante señales químicas, conocer el estado de la matriz extracelular, su configuración y actuar modificando la biosíntesis de enzimas. Dichas enzimas actuarán degradando matriz vieja y regenerando nueva matriz.

1.2.2.1 Proteoglicanos de la matriz

Los proteoglicanos se componen de un centro proteico al que se unen mediante enlaces covalentes los polisacáridos o glucosaminglicanos (condroitín sulfato y queratán sulfato). En el disco intervertebral el agregano es el proteoglicano (PGC) más abundante en el disco (Figura 18), en los discos sanos constituye el 70% del peso seco del núcleo pulposo (NP) y el 25% del anillo fibroso (AF), son moléculas extremadamente hidrofílicas, que retienen agua en grandes cantidades para formar juntos la mayor parte de la matriz extracelular. Los agreganos se agrupan, nada más sintetizados, a través de su región globular G1 del centro proteico en torno a moléculas de hialuronato, que funciona como un estabilizador de la estructura hidrofílica, de esta forma queda sellado un gran agregado reticular empapado en agua y rodeado por una red fibrosa de colágeno.

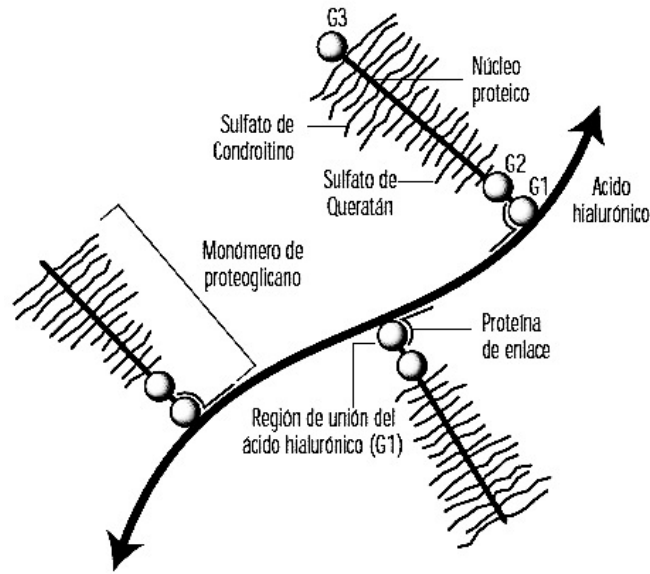


Figura 18. Molécula de agregano

Además de los masivos aglomerados de agregano con más de cien cadenas alternas de condroitín sulfato y queratán sulfato, existen otros pequeños proteoglicanos con sólo una o dos cadenas de glucosaminglicanos que no forman agregados con el ácido hialurónico, se han descrito decorita, biglucano, fibromodulina y lumicano, se cree que, en vez de una función estructural, tienen un papel modulador sobre la síntesis de colágeno y de fijación de factores de crecimiento en el interior de la matriz extracelular.

Cuando aparece la degeneración discal, la traducción histológica de la misma es una disminución de todos los proteoglicanos, estructurales o no, se han descrito enzimas proteolíticas como las metaloproteasas (MMP) y agreganasa y se han detectado los productos de degradación de los proteoglicanos. La fragmentación de las estructuras glucoproteicas de la matriz afecta negativamente a su capacidad para retener agua y mantener con ello la altura,

turgencia y estabilidad del disco intervertebral. Puesto que se ha observado cómo las células de discos degenerados conservan la capacidad de sintetizar agreganos, el proceso de degeneración se debe a una pérdida del equilibrio entre degeneración y reparación de la matriz.

1.2.2.2 Estructura de colágeno discal

A nivel del anillo fibroso que forma la periferia del disco intervertebral, el tipo de colágeno predominante es el tipo I, a nivel del centro del disco, en el núcleo pulposo el colágeno predominante es el tipo II (Figura 19). Entre estos dos tipos, forman el 80% del colágeno total del disco intervertebral, el 20% restante se distribuye en proporciones variables entre colágenos tipo III, IV, IX, X, XI, XII, XIV, sin que esté definida cuál es la función de cada uno. Parece que algunos tipos de colágeno podrían participar en la formación de las fibrillas de los otros tipos de colágeno predominantes. 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 IV están más en relación con las células.

En la degeneración discal el colágeno también sufre cambios, aunque no tan evidentes como los de la matriz extracelular, la cantidad total cambia poco, pero sí hay cambios en las proporciones de los tipos menos frecuentes y un aumento del grado de desnaturalización del colágeno tipo II del interior del NP. 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

factible sintetizar nuevas moléculas de colágeno, por lo menos durante una fase incipiente de la degeneración discal, quizá en un intento de reparar el disco.

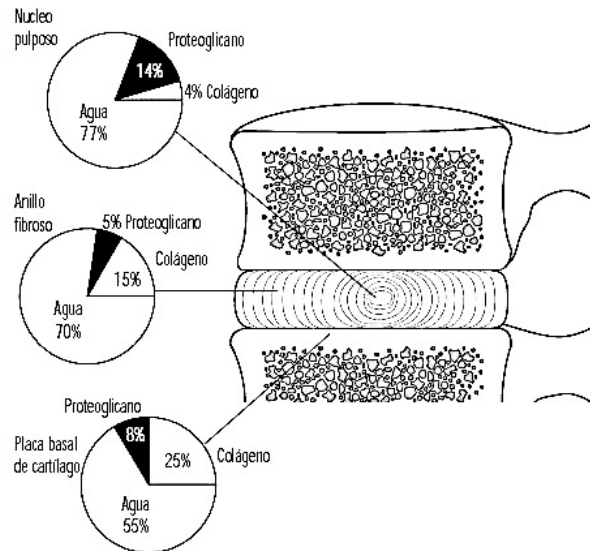


Figura 19. Proporción relativa de los componentes principales del disco y platillo del adulto

1.2.3 El disco degenerativo

Puede no ser fácil consensuar cuándo los cambios evolutivos que ocurren en los tejidos pasan de ser maduración a ser degeneración, con esta premisa, el disco intervertebral es la estructura que empieza a mostrar cambios degenerativos de manera más precoz, ya desde el mismo momento del nacimiento se difumina la separación entre NP y AF. El NP ya empieza a perder capacidad de retener agua, lo que se traduce en una pérdida de altura. Progresivamente van apareciendo fisuraciones en las capas del anillo fibroso, estas microrroturas, demostradas por discografía o, en casos más avanzados, por RMN, son lo que definen la degeneración discal. Según Trout y cols. ^[44] el 50% de las células en el disco de un adulto están necrosadas. La relación entre

degeneración y clínica dolorosa se explica por el aumento de la vascularización con finalidad reparativa en la periferia del anillo y la demostración histológica de proliferación de terminaciones nerviosas peridiscales.

Los estudios de Boos y cols. ^[45] sobre los cambios morfológicos en discos degenerados mostraron cómo en pacientes de dos años se empezaban a observar aumento de hendiduras y cambios granulares a nivel nuclear. Se relaciona de este modo en el tiempo la degeneración celular, la degeneración del anillo periférico y de la matriz y la sintomatología dolorosa.

En la gran mayoría de los casos, se evidencia más precozmente la aparición de cambios degenerativos en los discos lumbares lo cual apoyó las teorías clásicas que relacionaban la degeneración con el sobreuso, los traumatismos de alta energía y los microtraumatismos cíclicos. Es innegable que el ambiente juega un papel en todos los procesos degenerativos, sin embargo, hay evidencia bastante consistente de que la constitución genética puede ser el factor más importante para la producción y, sobre todo, para la progresión de la degeneración tal y como describieron Battie y Videman en 1995 en un estudio en gemelos idénticos ^[46]. Ya se ha insinuado previamente que la diferencia entre maduración y degeneración puede ser difícil de marcar, cuesta considerar el disco de un niño de dos años como degenerado, aunque presente el mismo tipo de cambios que se van a ver más adelante en adultos sintomáticos, esto crea cierto debate entre los médicos clínicos en cuanto a la definición, diagnóstico y actitud terapéutica de la actualmente llamada enfermedad degenerativa discal. Es innegable que los cambios degenerativos, a medida que van apareciendo van aumentando con la edad, como se constata por estudios seriados de RMN, actualmente la prueba incruenta más empleada

para el estudio de las estructuras de la columna vertebral. Las denominadas secuencias potenciadas en T2 son las que ofrecen más información macroscópica, que no ultraestructural, sobre la forma en que se va deshidratando el NP, las fisuraciones del AF, la pérdida de altura del disco y los cambios reactivos de las estructuras circundantes (Figura 20). Hay que recordar que, pese a la calidad de la información que proporciona una resonancia, los cambios observados no necesariamente se correlacionan ni con la presencia o ausencia de síntomas, ni con la intensidad, duración ni con las características clínicas de los mismos.



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

A parte del debate semiológico que permita diferenciar lo que son cambios de color en una imagen de lo que son síntomas patológicos existe el debate más complejo de descubrir cuales son las causas del dolor en la degeneración discal. La deshidratación del disco y la consiguiente pérdida de cualidades mecánicas puede ser el inicio del problema, pero posteriormente deben ocurrir otra serie de procesos que expliquen la aparición de síntomas. Se ha

observado como, en disco sanos, la vascularización e inervación del AF penetra tan solo en los dos primeros milímetros de espesor de las fibras, sin embargo, cuando empiezan a aparecer las fisuraciones del anillo ocurre una neoformación de vasos que progresan hasta capas más profundas, en un evidente intento reparativo, acompañando a los vasos se han descrito proliferaciones de fibras nerviosas amielínicas tipo C con receptores para el polipéptido P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Figura 21).

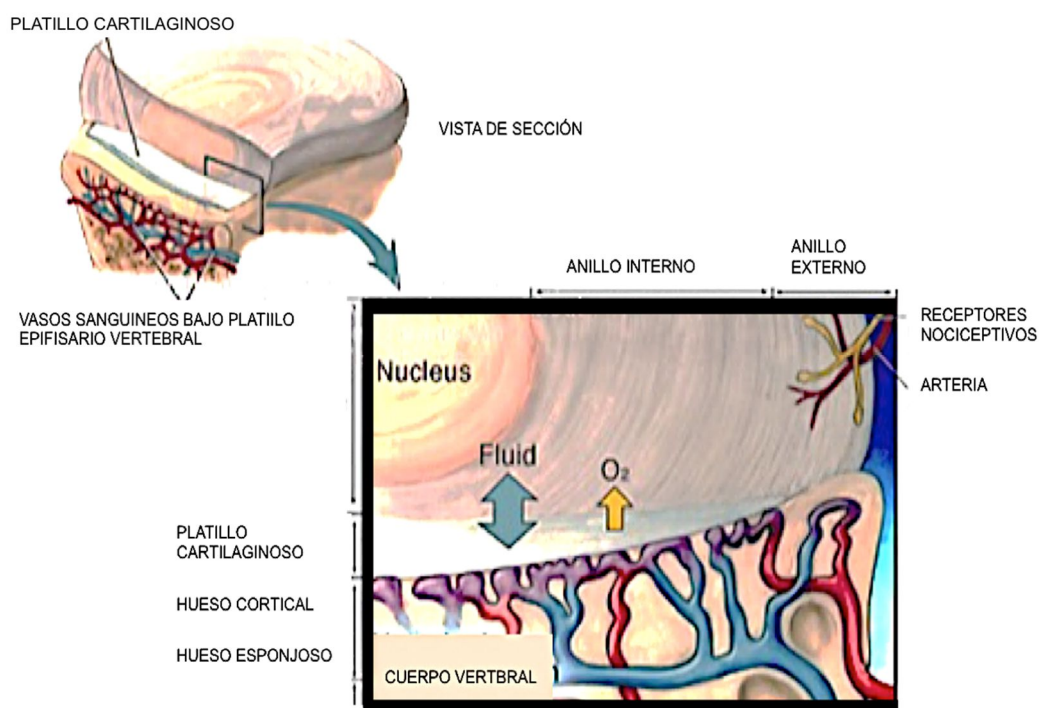


Figura 21. Plexo vasculonervioso discal

Probablemente la explicación de la sintomatología en la degeneración discal pase por comprender cómo y por qué se estimulan de forma diferente los nociceptores en algunos pacientes y no en otras personas con los mismos cambios de imagen y los mismos cambios histológicos. Desde el punto de vista clínico, se utilizó de forma profusa la discografía como herramienta para valorar, por un lado, las fisuraciones del anillo fibroso, y clasificarlas en grados

y, por otro lado, reproducir los síntomas dolorosos del paciente y, de este modo, atribuirlos a un disco concreto. Hoy en día, la discografía ha perdido predicamento, en parte debido a sus falsos positivos y a la imposibilidad de explicar todos los focos de dolor en la espalda patológica, pero, sobre todo, debido a que se trata de una técnica invasiva con una potencialidad para producir daños a largo plazo en el disco.

(Figura 22). Es evidente que no existe hoy en día una prueba complementaria que permita obtener a la vez información estructural, funcional y clínica que pueda ser aplicada de forma rutinaria en la población.



Figura 22. Discografía

Existen guías clínicas de tratamiento del dolor lumbar y del dolor radicular que, con diferentes matices, indican en qué momento es necesario, desde el punto de vista clínico, añadir a la anamnesis y exploración clínicas un estudio de imagen como prueba complementaria. Por un lado, existen lo que se han denominado señales de alarma (o red flags en la terminología sajona) que nos ponen en alerta sobre la posibilidad de que la sintomatología lumbar pueda ser

secundaria a un proceso grave que precise un diagnóstico y tratamiento precoces, lejos de lo que es el dolor lumbar inespecífico. En caso de fiebre asociada al dolor, dolor de características no mecánicas, pérdida de peso no explicable, antecedentes de patología tumoral maligna, consumidores de drogas por vía parenteral, pacientes en tratamiento con esteroides crónicos a altas dosis, antecedentes de osteoporosis, antecedente de traumatismo de moderada-alta energía o déficit neurológico a la exploración debemos pensar en patologías infecciosas, tumorales o fracturas y solicitaremos las pruebas pertinentes para llegar al diagnóstico. Se sabe que el dolor lumbar inespecífico es poco frecuente en menores de 20 años, igualmente, en mayores de 50 años, la probabilidad de que el dolor lumbar sea síntoma de un proceso primario más grave es más frecuente, por lo que en estos grupos de edad también debemos ser más vigilantes y descartar posibles patologías asociadas. (Figura 23). Sin embargo, en la mayoría de los casos el dolor a nivel de la columna vertebral, tanto cervical como dorsal o lumbar se engloba dentro del llamado dolor axial inespecífico, incluso aunque los estudios de imagen demuestren cambios degenerativos.

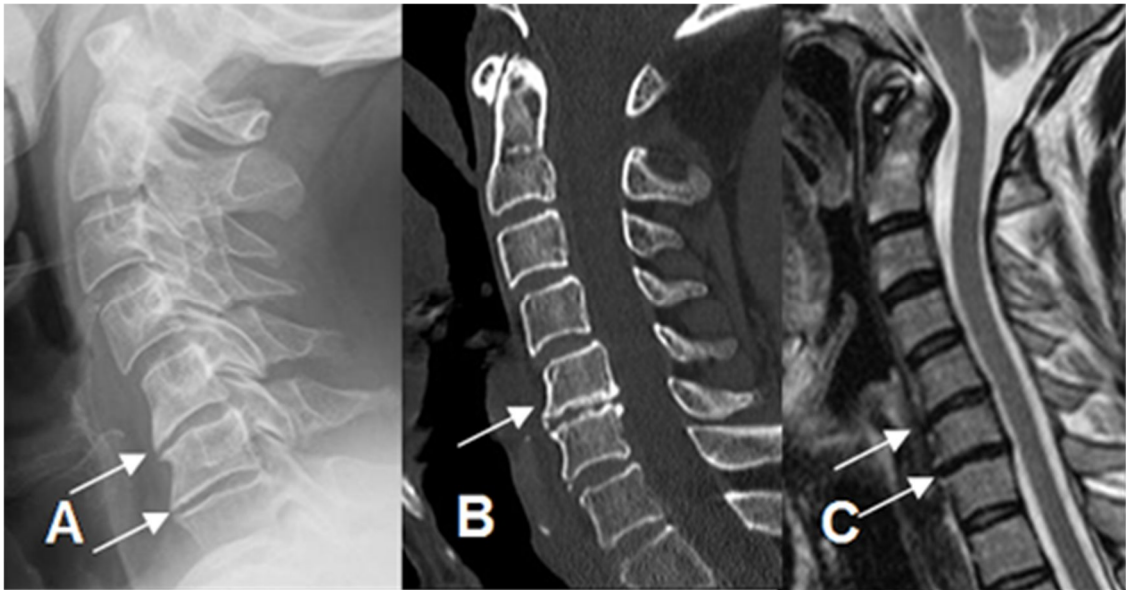


Figura 23. Disminución de los espacios intervertebrales, proceso degenerativo
A: Rx lateral
B: TAC reconstrucción sagital
C: RM sagital en T2

En la clínica, el estudio inicial que se debe solicitar ante un paciente con síntomas de patología de columna vertebral es la radiografía simple, pese a que es una tecnología con más de cien años de antigüedad, en muchos casos puede ser la única prueba necesaria para confirmar un diagnóstico clínico. En otros casos sigue siendo una prueba fundamental para orientar sobre la necesidad de realizar pruebas complementarias más sofisticadas. En casos más incipientes de degeneración de la columna vertebral, la radiología simple puede ser insuficiente para llegar a un diagnóstico etiológico, es sabido que los cambios degenerativos iniciales empiezan con la deshidratación del disco, la fisuración del anillo fibroso y la eventual salida de contenido discal al canal vertebral, no se apreciarán cambios en el estudio radiológico hasta que el disco no empiece a perder altura o hasta que empiecen a aparecer los cambios reactivos a nivel óseo, como los osteofitos o la esclerosis subcondral.

La resonancia magnética nuclear (RMN) es, hoy por hoy una herramienta muy útil para evaluar la estructura interna de los discos intervertebrales de forma incruenta. Permite detectar cambios en la estructura discal y en los platillos vertebrales antes que la radiología. Da información sobre la morfología, pero también, sobre los cambios bioquímicos del interior del disco. En las secuencias potenciadas en T2 se visualiza con bastante claridad cualquier aumento en la proporción de agua de un tejido, dentro del disco, la disminución de la señal en T2, con el consiguiente oscurecimiento de este, indica una disminución en la capacidad de los proteoglicanos para retener agua. Dentro del espesor del anillo fibroso se pueden identificar las fisuras como aumentos de señal en T2 debido a que se introduce líquido hiperintenso donde antes había tejido fibroso pobre en agua y, por tanto, hipointenso en T2, formando las lesiones HIZ (High Intensity Zone). Hasta qué punto estos cambios de señal en las imágenes se corresponden con los síntomas que refieren los pacientes sigue siendo motivo de debate (Figura 24).

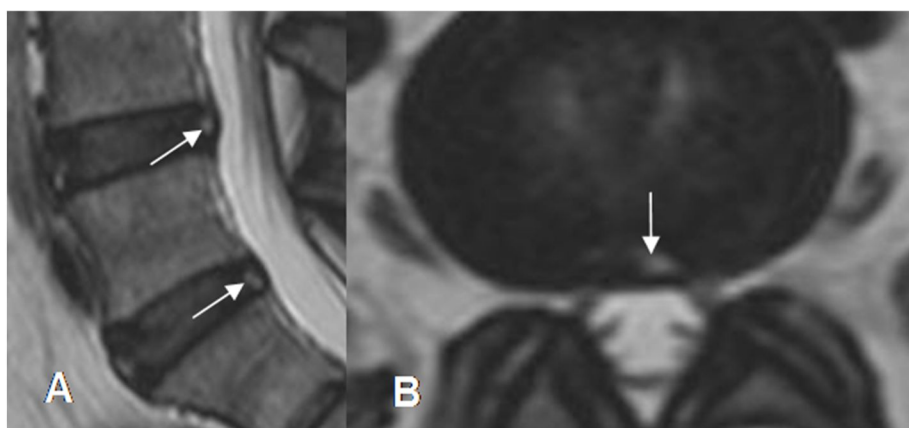


Figura 24. Fisura anular. Lesión HIZ

Otras imágenes típicas de la degeneración discal son los fenómenos de vacío, en los que se observa gas (nitrógeno) dentro del disco, generalmente se visualizan con mayor nitidez en las radiografías simples o en la tomografía axial (TAC), implican grados muy avanzados de degeneración discal (Figura 25).

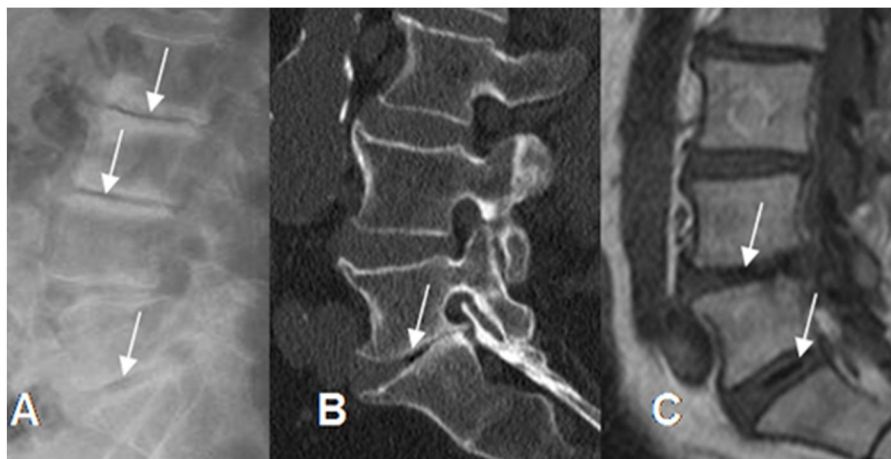


Figura 25. Presencia de aire dentro de los discos, por proceso degenerativo
A: Rx lateral
B: TAC reconstrucción sagital
C: RM sagital en T1

Del mismo modo en que aparecen cambios de señal en los discos intervertebrales, Modic y cols. ^[47] describieron una serie de cambios en las RMN a nivel de los platillos vertebrales. Estos cambios de señal pueden ser de tres tipos. En el tipo I de Modic (Figura 26) se observa una disminución de la señal (hipointensidad) en las secuencias potenciadas en T1 y un aumento de señal en las secuencias potenciadas en T2 indicando un aumento de líquido (edema o aumento de vascularización) en la médula ósea vertebral que, normalmente, tiene una señal más parecida a la grasa. En el tipo II de Modic es se observa hiperintensidad en la secuencia T1 mientras que en la secuencia T2

la señal es isointensa o levemente hiperintensa, traduciendo una sustitución de la médula ósea roja y el tejido fibrovascular que proliferó en el primer estadio hacia una degeneración grasa (Figura 27). En el tipo III de Modic (Figura 28), el tejido graso evoluciona hacia un tejido fibroso y escleroso, bastante inerte biológicamente y con escaso contenido de agua, por lo que la señal será hipointensa en las dos secuencias de la RMN.



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

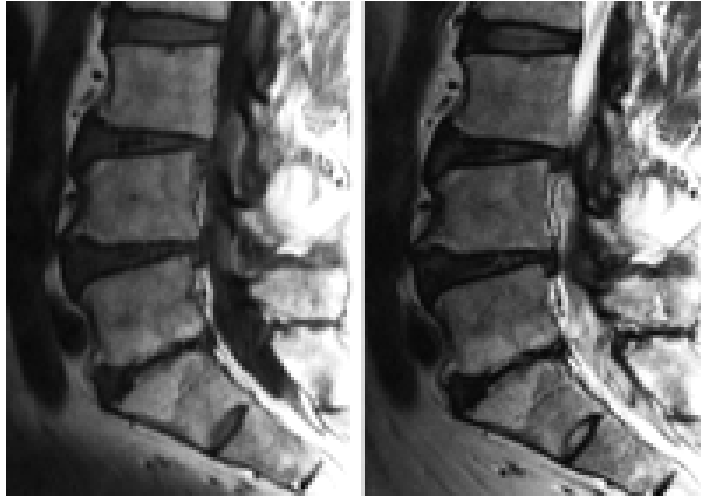


Figura 27. Cambios Modic tipo II. Imagen hiperintensa en T1 e isointensa o ligeramente hiperintensa en T2

Las imágenes normales en RMN se han descrito como ausencia de cambios de Modic u, ocasionalmente por algunos autores, haciendo hincapié en la naturaleza evolutiva del proceso, como Modic tipo 0 [48].

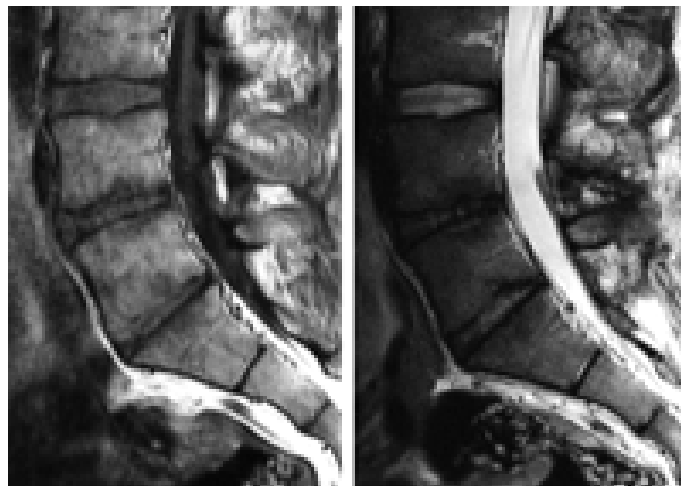


Figura 28. Cambios Modic Tipo III, hipointensa tanto en T1 y T2

En el entorno clínico existen diversas maniobras, como la percusión apofisaria, la reproducción del dolor con la flexión forzada de la columna o las técnicas de provocación con discografía para intentar dilucidar, con mayor o menor

sensibilidad el posible origen discogénico del dolor lumbar, habida cuenta de que ninguno de los cambios de señal que hemos descrito, tanto en RMN como en radiografías, tienen una correlación perfecta con la presencia de dolor axial. Sabemos que, por debajo de 40 años, hasta un 25% de los individuos asintomáticos presentan alteraciones que se consideran patológicas en sus discos vertebrales, el porcentaje aumenta con la edad, por encima de 70 años, el 80% de la población asintomática presenta cambios patológicos.

1.2.3.1 Correlación entre mecánica y biología

Se han citado en el apartado 1.2 sobre la degeneración del disco las teorías que pretendía explicar el inicio de la cascada degenerativa. Todas ellas ponían el punto de arranque en el componente mecánico, para explicar toda la cascada de eventos posterior, cerrando el círculo en la interdependencia entre disco, por delante, y articulaciones facetarias por detrás. Estos estudios adolecían de un enfoque demasiado mecanicista, que no explica por qué, ante influencias ambientales similares, unos pacientes presentan diferentes grados de degeneración que otros, y no hablemos ya de las diferencias en cuanto a la sintomatología. También se ha citado cómo la carga genética de cada persona juega un papel determinante en cuanto al futuro de su columna vertebral, sin obviar la influencia ambiental.

El mérito actual a la hora de interpretar la sintomatología dolorosa que refieren los pacientes a nivel de la columna vertebral está en saber identificar la estructura anatómica que está enviando la señal dolorosa. Hemos apuntado previamente que no existe una correlación exacta entre los hallazgos en las

pruebas de imagen y la presencia de dolor en un paciente. Probablemente, el disco intervertebral, a través de la inervación del anillo periférico sea un importante foco de generación de dolor, hecho lógico si tenemos en cuenta que es la principal estructura sometida a esfuerzos y cargas mecánicas. Sabemos también que las articulaciones facetarias posteriores, que son articulaciones sinoviales, sufren una degeneración de tipo artrósico con los años, y es harto conocido la asociación entre artrosis y dolor en estas y otras articulaciones similares del cuerpo.

Hay trabajos a nivel de articulaciones cigoapofisarias cervicales, realizados con aceptable calidad metodológica en pacientes con lesiones por latigazo cervical que apoyan la participación de las facetas posteriores en la génesis del dolor de columna. Concretamente en un trabajo sobre 68 casos que referían cervicalgia y cefalea tras un traumatismo cervical se observó que los bloqueos anestésicos proporcionaban un alivio sintomático significativo ^[49].

Evolucionar desde la teoría mecanicista hacia una teoría más integradora que comprenda y explique los factores genéticos y biológicos que influyen en la génesis de la degeneración y del dolor es el primer requisito para dar el salto cualitativo de los tratamientos actuales, que son fundamentalmente sintomáticos, a otros tipos de tratamiento con una finalidad realmente curativa.

1.2.3.2 El proceso enzimático de la degeneración de la matriz extracelular

En el disco intervertebral no degenerativo, las enzimas participan en el metabolismo normal, degradando matriz para que posteriormente sea

regenerada. Las catepsinas D y L, las metaloproteasas (MMP tipos 1, 2, 3, 7, 8, 9 y 13) beneficiosas para la biología del disco en condiciones fisiológicas, se convierten en un perjuicio cuando las condiciones del microambiente discal se modifican. Las catepsinas, activas en medio ácido, se inactivan con pH superiores a 7,2, mientras que las MMPs y las agreganasas funcionan mejor en ambientes cercanos al pH neutro.

1.2.3.3 Características mecánicas en el disco degenerado

En condiciones fisiológicas, la distribución de tensiones a través del disco intervertebral hacia la superficie del platillo vertebral se produce de forma homogénea, independientemente de que la fuerza aplicada sea excéntrica o no, La siguiente imagen (figura 29) representa de forma muy clara como, cuando el disco intervertebral se encuentra degenerado, se produce una asimetría en las presiones que reciben los platillos vertebrales. Esta asimetría va a producir unos cambios estructurales progresivos en las placas epifisarias, con esclerosis en las zonas de mayor concentración de esfuerzos, lo que afectará a la permeación del hueso por vasos sanguíneos y, por tanto, a la difusión de nutrientes y al mantenimiento de la homeostasis dentro de la matriz extracelular discal, además, la formación de osteofitos que elongarán y deformarán los ligamentos intervertebrales en un intento de recuperar la estabilidad perdida, facilitará la aparición de dolor. ^[50].

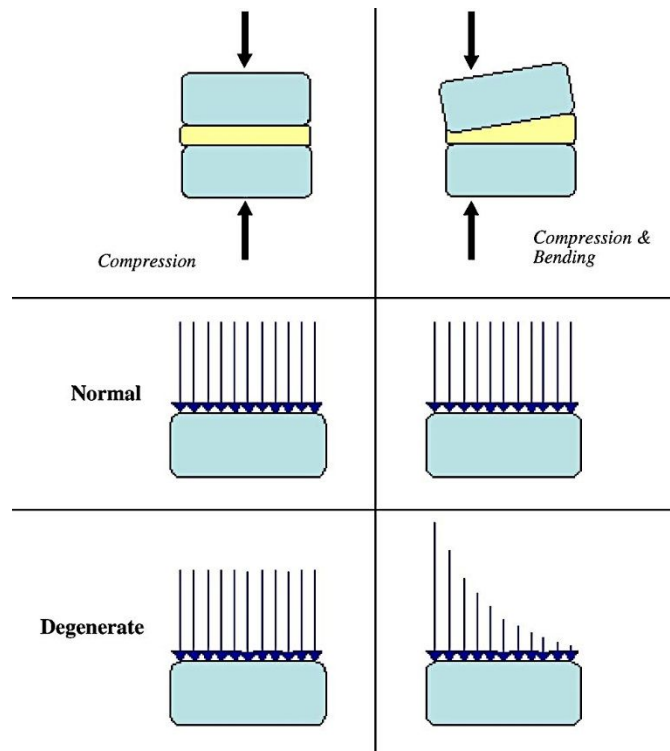


Figura 29. Diferencias en la distribución de las cargas excéntricas entre discos sanos y discos degenerados.

El efecto de la asimetría en la distribución de cargas se va amplificando como en un círculo vicioso, la asimetría de los esfuerzos mecánicos produce cambios morfológicos que facilitan la degeneración y esta va modelando las estructuras mecánicas de forma que cada vez es mayor la asimetría en la distribución de cargas en el disco. En algún momento de este proceso, la desestructuración funcional del disco hace que el problema “salte” a las articulares posteriores, iniciándose la degeneración de éstas, y convirtiendo el problema en global en el segmento de movilidad Existen estudios mecánicos experimentales que ponen de manifiesto estas afirmaciones ^[51].

La teoría de la secuencia de degeneración más aceptada empieza, por tanto en el disco intervertebral y sigue con las carillas articulares posteriores, es esta

una teoría puramente mecanicista, seguramente incompleta, que no explica los casos, que los hay, en que observamos primero signos degenerativos a nivel de las carillas posteriores, con escasos, o nulos cambios de señal radiológica, en el disco intervertebral, importa recalcar en este punto la palabra “radiológica”, ya que estamos asumiendo la competencia mecánica de una estructura en función de la imagen, único método no invasivo de que disponemos actualmente. No sabemos, en la actualidad, cuánta degeneración a nivel molecular y enzimático es necesaria para que empiecen a aparecer cambios de señal en las pruebas de imagen, debemos, pues, aceptar, que pueden existir inestabilidades incipientes que no podemos detectar.

La evolución natural de la enfermedad degenerativa de la columna vertebral pasa por una fase de inestabilidad, más o menos evidente radiológicamente, pero muy evidente clínicamente, para acabar en la anquilosis cuando se pierde la mayor parte de la matriz discal y la formación de osteofitos limita la movilidad de las articulares posteriores.

Poder relacionar cada alteración morfológica, valorable por las pruebas de imagen, con cada síntoma que refieren los pacientes es un motivo de interés en los estudios sobre la degeneración discal, ya que es la base para dirigir el tratamiento al origen del problema ^[52].

1.2.3.4. Alteraciones morfológicas asociadas a la degeneración del disco intervertebral

La desestructuración de la matriz extracelular produce una disminución de la capacidad del disco intervertebral para retener agua, disminuye su turgencia y su capacidad para mantener la altura discal, con lo que se pierde la tensión en los ligamentos y el anillo fibroso, que en cierto modo se “arrugan” ensanchándose lateralmente. Ambas, la pérdida de altura y el abombamiento de los discos producen una disminución progresiva del calibre de los forámenes de conjunción y del diámetro del canal vertebral que genera una compresión de las delicadas estructuras nerviosas que discurren por esos puntos. Está estudiado (Figura 30) que disminuciones del calibre del foramen por debajo de 15mm pueden producir una compresión sintomática de las raíces nerviosas que se manifieste como un dolor ciático de características neuropáticas, diferente del dolor axial que hemos discutido anteriormente, producido por la activación de los nociceptores de las cápsulas articulares y el anillo fibroso periférico del disco intervertebral ^[53].

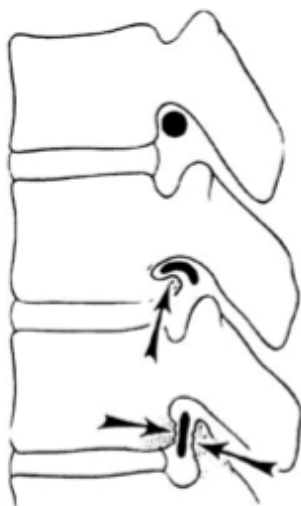


Figura 30. Disminución de altura y formación de osteofitos produciendo estenosis foraminal.

Además de la matriz extracelular del interior del disco intervertebral, también el anillo fibroso periférico puede sufrir y sufre degeneración en forma de desgarros y fisuras entre las distintas capas de fibras que lo conforman. 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. Hay descritos tres tipos de lesiones del anillo fibroso: los desgarros radiales, que se localizan principalmente en el anillo fibroso posterior, son los que se observan con mayor frecuencia en la discopatía. Los desgarros circunferenciales, pueden ser secundarios a fuerzas de cizallamiento entre las capas del anillo y se observan principalmente en discos más envejecidos. Y los desgarros del borde periférico, se localizan habitualmente en la parte anterior y se han relacionado probablemente con traumatismos.

Hay modelos experimentales que demuestran la progresión de las roturas del anillo una vez iniciadas en determinadas condiciones de presión y osmolaridad, de forma parecida a como una fisura en un cristal de un coche puede progresar en determinadas condiciones de presión, vibración o cambio de temperatura [54].

1.2.4 La degeneración de las facetas articulares

Se ha comentado con anterioridad al hablar de la degeneración del disco intervertebral, como ésta influye negativamente en la función de las articulaciones facetarias posteriores, induciendo cambios en las mismas que derivarán en la conocida y temida artrosis facetaria. Se insinuó entonces que existen pacientes en los que aparentemente se objetiva en las pruebas de

imagen una degradación de las articulares posteriores mayor de la esperable para los cambios que se observan en el disco intervertebral según la hipótesis de que la cascada degenerativa se inicia en el disco y, sólo secundariamente, afecta a las carillas articulares posteriores. Sabemos que el disco intervertebral soporta el 80% de las cargas axiales que se generan en condiciones fisiológicas en la columna vertebral, mientras que la columna posterior soporta el 20% restante de las cargas, sin embargo, si hablamos de esfuerzos rotacionales, las carillas articulares posteriores son un fundamental elemento estabilizador, como se ha demostrado en estudios experimentales en cadáveres ^[51] y en animales ^[55]. Se ha concluido que las carillas articulares posteriores protegen al disco intervertebral de los esfuerzos de cizallamiento rotacionales.

No nos cuestionamos, por tanto, que las facetas articulares son un elemento imprescindible para la estabilidad del segmento de movimiento.

Cerramos así el círculo que relaciona disco y articulares posteriores en la génesis de la degeneración del segmento de movimiento, una vez cerrado, resulta difícil encontrar el punto de inicio de la secuencia degenerativa, si es que hay uno solo.

1.3 Estudio de las causas de la degeneración discal

Gracias a la aparición y desarrollo de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se ha podido avanzar en el estudio de la degeneración discal de forma no invasiva, cuando anteriormente sólo se podía estudiar directamente los discos

intervertebrales a partir de biopsias de cadáveres o muestras de pacientes con discopatía degenerativa. Otras técnicas de imagen, como la mielografía, la TAC o la Rx no daban información suficiente sobre las alteraciones en la estructura interna del disco intervertebral. Desde el punto de vista de la pura sintomatología es difícil estudiar el comportamiento del disco degenerado en tanto en cuanto sabemos que los síntomas lumbares pueden deberse a la afectación de múltiples estructuras, todas ellas con potencial para producir señales nociceptivas. Conocemos con cierta precisión la secuencia de rotura del anillo discal, creemos tener ordenados cronológicamente y estratificados por gravedad los distintos cambios de señal en el interior del disco intervertebral ^[56], y los relacionamos con los cambios en la composición de los proteoglicanos de la matriz extracelular discal, y relacionamos estos cambios con el porcentaje de hidratación del disco. Empezamos a saber, además las condiciones fisicoquímicas de la matriz extracelular, y los cambios en la expresión de ciertas enzimas que suponemos influyen en el metabolismo de dicha matriz. Nos falta terminar de completar el mapa de cómo las enzimas se alteran y por qué, y de cómo el equilibrio, o la ausencia de éste, influyen en la degeneración discal. No somos precisos, sin embargo, a la hora de relacionar los cambios de imagen con los síntomas de los pacientes, lo que denota que la precisión de las pruebas de imagen para detectar los cambios bioquímicos dentro del disco tiene sus límites, al menos en la actualidad.

A la hora de diseñar modelos experimentales de degeneración discal para estudiar las causas de esta y su evolución natural nos hallamos ante la dificultad de encontrar un modelo animal accesible en el que reproducir las

circunstancias que se dan en el ser humano. En los humanos, la notocorda degenera durante el desarrollo embrionario, dando paso a la aparición de los segmentos vertebrales y quedando confinada, en forma de núcleos pulposos, al interior de los discos intervertebrales, donde permanecen viables células hasta la segunda década de la vida, pero, generalmente, no más allá. De hecho, la persistencia de estas células en el adulto puede originar tumores agresivos localmente como son los cordomas. En roedores, tradicional animal de laboratorio, persisten células notocordales en la edad adulta. Hay además diferencias en la estructura de los platillos vertebrales, que en humanos forman una placa de crecimiento de la vértebra y son de mayor grosor que en otros animales que tienen sus núcleos de crecimiento vertebral en el interior del cuerpo.

En cualquier tejido, la degeneración ocurre a partir de un desequilibrio entre factores anabólicos y factores catabólicos. Esta pérdida de la homeostasis tiene, evidentemente un hecho precipitante, que no siempre es conocido y una serie de factores que la perpetúan. En el disco intervertebral, la secuencia de degeneración empieza probablemente en la segunda década de la vida, mucho antes, desde luego, de que se empiecen a observar cambios en las pruebas de imagen disponibles hoy en día, y mucho antes incluso de que empiecen a aparecer los primeros síntomas.

Uno de los primeros sucesos detectados en el disco es la pérdida de las células notocordales grandes, abundantes en la infancia pero que prácticamente están ausentes en la edad adulta. Se cree que este cambio es

quizá el inicio de la cascada de la degeneración tisular. Sabemos que existen factores solubles de las células de la notocorda que disminuyen la expresión de genes de mediadores inflamatorios en el anillo fibroso y este hallazgo sugiere que la apoptosis de las células notocordales puede hacer desaparecer a su vez un regulador necesario para la salud del disco [57].

Dentro del disco intervertebral ocurren fenómenos de necrosis y de apoptosis (necrosis celular programada), que modifican la composición celular del mismo a lo largo de la vida del individuo. Se consideran muchos estímulos diferentes como generadores de este proceso celular, entre ellos el relacionado con el sistema ligando-Fas. La muerte celular rápida se produce cuando una célula portadora del receptor Fas contacta con una célula portadora de un ligando-Fas. Si bien es verdad que no se ha detectado que el receptor Fas esté expresado en un disco normal en cantidades importantes, sí se ha visto un incremento de expresión en los discos con el aumento de edad, pero no en relación lineal con el grado de degeneración [58].

Se ha estudiado el ambiente celular y químico presente en las hernias discales, uno de los primeros hitos sintomáticos de la patología degenerativa discal. El proceso inflamatorio que se produce tras la herniación permite la reabsorción del fragmento, si bien no se conoce totalmente el papel de la apoptosis, sí se ha observado que en los fragmentos herniarios predominan células con receptor FAS intramitocondrial (tipo II) sobre las células que expresan el receptor en la membrana (tipo I) [59].

Se ha postulado la posibilidad de frenar la degeneración discal intentando controlar los mecanismos de apoptosis, mediante el aporte de factores de crecimiento inhibidores de la misma ^[60].

El proceso de degeneración, en cualquier tejido y, en este caso en el disco intervertebral se produce, tras la señal activadora, gracias o por desgracia a la actividad de enzimas catabólicas mediadas por citocinas proinflamatorias, que en condiciones de anabolismo son fundamentales para mantener la homeostasis de los tejidos y la buena salud y actividad de los mismo. En condiciones de desequilibrio de dicha homeostasis, la actividad enzimática de catepsina, agrecanasas, lisozima y metaloproteasas está aumentada en los discos.

El listado de citocinas y el complejo entramado de relaciones entre ellas es otro campo apasionante en el que introducirse a conocer cómo funcionan los tejidos. Sabemos que la interleuquina 1 regula al alza la expresión de estromolisina y de la prostaglandina E2 (PGE2) a la vez que influye negativamente en la síntesis de proteoglicanos por las células de la matriz. La interleuquina 6, el factor de necrosis tumoral alfa y la propia PGE2 se han demostrado implicados en la génesis de dolor discal, lo que abre una ventana a la utilización terapéutica de inhibidores de dichas moléculas en el tratamiento sintomático del propio dolor y, quizá también, terapéutico de la degeneración discal.

Se ha visto también como los fragmentos parcialmente degradados de fibronectina de la estructura de la matriz tienen cierta actividad biológica, no mediada por enzimas, que favorecen la degradación del tejido. Sabemos que se pueden encontrar también fragmentos parcialmente degradados de colágeno y, por supuesto, proteoglicanos en los discos degenerativos.

Siendo los proteoglicanos sulfatados la principal macromolécula de la matriz discal, es lógico que el mayor conocimiento sobre la degradación del disco lo tengamos de la observación de cómo se comporta mecánicamente cuando existe la evidencia de la pérdida de estos. La disminución de la hidratación del disco produce una disminución de su volumen, lo que se evidencia, en condiciones de carga fisiológica, como una pérdida de altura y un ensanchamiento del anillo fibroso discal. Al degenerar la delimitación entre núcleo pulposo y la parte interna del anillo fibroso, que ya de por sí es imprecisa, se vuelve más borrosa, adicionalmente se pueden observar en las pruebas de imagen, las fisuraciones del espesor del anillo fibroso externo, que son la manifestación de la pérdida de cohesión de las capas de colágeno, lo que permite la infiltración por líquido del espesor del tejido, un proceso que no es exclusivo del anillo fibroso discal, sino que también está descrito, por ejemplo en las lesiones degenerativas que no contactan con la superficie articular de los meniscos de la rodilla y suponen, aquí también, la expresión de la pérdida de calidad mecánica por uso cíclico continuado de una estructura con una limitada capacidad de reparación.

1.3.1 Participación de la genética en la degeneración del disco

Contrariamente a lo que se pensaba sobre la degeneración de los discos intervertebrales, cada vez parece más evidente que el principal componente de la degeneración es la carga genética de cada individuo. Dos estudios con gemelos apuntan una influencia de los factores genéticos de hasta el 60% en el peso de la culpa de la discopatía. Está visto como la discopatía puede afectar a varios miembros de una misma familia de forma muy parecida [61]. En estudios sobre gemelos idénticos (Figura 31) cuyos factores de riesgo principales eran opuestos se observaban 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 [62].

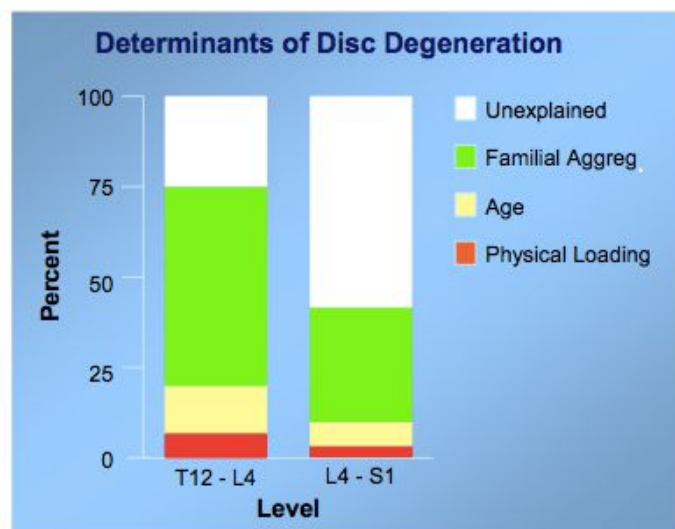


Figura 31. Peso relativo de los distintos factores que determinan la degeneración [62]

Hay identificados diversos polimorfismos génicos que se supone que están en relación con la degeneración discal. Por ejemplo, han podido observarse dos polimorfismos en el gen para el receptor de la vitamina D que parecen estar vinculados con la degeneración del disco y la aparición de hernias. Sin

embargo, 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 ^[63]. 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 mineralización del hueso, ni su densidad, probablemente la vitamina D y sus receptores cumplen más funciones en el organismo además de la del mantenimiento de la masa ósea, de hecho, ya es conocida la asociación entre masa muscular y debilidad en ancianos y el déficit de vitamina D. Además, se ha comprobado que las personas con un polimorfismo en el gen para el agregano o en la región activadora del gen MMP3 tienen mayor riesgo de sufrir una degeneración discal precoz ^[64]. Otros factores genéticos pueden influir en la degeneración, 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 mecánica del disco. El colágeno de tipo XI es un componente poco abundante de las fibrillas de colágeno, pero también está presente en el anillo fibroso y el núcleo pulposo de los discos ^[65]. Otros alelos, como el del gen de la interleuquina 6 se han relacionado el dolor de origen discal y la ciática, como ya se ha comentado ^[66].

Aunque falte mucho por conocer y más aún por definir el peso específico que tiene cada gen y cada alteración, mutación o polimorfismo, en la génesis de la

degeneración discal, no queda duda ya de que la constitución genética de cada individuo influye importantemente en el desarrollo de la patología del segmento de movilidad de causa degenerativa.

1.3.2 Factores ambientales en la degeneración discal

Tradicionalmente se consideró que los principales culpables de la degeneración discal eran los factores ambientales. Se postuló la sobrecarga mecánica en forma de sobreesfuerzos en trabajadores con altas demandas físicas como causante. También se postuló el esfuerzo cíclico en forma de impactos repetitivos como los que ocurren en conductores profesionales por las vibraciones de los vehículos en marcha, o los corredores de fondo, u otros deportes en los que haya un componente de impacto repetitivo sobre el disco. Apoyaban esta teoría las observaciones sobre la degeneración discal, que es más frecuente en los dos últimos discos lumbares y en el disco C5-6, los primeros más sometidos a carga que el resto de los discos, el disco cervical más sometido a esfuerzos de cizallamiento. Estas observaciones, sin estar faltas de cierto fundamento, no explicaban los casos, que los hay, de degeneración de discos lumbares altos en ausencia de discopatía en los niveles bajos que se observa en determinados tipos de perfil sagital. Sin embargo, no podemos negar la influencia del ambiente en la génesis de la degeneración discal. Las células del disco que son las responsables de sintetizar y mantener su matriz están sometidas a las condiciones ambientales. Hay 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, y por los

niveles de oxígeno o el pH. La respuesta a tales señales ambientales, en parte, puede estar regida por la constitución genética, pero algunas de ellas son determinantes de la viabilidad de la célula. 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 no se pueden ignorar a la hora de comprender la degeneración discal.

1.3.3 Nutrición del disco

Una de las causas fundamentales de la degeneración discal es el deterioro de los mecanismos, ya precarios de origen, en el aporte de los nutrientes recibidos por las células del disco y en la eliminación de los productos de deshecho. Al igual que todos los tipos celulares, las células del disco necesitan glucosa y oxígeno para mantener su metabolismo. Se ha comprobado *In vivo*, cuán sensibles son a las variaciones de la concentración de oxígeno y al pH del medio extracelular. Así la presencia de un pH ácido y una concentración baja de oxígeno provocan una disminución en la capacidad de síntesis de la matriz. Las células no son capaces de sobrevivir a una exposición prolongada a un pH bajo, ni a unas concentraciones bajas de glucosa. Por tanto, una disminución en la llegada de nutrientes que provoque la reducción de la pO_2 o el pH por la elevación en las concentraciones de lactato en condiciones de anaerobiosis podría influir sobre la capacidad de las células discales para sintetizar y mantener su matriz extracelular y producir la degeneración del disco. El lactato aumenta la acidez del disco de un nivel de pH de 7,2 a 6,9, pudiendo verse también estos niveles de pH tan bajos como 6,1 cuando el disco está sometido

a tensión. No obstante, el metabolismo celular óptimo para este tejido sabemos que requiere una presión de oxígeno baja, niveles de dióxido de carbono elevados y un pH ligeramente ácido, aparte de diversos factores de crecimiento, condiciones, todas ellas que debemos recrear en los medios de cultivo.

La nutrición del disco en humanos depende de la distribución de los vasos sanguíneos junto a los platillos vertebrales y en torno al anillo fibroso.

Los capilares que se originan en el cuerpo vertebral deben atravesar la lámina subcondral y acabar justo por encima de la lámina cartilaginosa, las células más internas del NP recogerán los nutrientes y el oxígeno necesarios por difusión pasiva a lo largo de 7mm de densa matriz extracelular. Es fácil entender que la esclerosis de los platillos vertebrales conllevará una disminución de la densidad de los capilares que llegan hasta la proximidad del disco y se comprometerá, por tanto, la viabilidad de las células.

Existen situaciones en las que puede favorecerse el deterioro tanto de la vascularización como de la difusión de nutrientes a parte de lo que se puede considerar como envejecimiento “fisiológico”. Por ejemplo, las vértebras sometidas a cargas excéntricas, como ocurre en las escoliosis, tienden a esclerosarse más precozmente en la zona sometida a compresión. Enfermedades o situaciones metabólicas que favorezcan la hipercoagulabilidad o las trombosis de la microcirculación afectarán indudablemente a la nutrición celular.

1.3.4 Esfuerzos mecánicos

Aunque no se ha conseguido demostrar una relación directa de causalidad entre actividad física, actividad laboral, sobreesfuerzos, esfuerzos cíclicos, vibraciones y rotaciones, es difícil pensar que no tiene ninguna influencia sobre el proceso degenerativo.

En modelos experimentales sí se ha demostrado como una sobrecarga excesiva o una lesión inducida en el disco ponen en marcha una cascada de procesos que puede acabar en la muerte celular y la degeneración discal. Como ocurre en otros lugares del organismo y se ha estudiado sobre todo en el ámbito de la medicina deportiva, las cargas por debajo del umbral de lesión producen un efecto trófico sobre los tejidos, aumentando su resistencia, sin embargo, superado un determinado umbral se producen lesiones que deberán repararse y que irán mermando la capacidad del tejido de responder a futuras sollicitaciones mecánicas.

Este modelo de lesión puede conciliar los estudios más clásicos que abogaban por la alta influencia del ambiente en la génesis de la degeneración y los más modernos que trasladan el peso de la causalidad a la constitución genética de cada individuo. Faltaría encajar un modelo que pueda explicar satisfactoriamente las discordancias que se observan clínicamente entre el grado de degeneración evidenciado en las pruebas de imagen de que disponemos y la intensidad de la sintomatología que presentan los pacientes. Sin negar la importancia de los condicionantes psicológicos y sociales, es seguro que las variaciones individuales y temporales del microambiente discal, el equilibrio, o la falta de este y la presencia o ausencia de determinados factores químicos tiene algo que decir en la explicación de las disociaciones clínico-radiológicas que se observan en la actividad clínica.

1.3.5 Tóxicos

Cualquier tóxico que afecte a la microvascularización puede favorecer la degeneración discal. El más estudiado, por razones obvias, es el tabaco. Se conoce como afecta negativamente a la cicatrización de heridas por la inhibición de la formación de nuevos vasos en el tejido de granulación. A nivel del disco se ha observado como disminuye la concentración de oxígeno y aumenta la de lactato. En estudios con RMN, sin embargo, no se ha podido corroborar, seguramente por falta de sensibilidad de la prueba, una relación fuerte entre el tabaco y la degeneración discal.

1.4 Alteraciones de la biomecánica en el disco degenerado

El comportamiento mecánico del disco intervertebral se debe a la composición de su matriz y a la organización molecular interna de la misma. Las alteraciones moleculares y celulares tendrán una expresión en el comportamiento mecánico del disco.

1.4.1 Ultraestructura discal

La matriz discal está formada por una malla tridimensional de colágeno que tiene una gran resistencia a la tensión en cualquier dirección del espacio, pero como cualquier malla laxa, no funciona en compresión. Para conseguir esta segunda cualidad mecánica, la malla de colágeno sirve de anclaje a las moléculas de agregano, con una fuerte carga electrostática negativa. Esta

carga eléctrica les permite atraer y retener moléculas de agua que son las que dan volumen y turgencia al disco, evitando su colapso al someterse a fuerzas de compresión. La interdependencia entre todos los componentes es evidente, ninguno funciona adecuadamente sin la presencia de los otros. Si la malla de colágeno pierde densidad, disminuye la cantidad de moléculas de agua que pueden anclarse y, por tanto, la cantidad de moléculas de agua que pueden ser retenidas, el resultado es una pérdida de volumen del disco, con una disminución de altura al someterse a cargas axiales, que producirá un mal funcionamiento del resto de estructuras del segmento de movilidad formado por el disco, las dos vértebras adyacentes, las articulares posteriores de las mismas, los músculos y los ligamentos.

1.4.2 Medición de la carga axial del disco

En 1992 Nachemson y cols. ^[67] fueron los primeros en determinar las cargas reales a las que está sometido un disco in vivo. Se midieron las cargas en el tercer disco lumbar en determinadas circunstancias, tomando como patrón base la posición en bipedestación se fueron realizando simulaciones de diferentes situaciones de la vida diaria para conocer cómo se cargaban los discos en cada una de ellas. 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. Se observa que incluso en decúbito el disco está sometido a presión, por el tono de la musculatura axial, aunque la misma varía en función de la postura de toda la columna y la posición de las piernas entre otros factores (Figura 32).

También se modifica la presión dentro del disco a lo largo del día, independientemente de la postura, la presión es menor al principio del día y va en aumento debido a las actividades cotidianas, También puede de sufrir incrementos muy importantes tras sobreesfuerzos de los que luego se irá recuperando de forma lenta.

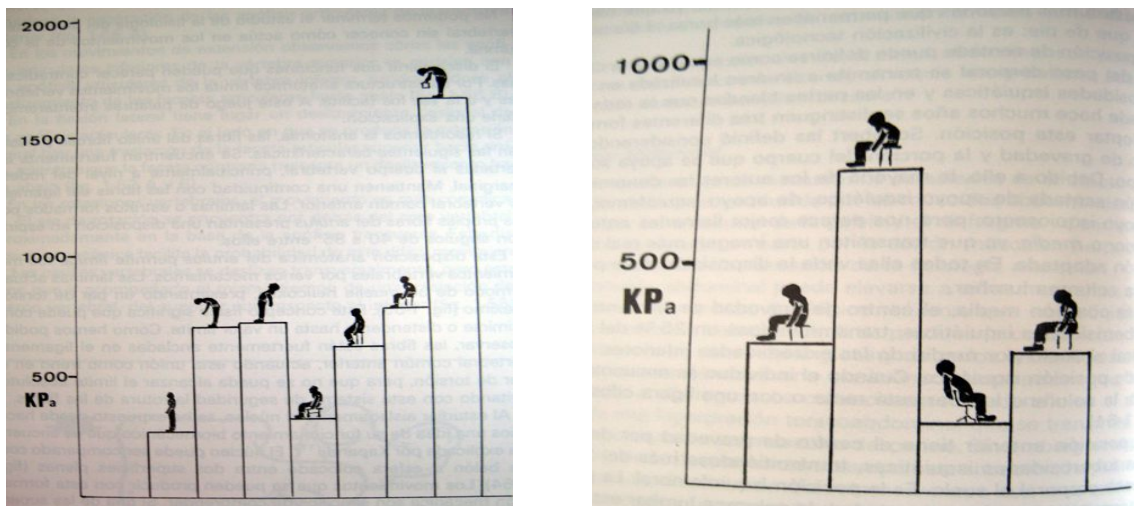


Figura 32. Presiones intradiscales en diferentes posturas (comparadas con la presión erecta en bipedestación)

Se ha dicho, de forma un tanto poética, que la lumbalgia es el peaje que debemos pagar los humanos por haber desarrollado la posición bípeda como medio de locomoción, con las ventajas que ello ha supuesto para liberar las manos, permitir otear el horizonte, alejar el cuerpo del calor del suelo y disminuir el gasto de energía en los desplazamientos largos. Realmente los cuadrúpedos no se libran de sufrir degeneración discal y lumbalgia, pero sí es verdad que el disco intervertebral del ser humano ha tenido que desarrollar un

fuerte anillo fibroso que contenga de manera estanca a la matriz extracelular cuando se somete a las cargas axiales. Tan fuerte es este anillo que soportaría cargas que están por encima incluso de la resistencia del hueso donde se ancla. Pese a esto, el anillo fibroso no es indestructible. Con el tiempo aparecen fisuraciones en su espesor, que se ponen en evidencia gracias a la RMN, en la que se observa cómo el líquido infiltra los defectos de cohesión entre las capas fibrosas, dándonos los primeros indicios de degeneración.

El anillo tiene un comportamiento viscoelástico a la hora de transmitir las cargas que recibe desde el interior del disco cuando se le somete a compresiones, esta amortiguación ocurre, en el disco sano, de forma bifásica, el anillo interno, el primero en recibir los esfuerzos los disipa de forma líneal debido a su mayor elasticidad en comparación con el anillo externo, que es más rígido y se encarga de frenar los picos de presión.

Con el tiempo y el avance de la degeneración discal se producen cambios significativos en la biomecánica del disco. Los cambios en el núcleo pulposos, debidos a la pérdida de proteoglicanos grandes, producen una presión de turgencia disminuida que se traduce en una transmisión no uniforme de las tensiones sobre los tejidos de alrededor. 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, dando lugar a una hernia discal. La pérdida de la función biomecánica normal del núcleo pulposos y del anillo fibroso conduce a una sobrecarga de los platillos epifisarios, los

cuales se esclerosan y forman osteofitos periféricos en un intento vano de aumentar la superficie de carga para disminuir las presiones y también de estabilizar y disminuir la movilidad, como medio de reducir el deterioro. Es la carga, por tanto, un factor causal y también agravante de la degeneración discal.

1.4.3 Variación de la hidratación discal bajo compresión

Como se ha descrito previamente, el proteoglicano cargado negativamente ejerce una importante fuerza osmótica que tiende a atraer y retener moléculas de agua en el interior de la malla tridimensional permitiendo al disco cumplir su función de amortiguador y distribuidor de cargas dentro del segmento de movilidad. La compresión mecánica produce la expulsión del agua del interior del complejo, esto, a su vez, produce una obvia concentración de las moléculas de proteoglicano, con lo que su concentración aumenta, y, por tanto, aumenta la fuerza osmótica que tiende a retener el agua en su interior. El flujo se equilibra cuando ambas presiones, la compresión mecánica por un lado y la presión osmótica por el otro se igualan. Del mismo modo, cuando se reduce la carga axial, el disco tiende a absorber agua hasta que disminuye la presión osmótica. Con imágenes de RMN se ha comprobado como los discos pueden perder en torno a una cuarta parte de su contenido en agua a lo largo del día y recuperarla progresivamente durante el reposo en decúbito. Igualmente, los astronautas sometidos a ingravidez durante periodos prolongados sufren una hiperhidratación de sus discos intervertebrales superior a la que ocurre en condiciones de gravedad terrestre.

1.4.4 Disminución de proteoglicano

En caso de disminución de la cantidad de proteoglicano del interior del disco la capacidad osmótica del mismo disminuye, la cantidad de agua que es capaz de contener y, sobre todo, la fuerza con la que es capaz de retener dicha agua al ser sometido a cargas disminuye. Incluso con cargas fisiológicas, el disco va a perder altura y el anillo fibroso se abombará hacia la periferia, dejará de repartir las cargas de forma homogénea y las concentrará de forma anómala en determinados puntos del platillo vertebral en función de la dirección de las fuerzas, esto seguramente explica la aparición del llamado dolor de origen discogénico, por hiperestimulación del nervio sinuvertebral en el interior del cuerpo vertebral o de los mecanorreceptores de la periferia del anillo fibroso.

La interrelación de todas las estructuras que forman el segmento de movilidad empieza aquí a hacerse patente. La pérdida de altura del disco produce una sobrecarga en las articulaciones facetarias del arco posterior de las vértebras, que reaccionarán hipertrofiándose ante el aumento de esfuerzos mecánicos, la inestabilidad segmentaria producirá una hipertrofia reactiva de los ligamentos amarillos que unen las láminas de los arcos posteriores de las vértebras, estrechando ambos, ligamentos y articulares, la parte posterior y lateral del canal vertebral en el que se encuentran las estructuras neurales. Hemos empezado con un problema de magnitud ultraestructural y vamos a acabar este punto con las manifestaciones macroscópicas de la enfermedad degenerativa de la columna vertebral. Tendrán que pasar décadas de la vida del individuo para llegar de un punto al otro, pero una vez que se ha iniciado el camino, este es, hoy por hoy, imparable.

La pérdida de proteoglicano y, por tanto, la disminución de la carga negativa en el interior del disco permitirá la entrada en este de otras moléculas, macromoléculas, proteínas séricas no cargadas y citoquinas que no ocurriría en el disco sano.

La proliferación aumentada de vasos y nervios observada en el seno de los discos degenerados se ha relacionado con el dolor crónico de espalda y probablemente también sea debido a la desaparición de los proteoglicanos, pues se ha demostrado que el agregado del disco inhibe el crecimiento nervioso en su interior ^[68].

1.5 Patología del disco intervertebral

1.5.1 Hernia discal

El primer trastorno patológico que se considera al estudiar las enfermedades del segmento de movilidad es la hernia discal. En muchos casos es casi la única patología que la mayoría de la población e, incluso, gran parte de los médicos no especializados en patología vertebral, conocen. El concepto hernia hace referencia, aquí y en otras partes del cuerpo, a la salida de una estructura, o parte de ella, de la localización anatómica que le corresponde por un fallo o defecto en las estructuras que deberían contenerla en su posición natural. Según la cantidad y forma del material herniado, se distinguen cuatro grados. El “bulging” en la literatura anglosajona, que no tiene una correspondencia en la literatura española, hace referencia al “abombamiento”

sutil del anillo discal que se observa en las fases más incipientes de la deshidratación discal, es debido a la pérdida de altura del disco, sin una verdadera rotura del anillo fibroso que contiene al núcleo pulposo, por lo que, en sentido estricto, no se adaptaría a la definición antes apuntada de hernia. En segundo lugar, la protrusión, se define como una salida focal del contenido discal contenida parcialmente en la que su base en contacto con el resto de disco es más ancha que su altura. La extrusión, en tercer lugar, se define cuando el diámetro del fragmento es mayor que la zona que mantiene contacto con el disco de origen. Por último, se habla de secuestro cuando no hay ningún contacto entre el fragmento y el resto del disco nativo, los secuestrados pueden mantenerse a la altura del disco o, frecuentemente, migrar hacia caudal o hacia cefálico. (Figura 33). Generalmente las hernias se producen en la zona posterolateral del anillo fibroso, es verdad que existen protrusiones del anillo en la zona anterior y lateral, pero no producen patología neurológica, por lo que no se consideran en ningún estudio clínico sobre patología discal. Es en la zona posterolateral donde la mayor debilidad de las estructuras de contención favorece la aparición de roturas a través de las que se puede introducir el material discal hacia el canal vertebral, es, además en esta zona, coincidente con el receso lateral del canal, donde se encuentran las sensibles raíces nerviosas, que van a producir la sintomatología clásica de dolor neuropático irradiado por el territorio de distribución de la susodicha raíz. Sabemos que, en discos sanos, las fuerzas que habría que aplicar para conseguir producir una herniación de su contenido interno son muy superiores a las fisiológicas, de hecho, antes fracasaría el hueso esponjoso del cuerpo vertebral, en forma de fractura, que el anillo fibroso ante fuerzas de compresión ^[69].

Es necesario, por tanto, que exista un proceso degenerativo previo a la aparición de una hernia discal que vaya debilitando la resistencia del anillo.



Figura 33. Fases de la hernia discal

A partir de cierta edad, por el proceso natural de envejecimiento, la mayor parte de la población asintomática tiene protrusiones discales en mayor o menor grado y número en su columna vertebral, igualmente se ha comprobado en controles de imagen cómo pacientes con hernias sintomáticas que han mejorado clínicamente con tratamiento conservador siguen presentando fragmentos protruidos, e incluso secuestrados, sin por ello referir la sintomatología típica. Es por tanto evidente que la compresión mecánica de las estructuras neurales no es el único factor desencadenante de la sintomatología. En estudios en pacientes sintomáticos tratados con antagonistas del TNF- α se ha observado una disminución de la clínica radicular, lo que hace pensar que los mediadores inflamatorios producidos en

el disco en degeneración y liberados al espacio epidural pueden tener un papel en la génesis de la radiculopatía. [70,71,72]

Otros trabajos no apoyan la utilización de antagonistas de moléculas inflamatorias en la resolución de la sintomatología. Es evidente que la cascada inflamatoria, su secuencia, el número y tipo de moléculas implicadas no son todavía conocidas en profundidad, por lo que todos los intentos hasta la fecha de modularla externamente no dejan de ser pequeños experimentos para ir aclarando la maraña y no pueden considerarse, ahora mismo, como tratamientos consolidados [73].

1.5.2 Estenosis de canal

Aunque una hernia discal produce, por definición, un compromiso de espacio en el interior del canal vertebral, el término “estenosis de canal” se reserva para un estadio más avanzado en el tiempo de la patología degenerativa. Los cambios que se producen en el disco condicionan una serie de respuestas adaptativas en el resto de las estructuras del segmento de movilidad, como ya se ha apuntado con anterioridad (Figura 34). La hipertrofia de las facetas articulares posteriores y de los ligamentos amarillos, y la aparición de osteofitos en el reborde posteroinferior de los cuerpos vertebrales, cerca de la salida de las raíces nerviosas entre el receso y el foramen van a producir una disminución del calibre del canal vertebral que es lo que se define como estenosis [74,75] (Figura 35). Clásicamente se hablaba de “hernia blanda” para los síntomas producidos por protrusiones, extrusiones o secuestros, generalmente en pacientes más jóvenes, con ciática típica, y con una cierta

tendencia favorable a la resolución con tratamiento conservador, y se hablaba de “hernia dura” para los casos que se veían en pacientes de edad más avanzada, con una sintomatología quizá menos intensa pero más persistente y que mejoraban poco o recaían con facilidad tras tratamientos conservadores, es en estos últimos donde los hallazgos se corresponden con los de la estenosis de canal.

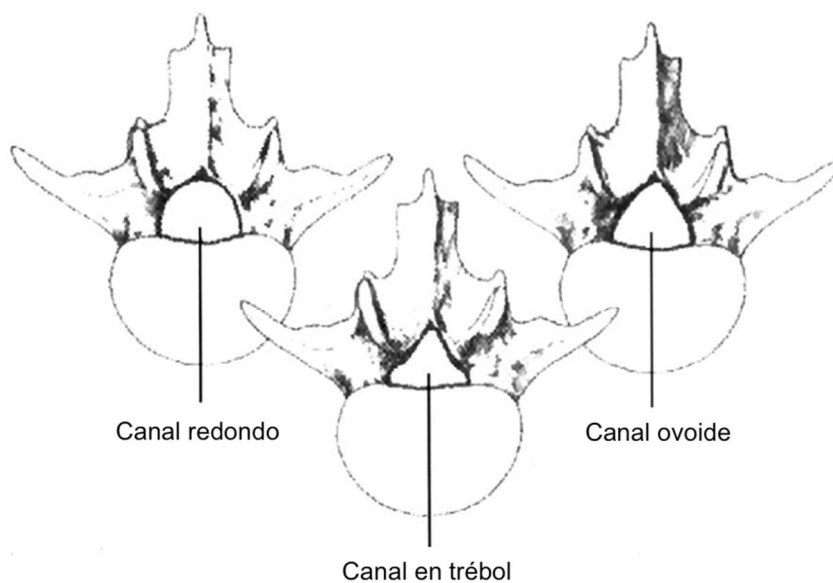


Figura 34. Tipos de canales lumbares. Imagen tomada de: Rothman RH, Simone FA, eds. The spine. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 832

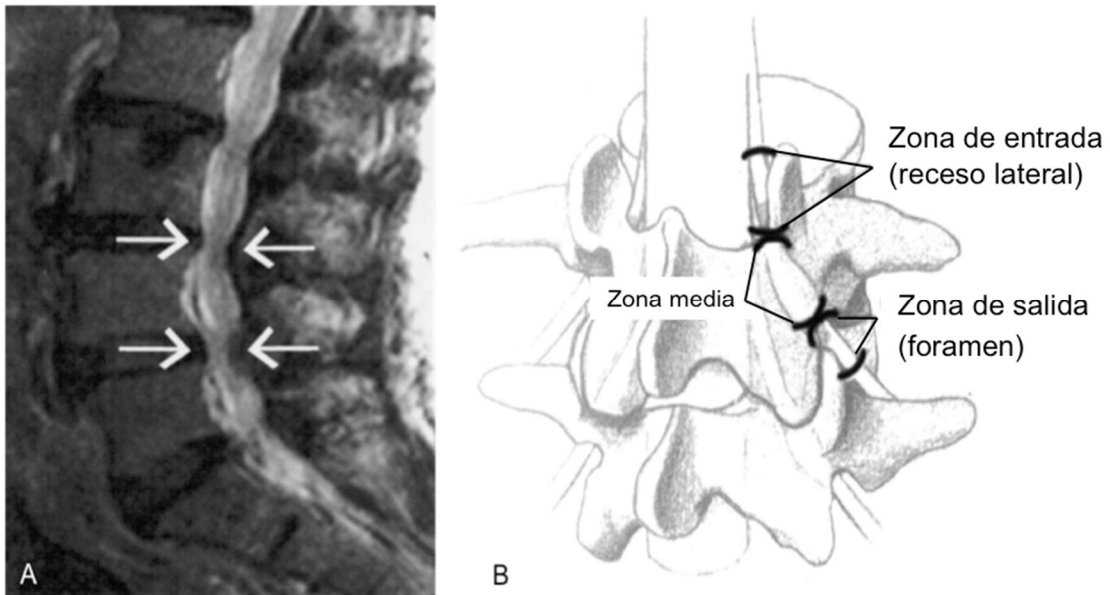


Figura 35. A: Estenosis central. B: Las tres zonas de estenosis lateral. Imagen tomada de: Rothman RH, Simone FA, eds. *The spine*. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 832.

1.5.3 Deformidad de la columna vertebral

La columna vertebral presenta cuatro curvas fisiológicas en el plano sagital, dos lordosis, la cervical y la lumbar y dos cifosis, la dorsal y la sacra. No presenta, en condiciones normales ninguna curva en el plano coronal. La Sociedad para el Estudio de la Escoliosis (SRS, por sus siglas en inglés), define la escoliosis como una rotación de los cuerpos vertebrales en el plano axial que produce una curvatura superior a 10° en el plano coronal medida por el método de Cobb, que mide el ángulo que forman entre sí los platillos vertebrales superiores de las dos vértebras más inclinadas de la curva (Figura 36). Existe una escoliosis degenerativa asociada a la edad, en la que paciente, previamente normales, empiezan a desarrollar una angulación progresiva de su columna, casi siempre lumbar o toracolumbar, por fracaso de las estructuras de soporte, tanto los discos como los ligamentos y la musculatura. Aunque la

escoliosis degenerativa está aumentando en importancia debido al aumento de la esperanza de vida de la población y a las mayores demandas funcionales de los pacientes de la tercera edad actuales con respecto a los de hace unas décadas, el hecho es que la mayoría de las escoliosis aparecen en pacientes jóvenes. Existen causas congénitas de escoliosis cuando hay fallos de formación o de segmentación de las estructuras que forman la columna vertebral durante el desarrollo embrionario. Hay causas neuromusculares como la parálisis cerebral, el mielomeningocele, las distrofias musculares o la ataxia de Friedrich que pueden producir deformidades. Existen enfermedades del colágeno como el Marfan o el Ehler-Danlos que pueden producir también deformidades, también en enfermedades de las placas de crecimiento óseo, como las osteocondrodistrofias cursan con deformidad de la columna vertebral. La escoliosis que nos ha interesado para la realización de este trabajo, sin embargo, es la escoliosis idiopática del adolescente. Se trata esta entidad de una forma relativamente frecuente de escoliosis (hasta un 3% de la población cumple criterios para ser diagnosticada) aunque en raros casos precisa tratamiento, es claramente más prevalente en el sexo femenino y, como idiopática que es, no se ha relacionado con ningún defecto ni anomalía conocidos. Nos interesa, por tanto, porque los discos de los pacientes jóvenes con escoliosis no presentan, hasta donde conocemos, ninguna anomalía, son, por tanto, estos pacientes una fuente idónea para obtener discos normales aprovechando el momento en que van a ser sometidos a cirugía para la corrección de su deformidad.

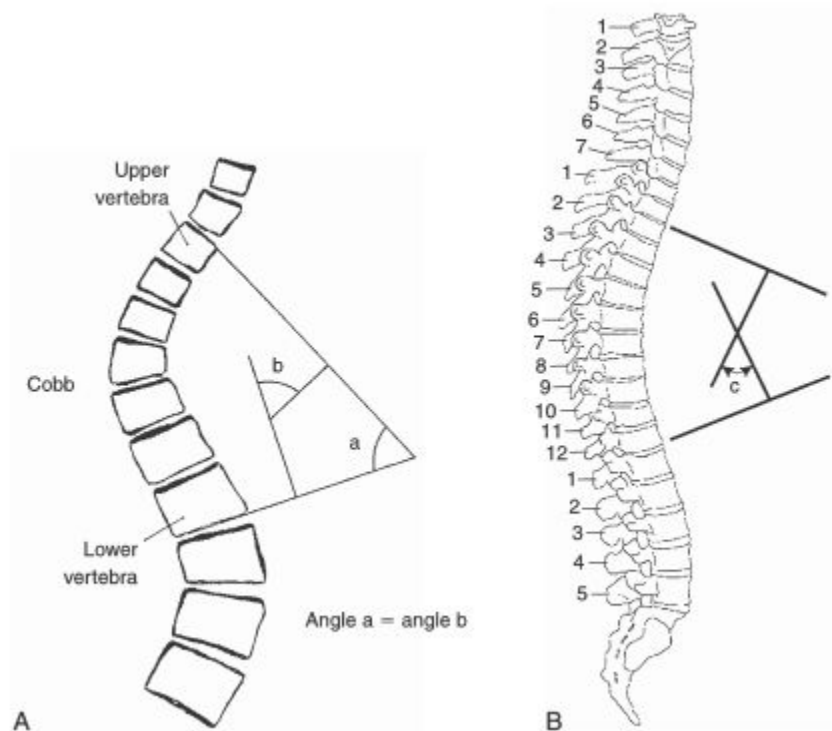


Figura 36. Método de Cobb. Tomado de Katz DS. Radiology Secrets. Philadelphia: Hanley & Belfus; 1998.

Sí sabemos que los discos escolióticos están sometidos a cargas asimétricas, sobre todo en el ápex de la curva y ya se apuntó previamente la relación entre este tipo de esfuerzos mecánicos y la degeneración discal. Con el tiempo, los platillos vertebrales de las vértebras escolióticas van desarrollando una esclerosis ósea mayor en el lado sometido a compresión, lo que sabemos que afecta negativamente a la difusión de nutrientes y favorece la degeneración precoz de los discos [76,77].

1.6 Opciones de tratamiento de la patología discal

1.6.1 Evolución de los tratamientos

Actualmente los tratamientos más eficaces y contrastados para el tratamiento de la patología dolorosa de la columna vertebral tienen un enfoque puramente mecanicista. Hemos descrito cómo la pérdida de propiedades mecánicas del disco afecta al funcionamiento también mecánico de las facetas articulares posteriores y cómo esta inestabilidad produce una hipertrofia de articulares y de ligamentos y una formación de osteofitos en los rebordes óseos de las vértebras, todo lo cual produce una estenosis macroscópica del canal vertebral por el que discurren las raíces nerviosas, y cómo esta compresión física de las raíces produce fenómenos isquémicos en las mismas que desencadenan dolor, también hemos apuntado que hay casos en los que la degeneración empieza en la articulación diartrodial facetaria antes que en el disco, sin embargo, hace décadas que sabemos que hay mecanismos ultramoleculares relacionados con la difusión de nutrientes, con la biología de las células que habitan el disco con la formación y renovación de la matriz extracelular, que influyen en la degeneración discal. Pese a todo este conocimiento, en la actualidad todos los protocolos de tratamiento que ofrecemos a los pacientes acaban en un punto, la eliminación de las estructuras problema y su sustitución por implantes, bien móviles como es el caso de las prótesis, bien fijos, como es el caso de las artrodesis. La liberación de moléculas proinflamatorias como ocurre en la hernia discal se soluciona, bien esperando con tratamientos analgésicos, bien eliminando el fragmento discal mediante un procedimiento que obliga a lesionar

los ligamentos amarillos, las láminas del arco vertebral posterior y la musculatura suprayacente.

Esta visión mecanicista del problema está llegando a su límite de sofisticación con los modernos abordajes mínimamente invasivos, la endoscopia y los navegadores, pero el resultado final es el mismo, la anulación de una estructura biológica y su función o el intento de sustitución por un burdo aparato mecánico que a duras penas remeda la exquisitez del original al que intenta suplantar. Está claro que el salto cualitativo en el tratamiento de la patología discal no va a darse en el campo de la biomecánica, sino en el campo de la biología. Tendremos que aprender más sobre los mecanismos moleculares de la degeneración discal, y aprender a modularlos. Habrá igualmente que comprender los mecanismos de reparación celular que existen ya en el organismo, entender por qué y cuando dejan de funcionar y tratar de manejarlos.

1.6.1.1 Manejo conservador

El tratamiento conservador de cualquier paciente que aparece en consulta refiriendo dolor engloba todas las medidas no invasivas o poco invasivas. Incluye este tratamiento a los fármacos analgésicos y antiinflamatorios, medidas físicas como el reposo relativo, la readaptación de actividades, la inmovilización parcial con fajas u ortesis y las intervenciones fisioterápicas, todo con el objetivo de disminuir el dolor, recuperar la función previa y evitar la cronificación de los síntomas.

Para el tratamiento farmacológico, la OMS ^[78] definió hace décadas la escalera analgésica a seguir para el tratamiento sintomático del dolor. Aunque discutida en la actualidad, sigue siendo válida en sus principios básicos, que son tratar proporcionalmente a la intensidad de los síntomas con los menores efectos secundarios posibles. En patología de columna es donde más se han estudiado todas las vías de producción del dolor y se propugna más la utilización de medicaciones, como los neurolépticos, los antidepresivos tricíclicos y los inhibidores de la recaptación de noradrenalina y serotonina para influir sobre las vías gabaérgica y serotoninérgica implicadas en la formación del estímulo doloroso y actuar, de este modo como tratamientos coadyuvantes a los clásicos inhibidores de prostaglandinas y opiáceos.

La fisioterapia, entendida en el sentido amplio de reeducación, restricción funcional e inmovilización en la fase más aguda del dolor para progresar a ejercicios que permitan la potenciación muscular para proteger al segmento de movilidad de la inestabilidad cuando la sintomatología lo permita.

Dentro de las medidas poco invasivas se están especializando en la actualidad las unidades del dolor clínicas en la realización de procedimientos dirigidos, mediante control de imagen, bien sea ecografía o fluoroscopia, a depositar fármacos antiinflamatorios de tipo corticoideo directamente junto a la estructura causante del dolor, bien sea una faceta articular, bien sea una raíz nerviosa. Otras medidas invasivas incluyen la destrucción térmica de terminaciones sensitivas mediante estímulos de radiofrecuencia, con el objetivo de producir un alivio sintomático que durará el tiempo que tarda la terminación sensitiva en

regenerarse, en la esperanza de que se haya resuelto el proceso inflamatorio en ese tiempo.

1.6.1.2 Cirugías conservadoras

El epígrafe de este apartado, a caballo entre dos conceptos aparentemente excluyentes, hace referencia a aquellos procedimientos quirúrgicos, por tanto invasivos, en los que se pretende conservar la función del segmento de movilidad, actuando solamente contra la estructura problemática. Es cierto que, por desgracia, siempre se va a tener que sacrificar, a parte de la estructura lesionada, alguna otra, como es el caso de la discectomía o la microdiscectomía que, invariablemente nos va a obligar a reseca el ligamento amarillo de un lado para acceder al fragmento herniado. Actualmente se está consiguiendo realizar incluso descompresiones de canal central mediante técnicas endoscópicas, que permiten conservar la función, no solo de las articulares, cosa que ya se realizaba con técnicas abiertas, sino que se produce una mínima lesión sobre la musculatura paravertebral, que es básica para la conservación de la estabilidad del segmento.

1.6.1.3 Artrodesis

El primer caso descrito de artrodesis de columna fue publicado por Albee en 1911 utilizando un fragmento de tibia trasplantado en la columna de un paciente afectado de mal de Pott ^[79], Posteriormente la técnica se aplicó a pacientes con escoliosis ^[80]. La siguiente evolución del procedimiento ocurrió cuando se empezaron a utilizar implantes metálicos internos para mantener la

inmovilidad de los segmentos que se pretendía artrodesar, disminuyendo de este modo la incidencia de pseudoartrosis, que podía llegar hasta el 50% de casos con los antiguos tratamientos con inmovilización en lechos de escayola, sobre todo en artrodesis largas como las que se tienen que realizar en los pacientes afectados por escoliosis. Tras varios pasos intermedios, las fijaciones actuales basadas en tornillos pediculares siguen los principios iniciados por Roy-Camille en los años 60 del siglo pasado ^[81]. En estos procedimientos se empleaba para conseguir favorecer la fusión entre los segmentos móviles autoinjerto obtenido del propio paciente, método que sigue considerándose actualmente el gold standard con el que comparar otros procedimientos adyuvantes a la fusión ósea. Hoy en día se prefiere obtener aloinjerto humano de banco de huesos para evitar las complicaciones, sobre todo en cuanto a dolor residual de la zona donante y limitación de la disponibilidad que tiene el injerto autólogo. El conocimiento de que el hueso tanto homólogo como heterólogo contiene factores que favorecen la osificación se remonta a las observaciones de Senn en 1889 que empleaba hueso descalcificado con ácido clorhídrico para rellenar defectos óseos en pacientes tratados por osteomielitis, aunque el objetivo primario era realizar antisepsia en el defecto, sí observó cómo se formaba nuevo hueso en los bordes del defecto que se había rellenado. Aunque las observaciones iniciales de Senn no fueron consideradas durante décadas, observaciones posteriores reforzaron la idea de la existencia de factores osteogénicos en la matriz ósea ^[82] Posteriormente en 1978 Urist comunicó la presencia de una proteína hidrofóbica de bajo peso molecular con cualidades osteoinductoras en la matriz ósea ^[83]. En la actualidad se conocen en torno a una docena de proteínas formadoras de hueso (BMP por sus siglas

en inglés), todas pertenecientes a la familia de supergenes de TGF-beta, de ellas, las más activas probablemente sean la BMP-2, la BMP-3 (osteogenina) y la BMP-7 (osteogenic protein 1 u OP-1).

1.6.1.4 Artrodesis anteriores y circunferenciales

El abordaje posterior a la columna permite, de una forma segura, corregir deformidades como la escoliosis, las listesis y las cifosis, también permite un acceso a las estructuras neurales para liberarlas en el caso de hernias discales, estenosis centrales, estenosis foraminales, quistes o tumores intracanal. Sin embargo, la zona posterior es el peor lecho para conseguir una artrodesis. La zona posterior de la columna trabaja generalmente sometida a fuerzas mecánicas predominantemente de distracción y sabemos que para estimular la fusión ósea y favorecer la integración del injerto es preferible el estímulo de las cargas en compresión. Adicionalmente, una resección amplia de los elementos posteriores, como la que se realiza en las descompresiones de canal por estenosis o una discontinuidad previa de los elementos posteriores, como la que ocurre en las listesis ístmicas, deja una superficie de contacto para la fusión realmente pequeña. Igualmente se ha defendido que, si el disco intervertebral degenerado es un generador de dolor, la artrodesis posterior sola no elimina completamente la micromovilidad y la transmisión de cargas a través del disco y sería debería ser complementada con actuaciones a ese nivel para conseguir un mejor resultado clínico ^[84]. Estas limitaciones han llevado al desarrollo de técnicas de fusión que han buscado aprovechar, de una u otra manera, la columna anterior del segmento de movilidad, esto es, el propio cuerpo vertebral. Los cuerpos vertebrales contienen el mayor volumen

del hueso esponjoso del segmento de movilidad, están bien vascularizados y trabajan mecánicamente en compresión, por lo que reúnen las características que se necesitan para conseguir la integración del injerto óseo o la formación de nuevo hueso estimulado por factores de crecimiento. Es preciso para aprovechar este lecho de fusión eliminar el disco intervertebral que se interpone entre los dos cuerpos vertebrales, procedimiento que se puede realizar bien por vía posterior directa, tal y como describió Cloward a mediados del siglo XX, bien por vía transforaminal, más segura para evitar lesiones de las estructuras neurales, como describieron Harms y Rolinger en los años ochenta del siglo pasado ^[85]. La vía anterior directa (ALIF) mediante abordaje retroperitoneal, es una técnica contrastada, con un reparto casi equidistante entre partidarios y detractores, permite abordar el espacio discal indudablemente mejor que las vías posteriores, con lo cual se puede preparar a conciencia el lecho de fusión y levantar la altura disminuida por la degeneración del disco, sin embargo, no se tiene acceso a las estructuras neurales, por lo que no se pueden descomprimir de forma directa en caso de ser necesario. Los defensores de la técnica argumentan que, en muchos casos de estenosis incipientes o dinámicas, la descompresión indirecta que se consigue gracias a la mayor recuperación de la altura del espacio discal con esta técnica con respecto a las vías posteriores es suficiente para paliar los síntomas del paciente. En muchas ocasiones se han producido movilizaciones de los implantes antes de que se consiguiera la fusión ósea, ya que es más difícil conseguir una firme fijación primaria, lo que ha llevado a muchos cirujanos a complementar la vía anterior con fijaciones pediculares realizadas por vía posterior, generalmente percutáneas, aumentando, de este modo, los costes y

el tiempo quirúrgico. Existe un riesgo de lesionar estructuras vasculares como la cava o ramas de las arterias ilíacas, así como de lesionar el plexo simpático lumbar, por ello es considerada por muchos autores como una técnica de segunda elección, o de rescate para pacientes multioperados por otras vías. Es esta técnica, sin embargo, por razones obvias, la de elección para la colocación de prótesis discales, en las que la correcta orientación del implante, por otro lado, de tamaño considerable es fundamental, y difícilmente conseguible por las pequeñas ventanas con las que se trabaja en las vías posteriores. Igualmente, los abordajes anteriores se han propuesto para fracturas con estallido del cuerpo vertebral importante en las que se anticipa un fracaso mecánico de la columna anterior de la columna vertebral y es necesario realizar una corpectomía y una sustitución por cajas o mallas que soporten las cargas mientras se produce la fusión ósea ^[86].

1.6.1.5 Abordajes laterales

Los problemas de las vías anteriores se han querido disminuir, en el segmento lumbar, buscando abordajes laterales retroperitoneales a través del músculo psoas, de este modo no se llegan a visualizar los grandes vasos adyacentes a la parte anterior del cuerpo vertebral, nacen así las técnicas XLIF (fusión lumbar intersomática por abordaje lateral “extremo”), muy ligadas al desarrollo de instrumentales de monitorización neurofisiológica, ya que en el espesor del músculo psoas discurren los nervios del plexo lumbar que van saliendo por los forámenes de conjunción ^[87].

1.6.1.6 Artroplastia

Una enseñanza básica de la ortopedia es que una articulación debe ser móvil (entendiendo como tal un rango de movimiento que le permita desarrollar adecuadamente la función para la que está diseñada), estable (es decir, que no tenga otros movimientos diferentes de aquellos para los que fue concebida) e indolora. A diferencia de lo que ocurre en otras articulaciones del organismo, donde tratamientos que sacrifiquen la movilidad en favor de la estabilidad y la disminución de los síntomas están prácticamente proscritos, en la columna vertebral el patrón oro del tratamiento quirúrgico ha sido, y realmente sigue siendo, la artrodesis, no por capricho, sino en base a sus excelentes y previsibles resultados. Sin embargo, es obvio que los intentos para preservar movilidad son un objetivo por conseguir. La pérdida de movilidad en uno o unos pocos segmentos de la columna no supone una pérdida funcional significativa, sin embargo, se ha querido relacionar con la aparición de lesiones o la aceleración de degeneraciones preexistentes en los niveles adyacentes. La discusión sigue abierta entre los defensores de la preservación de movilidad y los que argumentan que, desde que se asume que la principal carga de la culpa en la degeneración discal la tiene la propia constitución genética de cada individuo, la sobrecarga mecánica que produce en un segmento de movilidad la artrodesis del adyacente tiene poca influencia en la degeneración de este ^[88,89]. A nivel cervical se han publicado datos muy prometedores en cuanto a función de las prótesis. Las indicaciones de artroplastia en la columna cervical son muy parecidas a las de la artrodesis, la vía de abordaje anterior es la misma que para la fusión, la colocación del implante sigue siendo muy demandante técnicamente pero relativamente abordable con una cierta experiencia, el

implante es más caro que el necesario para una artrodesis y los resultados clínicos son muy similares [90,91]. Los defensores de la artrodesis cervical argumentan que una gran parte de los buenos resultados comunicados en artroplastias corresponden a casos en los que se observa un fallo de los componentes móviles del implante, o incluso barras de fusión anterior (Figura 37) por delante del implante, por lo que estos, en realidad, está funcionando como una artrodesis.

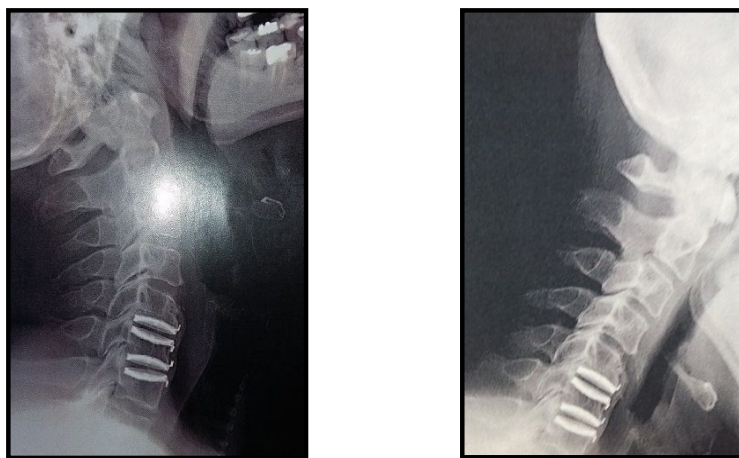


Figura 37. Prótesis discales con puente óseo anterior.

A nivel lumbar, sin embargo, las artroplastias obligan a realizar un abordaje anterior para garantizar una colocación óptima de un componente grande. Hemos hablado de los riesgos de dicho abordaje con anterioridad. Además, las indicaciones de la artroplastia, es decir, las situaciones en las que ha demostrado un beneficio para los pacientes son muy limitadas, es preciso que no haya apenas degeneración de los elementos posteriores, ni necesidad de realizar una descompresión del canal, lo que implica que el disco que se va a sustituir debe estar muy poco degenerado, esto hace que sean muy pocos los pacientes que se puedan beneficiar de una artroplastia lumbar (Figura 38).

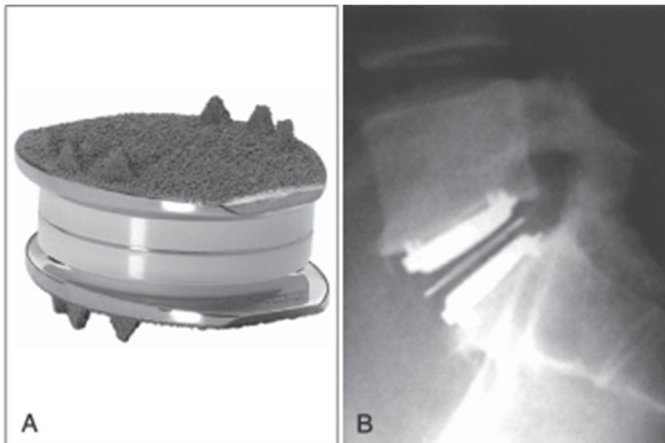


Figura 38. Protésis discal lumbar Charité III. Cortesía de De Puy Spine Inc.

Otra línea de investigación en conservación del movimiento es la que pretende sustituir el núcleo pulposo del disco intervertebral por sustancias tipo hidrogel, bien estructurados o bien preparados para polimerizar una vez implantados en el interior del disco ^[92]. Funcionan absorbiendo y liberando agua en función de las cargas a las que se ven sometidos, de modo similar a como lo hace el núcleo pulposo, por lo que presentan un comportamiento dinámico muy similar a éste ^[93]. Aunque ya se han empezado a introducir en series clínicas, todavía no se puede contar con resultados que avalen la utilización de los sustitutos de núcleo pulposo.

En resumidas cuentas, bien por indicación, bien por complejidad técnica, bien por resultados clínicos, bien por la dificultad para demostrar irrefutablemente la asociación entre artrodesis y degeneración del segmento adyacente, las artroplastias no suponen, en la actualidad un tratamiento que pueda sustituir, en la columna, a la artrodesis ^[94], como sí ha ocurrido en articulaciones como el codo, la cadera, la rodilla o el tobillo.

1.6.2 Tratamientos biológicos de los tejidos

El concepto de tratamiento biológico hace referencia a todos aquellos procedimientos encaminados a conseguir una "restitutio ad integrum" de la matriz celular del disco patológico, lo que implica permitir un adecuado desarrollo y función de las células, para lo cual es mandatorio restaurar los mecanismos de nutrición de estas, reponer de alguna manera las deficitarias y activar a las sanas para la producción de matriz extracelular. Asumiendo el disco como primer elemento que se degenera en el segmento de movilidad, su mantenimiento en óptimas condiciones de funcionamiento debe, necesariamente, influir de forma positiva en el resto de las estructuras.

1.6.2.1 terapias genéticas

Se ha planteado aprovechar las células ya existentes dentro del disco intervertebral mediante dos estrategias. Por un lado, se han estimulado dichas células con factores de crecimiento que multiplican hasta cinco veces la velocidad de síntesis de la matriz extracelular. Por otro lado, se han administrado inhibidores de las citoquinas que influyen negativamente en la síntesis de la matriz. Se ha trabajado en modelos experimentales con el factor de crecimiento BMP-7 (OP-1) y se ha comprobado cómo permite recuperar la altura del disco en un modelo lesional ^[95]. Sin embargo, los resultados son poco aplicables a la práctica clínica, ya que el efecto, tanto de los factores de crecimiento como de los inhibidores de citoquinas es pasajero y obliga a

inyecciones repetidas intradiscales para mantener la actividad de las células en los niveles que se precisa para conseguir un efecto clínico.

Si somos capaces de mantener niveles elevados de los factores que nos interesan dentro del disco de manera constante, podremos conseguir, teóricamente, el objetivo clínico. La transferencia de genes productores de las proteínas que nos interesan mediante técnicas de terapia génica pretende conseguir este objetivo. Se ha conseguido introducir el gen productor de TGF-beta en células discales de conejo y expandir, de este modo, hasta seis veces la producción. Estamos, sin embargo, lejos de su aplicación a la clínica.

Las objeciones sobre la seguridad del procedimiento y sobre la eficacia de este no se han resuelto todavía. Por un lado, es preciso conocer mejor todas las proteínas implicadas en los procesos de generación y regeneración de la matriz, por otro lado, en adultos, y más en discos degenerados, la mayoría de las células intradiscales están muertas, y es poco probable que las pocas que quedan funcionantes puedan asumir la tarea que se les encomienda por mucha estimulación que se induzca.

1.6.2.2 Regeneración de la población celular

Si avanzamos en el razonamiento, el siguiente paso para conseguir un resultado eficaz contra la degeneración discal supone introducir, junto con los genes productores de los factores de crecimiento, nuevas células similares a las existentes dentro del disco intervertebral que complementen a las preexistentes en su tarea de regenerar la matriz extracelular.

En la pretensión de regenerar el disco intervertebral se han empleado células obtenidas del interior del anillo discal de conejos, expandidas en cultivo e

implantadas en modelos experimentales de degeneración, se ha observado cómo este procedimiento permitía conservar la altura de los discos, pero a expensas de producir una especie de tejido hialino en vez del tejido original. Es por tanto preciso afinar el tipo celular que se obtiene y el método de expansión en cultivo para conseguir los resultados que se pretenden. En el interior del núcleo pulposo la población celular es escasa y difícil de obtener para intentar expandirla.

Dentro del apartado de regeneración celular es preciso volver a apuntar la importancia primordial del microambiente en el que pretendemos implantar células, genes y factores de crecimiento. La disminución de la capacidad de difusión de nutrientes en los platillos, debida a la esclerosis del hueso subcondral y a la precaria vascularización de la zona, son problemas capitales que se deben tener en cuenta para poder avanzar en el terreno de la regeneración tisular.

1.7. Ingeniería tisular

1.7.1. Definición

La ingeniería tisular es el conjunto de procedimientos que utilizan combinadamente 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 para restaurar, mantener o mejorar la función tisular. La ingeniería tisular combina el aporte de células, indiferenciadas o no, que se colocan sobre

una matriz, a la cual se pueden añadir factores que aceleren su proliferación y diferenciación 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 suelen combinar con un molde para reproducir la estructura tridimensional del tejido que deben reemplazar.

Los objetivos del procedimiento son: conseguir una cantidad suficiente de tejido y células, conseguir la diferenciación hacia el fenotipo correcto, mantener dicha diferenciación, conseguir la organización tridimensional correcta del tejido, mantener dicha organización y producir la matriz extracelular en cantidad y calidad adecuadas. Mediante moldes reabsorbibles se consigue el andamiaje inicial hasta que las células fabrican su propia matriz y son capaces de integrarse con el tejido nativo. A partir de este momento, ya fuera del laboratorio, empiezan a entrar en juego elementos como la adecuada vascularización y los problemas de compatibilidad inmunológica del tejido donante.

Este trabajo se basa en la parte celular de la ingeniería tisular, pretendemos estudiar y conocer las células trocales multipotenciales (o CSM, células “stem” mesenquimales, del inglés Mesenchymal Stem Cells). Las CSM tienen capacidad de división, capacidad de proliferación ilimitada y capacidad de diferenciación a distintas líneas celulares mesenquimales.

Pueden migrar a diferentes partes del cuerpo e instalarse en colonias a partir de las cuales empezar a diferenciarse hacia fenotipos distintos dentro de la estirpe mesodérmica.

Se reserva, en castellano, el término pluripotencial para referirse a las células embrionarias y a las células inducidas y se emplea el término multipotencial para las células madre de los individuos tras el nacimiento.

Las CSM postnatales pueden encontrarse en lugares como la médula ósea, tejido adiposo, paredes venosas, sangre periférica, el ligamento periodontal, periostio y hueso trabecular, y en ambas caras de la placenta ^[18].

En 1968 Friedenstein et al ^[8] describieron unas células adherentes, que formaban clones, diferentes de los macrófagos y los fibroblastos, y las nombró como colony forming units-fibroblastic (CFU-Fs) estas células pueden ser aisladas del estroma de la médula ósea de los organismos nacidos.

En condiciones adecuadas, estas células pueden hacerse proliferar de forma experimental hacia diferentes tipos de tejidos conectivos adultos diferenciados, como el propio estroma medular, el cartílago hialino, el tejido fibroso, hueso y tejido adiposo.

Falta conocer cómo se integran las células en el tejido a reparar después de una lesión, cómo viajan, y bajo qué estímulos migran desde la médula ósea u otros tejidos hacia los puntos de lesión. Sabemos que se pueden aislar de sangre periférica, aunque en escasa cantidad, lo que hace lógico pensar que la

sangre es solo un medio de migración de las células, no un tejido huésped de estas. Sabemos que se pueden hallar en los distintos tejidos enumerados previamente a cualquier edad, aunque en menor cantidad en los individuos más añosos que en los más jóvenes. Falta terminar el mapa de factores de crecimiento que modulan la migración, división y diferenciación de las células multipotenciales.

En este trabajo veremos como las células multipotenciales presentan ciertas características diferenciales entre sí dependiendo del lugar y circunstancia donde han sido obtenidas, aunque conservan una morfología y un inmunofenotipo similares, incluso después de varios pases de cultivo.

Las células multipotenciales presentan ventajas prácticas para su utilización en experimentación, tanto desde el punto de vista de las consideraciones éticas, como por su buena disponibilidad y facilidad para ser obtenidas de distintos tejidos, en algunos casos, con relativamente poca morbilidad. Su capacidad de diferenciación es buena y se pueden obtener del mismo individuo al que se van a implantar, por lo que no generarán problemas de rechazo.

1.7.1.1. Células troncales

Las células troncales ("stem cell" en inglés) deben cumplir las siguientes condiciones ^[96]:

- Capacidad de autorrenovación o de formar durante su división al menos una copia idéntica de sí misma.

- Capacidad de diferenciación hacia una (o varias) células maduras con función especializada.
- Capacidad de proliferación a largo plazo.

En el trabajo de Till y McCulloch de 1961 sobre autotransplante de Médula ósea en ratones irradiados previamente quedó demostrada la presencia de células madre precursoras hematopoyéticas ^[97].

A partir del trabajo anterior se han ido descubriendo en la médula ósea células progenitoras de otras estirpes celulares, como es el caso de las células mesenquimales ^[98]. Si somos capaces de aislar células multipotenciales en un organismo adulto podremos emplearlas para procedimientos de regeneración tisular, es alto el interés en encontrar estos tipos celulares, y conocerlos bien, de hecho se ha observado que dentro de la multipotencialidad, hay clones ya predeterminados para diferenciarse a unas líneas celulares u otras, las MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cells) son capaces de diferenciarse hacia células de las tres capas embrionarias según describió Verfaillie ^[96, 98-102]. Los hemangioblastos se pueden diferenciar hacia células hematopoyéticas o hacia células endoteliales ^[103-106].

Las células MIAMI (human Marrow Isolated Adult Multilineage Inducible cells) o las células VSEL ^[99, 98-102] (Very Small Embryonic-Like stem cells) también presentan un gran potencial de diferenciación multilinaje. 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 este trabajo. Las CPH, son las encargadas de la regeneración del tejido hematopoyético durante toda la vida del individuo para proporcionar de forma continua las imprescindibles células sanguíneas.

El mayor desarrollo del estudio de las células mesenquimales se ha debido al interés por su papel fundamental en la hematopoyesis. Las células mesenquimales son básicas de forma indirecta también para la hematopoyesis, ya que mantienen el estroma medular, microambiente necesario para el desarrollo y correcta maduración de las células puramente hematopoyéticas, cumplen además una función inmunoreguladora ^[107] y son imprescindibles para el éxito de los trasplantes de precursores hematopoyéticos ^[108-111].

1.7.1.1.1 Identificación de los progenitores mesenquimales

Las células multipotenciales mesenquimales son una población heterogénea de aspecto fusiforme, remedando fibroblastos ^[8], inmunofenotípicamente expresan marcadores comunes a las células endoteliales, epiteliales y células musculares adultas ^[18, 112-120] y no presentan marcadores de células de estirpe hematopoyética como son el CD 14 de los monocitos, el CD 19 de los linfocitos B, el CD 34 de las células troncales hematopoyéticas y el CD 45 de los leucocitos ^[18,96,115-118,120]. La ausencia de un marcador específico conocido obliga a caracterizar las células mesenquimales multipotenciales mediante estrategias de adición y exclusión, realizando tinciones para diferentes marcadores de superficie, con todo el debate que la ausencia de criterios patognomónicos levanta en todos los campos de la investigación. Aceptamos la

caracterización cuando 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.

Aislando estas células por fraccionamiento y gradientes de densidad, se obtiene una mezcla heterogénea de células con diferentes grados y potenciales de proliferación. No obstante, para una aplicación terapéutica útil y una comprensión rigurosa de las CSM, se requiere una caracterización más precisa. En la Figura 40 se describen 16 proteínas de superficie, que permiten reconocer, por su marcaje positivo o negativo, a las CSM. La mayoría de los marcadores son positivos o negativos igualmente en CSM humanas y en ratón, aunque el problema es que no disponemos de un marcador positivo, único y característico. Kolf et al ^[121] recomiendan Stro-1, CD73 y CD106 como los marcadores con mayor especificidad.

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 39. Marcadores de superficie para CSM según Kolf et al.

Incluyendo conclusiones de otros estudios, 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. Tampoco el CD31, expresado en células endoteliales, hematopoyéticas y progenitoras, aunque hay discrepancias entre los diferentes estudios probablemente debidas a la metodología en cuanto al cultivo y el grado de diferenciación celular. Otros muchos marcadores expresados por las

CSM 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].

A falta de un trabajo que descubra un marcador específico para las células multipotenciales mesenquimales y para evitar la confusión a la hora de comparar diferentes trabajos sobre las CSM, la sociedad internacional de terapia celular (ISCT, “Internacional Society for Cellular Therapy”) ha propuesto unos criterios mínimos para definir una CSM [17].

Estos criterios son:

1. Las CSM deben tener capacidad de adherencia al plástico, 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 (HLA-DR).
3. Las CSM deben poseer capacidad de diferenciarse in vitro, hacia osteoblasto, adipocito y condroblasto.

Adicionalmente las CSM tienen la capacidad para secretar diversas citocinas, bien en condiciones basales o tras ser estimuladas. Estas citocinas son tanto factores de crecimiento hematopoyético como no hematopoyético y apoyan la

afirmación previa de que las CSM están implicadas en el desarrollo del estroma medular y, por tanto, de su propio desarrollo por mecanismos autocrinos.

También se ha identificado la presencia de receptores para citocinas y factores de crecimiento. La interacción entre los distintos factores y sus receptores induce a pensar que las CSM están implicadas de forma dinámica en el mantenimiento del microambiente celular [18,123].

1.7.1.1.2 Capacidad de diferenciación

En los primeros trabajos sobre CSM se buscaba analizar la capacidad de éstas para diferenciarse exclusivamente hacia células del tejido al cual pertenecían. Posteriormente han ido demostrando su capacidad de diferenciación hacia otras líneas [124]. Una de las formas de identificación de las CSM, es su capacidad para diferenciarse in vitro hacia hueso, grasa y cartílago [125]. También pueden diferenciarse hacia otros tejidos como tenocitos, miocitos esqueléticos y otras células del mesoderma [18, 126,127].

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

Diferenciación a osteocito:

Para la diferenciación a osteocito se requiere la presencia de β -glicerolfosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona y suero bovino fetal. Se observa

cómo las células adquieren morfología osteoblástica y expresan actividad de la fosfatasa alcalina, apareciendo incluso depósitos de calcio, que se pueden constatar tras la tinción con BCIT-NBT.

Diferenciación a adipocito:

Para producir la diferenciación hacia adipocito, las CSM se incuban con dexametasona, insulina, isobutilmetilxantina e indometacina. En el análisis morfológico se ven vacuolas lipídicas dentro de las células que se agrupan y rellenan el citoplasma al teñirlas con oil red O y se expresa el receptor PPAR gamma 2 lipoproteinlipasa y la proteína acida P2 [18, 125].

En otros estudios, se ha intentado identificar el mecanismo que regula la diferenciación de las CSM a adipocito. El PPAR gamma 2, es un activador de la diferenciación hacia adipocito e impide la diferenciación a osteoblasto [128].

Esto muestra una relación recíproca entre la osteogénesis y la adipogénesis, de modo que la diferenciación por un camino restringe la expresión de genes específicos del otro linaje [129].

Diferenciación a condrocito:

Para la diferenciación a condrocito la metodología es algo diferente a las anteriores, y más costosa, esta 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 cartilagosos específicos.

La presencia de TGF- β siempre se había considerado necesaria [130-132], pero

estudios recientes ^[133], 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 más amplio. Los estudios tanto in vitro como in vivo, demuestran que la población de células mesenquimales puede diferenciarse hacia distintos linajes. De este modo 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 ^[134].

1.7.2 Las células estromales de la médula ósea

En el individuo ya nacido, las CSM residen en 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 de soporte 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. El anillo óseo primitivo, establecido por estos osteoblastos, se erosiona por los osteoclastos 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 sinusoides, caracterizados por un flujo vascular lento y muros endoteliales permeables,

permiten la colonización del 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 y 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 y la fosfatasa alcalina a niveles elevados.

1.7.2.1. Células progenitoras mesenquimales

Friedestein et al ^[8,135-137] fueron los primeros en obtener, de manera consistente, células adherentes de médula ósea, incluyendo en este grupo heterogéneo, células troncales mesenquimales. La metodología establecida por Friedestein, que se sigue utilizando en la actualidad con alguna modificación, consistía en cultivar células provenientes de la médula ósea de individuos adultos, después retiraba todas las células en suspensión y cultivaba las que habían quedado adheridas a la caja de cultivo, inicialmente las células eran heterogéneas, pero tras varias resiembras empezaban a predominar células que crecían en forma de colonias con aspecto de fibroblasto, que denominaron unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) La frecuencia que

reportaron fue de 1 a 5 CFU-F por cada 100,000 células nucleadas de médula ósea sembradas. También se demostró su capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares y para generar el microambiente hematopoyético [138-142].

La formación de la cavidad y el estroma medulares requiere el factor de transcripción *cbfa1*, que controla la diferenciación osteogénica y conduce a la formación ósea. En la médula ósea tenemos, como si de un gran centro comercial se tratara, el órgano donde obtener dos tipos de células bien diferenciadas (HSC y SSC: hematopoyéticas y estromales), también los progenitores de múltiples tejidos. La separación entre tejido mesodérmico, tejido hematopoyético y las líneas celulares ha ido desapareciendo a medida que hemos ido descubriendo que las células aisladas como progenitoras mesenquimales se podían agrupar en colonias compactas y abiertas de aspecto fibroblastoide mientras otro tipo de células eran más pequeñas, con núcleos más intensamente teñidos y más parecidas a células epiteliales. Otros trabajos han descrito dos y tres poblaciones celulares que se pueden separar por citometría de flujo, las RS-1, que corresponden a CSM progenitoras con una elevada capacidad de proliferación, las RS-2 derivadas de las anteriores y que, a su vez, daría origen a las mMSC (células progenitoras maduras), hipótesis todavía pendiente de confirmar. En la médula ósea también podemos obtener células que podemos diferenciar para regenerar los vasos sanguíneos, el músculo esquelético y el músculo cardíaco. La capacidad 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 en la actualidad, probablemente 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 vivo.

1.7.3 El microambiente hematopoyético

Añadimos en este punto un elemento más a la red de interacciones de las células presentes en la médula ósea. Hemos hablado de la disposición tridimensional de las células, de sus interacciones físicas, de los factores de crecimiento y otras citoquinas implicadas en las interacciones químicas, es ahora el momento de hablar del andamiaje sólido que permite la función de todo lo mencionado. Este andamiaje, formado por la actividad de osteoblastos y osteoclastos, es el que permite la existencia física de las distintas poblaciones celulares, sus relaciones y el desempeño de sus funciones ^[143-145]. La formación y reabsorción de las trabéculas óseas ocurren mientras se está desarrollando la actividad hematopoyética, y es evidente pensar que no son dos sucesos ajenos entre sí. Las células que constituyen este microambiente, definidas como el nicho hematopoyético, derivan de un progenitor común de origen mesenquimal ^[143]. Para la hematopoyesis medular se han definido tres compartimentos especializados: el óseo, con los osteoblastos; el estroma

medular con células reticulares, fibroblastos, adipocitos, células endoteliales y macrófagos; y los adipocitos que constituyen el espacio no hematopoyético dentro de los huesos largos ^[107].

La idea de nicho, introducido por Schofield, es importante pues estas células no están aisladas en la médula ósea de los mamíferos. Considera este concepto 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 permitir que se diferencien para desempeñar la regeneración o repoblación de un tejido cuando sea necesario.

Las CSM se distribuyen de manera perivascular, de hecho, se ha hipotetizado su analogía con los pericitos que también se diferencian hacia condrocitos, adipocitos y osteoblastos. Se ha identificado ASMA (actina-a de músculo liso) y CD45-/CD31-/Sca-1+/Thy-1+ en los estudios de caracterización inmunohistoquímica. 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 de la pulpa dental. Algunas, no todas, de las células aisladas también expresan 3G5, un marcador celular de superficie relacionado con los pericitos. Seguramente la disposición perivascular de las CSM no es caprichosa, sino que tiene relación con su función de migrar para acudir a los lugares donde deben iniciar la regeneración de un tejido dañado.

La complejidad del microambiente medular es inmensa, se añaden, a parte de las CSM y los precursores hematopoyéticos, otros tipos celulares, como macrófagos adherentes, osteoblastos, adipocitos en gran cantidad, células endoteliales, células dendríticas, en resumen, un conjunto abigarrado de interacciones que es muy difícil de reproducir in vitro pero que es necesario conocer si queremos que nuestros cultivos celulares se comporten, proliferen y se diferencien como lo harían las células multipotenciales en condiciones naturales.

Liechty et al realizaron un trabajo implantando CSM en la cavidad peritoneal del feto de ovejas preñadas. Sacrificaban a los ejemplares a los 13 meses de nacer y estudiaban la médula ósea, el bazo, los pulmones, el timo, el músculo, el corazón, la sangre, el cartílago y el cerebro y comprobaron que contribuyen a formar células de los tejidos analizados, sin provocar una respuesta inmune [146].

Hay que tener en cuenta que la médula ósea es un ambiente con concentraciones relativamente bajas de oxígeno. Comparando las CSM humanas cultivadas en condiciones de hipoxia frente a condiciones normales (2% y 20% de oxígeno) se comprueba que su capacidad de proliferación es mayor en ambiente con baja concentración de oxígeno [147]. Las condiciones de hipoxia deben ser reproducidas, por tanto, en los medios de cultivo in vitro.

1.7.3.1 Fuentes alternativas de CSM

A medida que somos más hábiles obteniendo células multipotenciales, estamos

viendo cómo, a parte de los donantes humanos y los modelos típicos de laboratorio, como son las ratas y ratones ^[18,148], podemos obtener también células para estudio de otras especies, como ovejas, vacas, caballos, monos, cerdos ^[132,133,149,150].

La médula ósea ha sido el lecho típico de obtención de células multipotenciales, es relativamente accesible con relativa poca morbilidad y una "alta" concentración de células troncales, en torno al 0,01-0,0001% de las células nucleadas en humanos. También se han conseguido aislar CSM de extracciones de células madres de sangre periférica movilizada ^[151], muy extendido ahora mismo para obtener progenitores hematopoyéticos ^[152]. También de muestras fetales de sangre, hígado, médula, pulmón, vellosidades coriónicas, líquido amniótico ^[153-154]. 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 ^[155-158]. En este caso parecen ser células de origen fetal que curiosamente pueden persistir en el organismo durante más de 60 años ^[107].

Se han buscado células troncales en casi todas las localizaciones del organismo como pueden ser la grasa subcutánea, folículos pilosos, tejido del cuero cabelludo, ligamento periodontal y tejidos prenatales como la placenta, médula ósea fetal, sangre, pulmón, hígado o bazo ^[154, 159-162]. Algunas con evidente utilidad práctica como posible zona donante, otras con interés científico.

1.7.4 Comportamiento in vivo de las CSM

Hemos mencionado anteriormente que la razón de ser de las células troncales es probablemente el permitir la regeneración verdadera de un tejido, no la reparación por cicatrización. La utilidad de los factores que estimulan las células troncales in situ para la regeneración de un tejido depende de la dosis del factor y de su persistencia en el lugar el tiempo necesario. Las células troncales son el ingrediente crítico en la regeneración tisular, y también son la diana crítica de cualquier estrategia llamada a corregir un defecto genético.

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. Por ejemplo, las células reticulares adventicias humanas fosfatasa alcalina positivas que normalmente funcionan como elementos estructurales, 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 diferenciados, el reticular y el adipocito. Este hecho muestra una cierta plasticidad del sistema estromal de la médula ósea y lo diferencia del sistema hematopoyético. La plasticidad de los fenotipos diferenciados en el sistema estromal significa que el compromiso y la diferenciación pueden no ser tan irreversibles en condiciones fisiológicas como se ha pensado.

La fase sólida de los tejidos derivados del mesodermo 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, (membrana tipo 1, deficiente en metaloproteinasa), en el cual la remodelación del tejido conectivo está bloqueada como resultado de una degradación de la matriz, produciendo cambios adversos en el tejido mesodérmico.

Igual que no nos cuesta comprender el fenómeno de la autorrenovación de las células hematopoyéticas que forman el tejido sanguíneo, también en el tejido sólido mesodérmico ocurren fenómenos que permiten la adaptación de los distintos tipos de células entre sí, esto implica, a parte de la multipotencialidad, una capacidad de adaptación física, tridimensional, una plasticidad, en resumen, del tejido mesodérmico.

Con técnicas de chips genéticos ("DNA arrays") se pueden identificar marcadores de persistencia de la troncalidad en células mesenquimales.

También es interesante la intercomunicación de las células troncales con los lugares de lesión para posteriormente iniciar la transformación al tipo celular necesario para la renovación. Se ha visto cómo las células que expresan Stro-1 son capaces de anclarse en los tejidos estudiados y establecerse allí.

Se ha visto cómo los tejidos lesionados influyen en los comportamientos de migración y diferenciación de CSM añadidas exógenamente.

Las células de los tejidos lesionados también expresan marcadores de diferenciación, aunque esto no significa que induzcan, necesariamente, diferenciación de las CSM hacia su mismo tipo celular, por ejemplo, el contacto de CSM con condrocitos induce osteogénesis, no condrogénesis. Es evidente que el ambiente influye en la diferenciación [163].

Las CSM 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. Estas células mantienen una morfología similar e inmunofenotipo después de muchos pases. Ojeda-Uribe et al no identificaron CSM en sangre periférica después de quimioterapia o tratamiento con factores de crecimiento [164], tampoco Wexler et al demostraron CSM en el flujo vascular periférico [165]. Ni Lazarus et al consiguieron cultivar CSM de sangre periférica en pacientes tratados con quimioterapia [166].

Luria et al demostraron la existencia de precursores de fibroblastos (CFU-F) en la sangre periférica de cobayas, en una concentración entre el resto de las células nucleadas que estimaron en torno a $0.2-2 \times 10^{-5}$ [167] y Huss et al aislaron células fibroblásticas adherentes CD34- de sangre periférica del perro [168]. Zvaifler et al por su parte, estimaron que el número de CSM en sangre periférica en humanos adultos es muy bajo, entre el 0.3-0.7% de la fracción celular nucleada tras centrifugación de 500ml de sangre eran células progenitoras mesenquimales sanguíneas, es decir, de un total de células mononucleadas de 2.14×10^7 , entre 1000 y 10.000 eran precursores mesenquimales [158].

1.7.5 Procedimientos de obtención de CSM

Las CSM se pueden obtener por procedimientos relativamente sencillos como los que aprovechan su capacidad de adherirse a superficies, que fue el procedimiento empleado por Friedenstein et al. en su descubrimiento. Si separamos la fracción mononucleada de la Médula Ósea mediante soluciones de baja viscosidad y presión osmótica y alta densidad podemos seleccionar mejor las células, si lavamos las no adherentes y recolocamos en un nuevo frasco, podemos aumentar un 36% la población de células troncales.

El objetivo es conseguir la población de progenitores mesenquimales más pura posible, desechando las células hematopoyéticas. Estas últimas se pueden seleccionar negativa o positivamente mediante dos procedimientos. Por un lado, MACS (Magnetic Antibody-Coated bead Separation), marcando las células mesenquimales con anticuerpos que tienen adheridas bolitas magnéticas y aplicando un campo magnético externo para atraer a las células. Por otro lado, disponemos del FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) que separa una población de células heterogénea en función de la intensidad de fluorescencia que emiten, según los parámetros que le indiquemos a la máquina, además se pueden marcar las células deseadas con anticuerpos monoclonales con una tinción fluorescente y seleccionarlas de modo similar a como se hace con el procedimiento previo, usando, esta vez, la característica de la fluorescencia.

Métodos más agresivos, que permiten obtener mayor cantidad de células que la simple centrifugación, incluyen tratamientos enzimáticos con colagenasas para liberar las células del tejido y recogerlas posteriormente mediante lavado y

centrifugación. Procedimiento este que permite obtener células no solo de médula ósea, sino también de otros tejidos sólidos, como el hueso, grasa o cartilago. Algunos autores han apuntado que las células obtenidas por estos procedimientos son de similares características a las obtenidas por otros medios. Thomas et al ^[169] han observado que las células obtenidas por métodos enzimáticos muestran más actividad metabólica, más expresión de proteínas intracelulares y mayor producción de calcio que las obtenidas por aspirado y centrifugación.

1.7.6 Expansión y cultivo

Una de las cualidades de las células troncales es su capacidad para proliferar de forma casi ilimitada, las CSM pueden dividirse casi una veintena de ciclos sin perder su capacidad de diferenciarse. En dos o tres semanas se puede conseguir una expansión de hasta un millar de veces. La expansión va produciendo un envejecimiento gradual de las células que puede acabar en apoptosis tras un número suficiente de ciclos. Con procedimientos especiales con implantación mediante retrovirus de genes humanos de telomerasa se han conseguido hasta 260 pases sin que se pierda la capacidad de diferenciación. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los cultivos prolongados pueden favorecer la mutación tumoral. Otros riesgos a tener en cuenta cuando se pasa del laboratorio a la práctica en humanos son la transmisión de enfermedades por los sueros de cultivo y las reacciones inmunológicas.

Clásicamente se han cultivado las células en monocapas dentro de discos o frascos de poliestireno tratados especialmente para mejorar la adherencia de

vidrio, formando monocapas. Las condiciones de cultivos requieren una temperatura de 37° con una humedad relativa del 95%. El medio de cultivo se cambia a los tres días generalmente y las células se tratan con tripsina y se cambian a nuevos frascos cuando alcanzan la confluencia.

Los sistemas tridimensionales son más caros y la proliferación es más lenta y menos homogénea, sin embargo, la distribución de nutrientes, la eliminación de desechos es mejor. Las matrices que se ha empleado como andamiaje han sido el alginato, el colágeno, la fibrina, el ácido hialurónico y el quitosan.

1.7.7 Inductores de la proliferación

Para intentar acelerar la expansión celular se ha empleado incluso bajas dosis de radiación laser. Es más corriente, sin embargo, emplear FGF (Fibroblast Growth Factor), que, a parte de inducir mitosis, aumenta la expresión de 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 o también TGF- β 1.

El factor inhibidor de leucemia (LIF), los distintos 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 inhibe la diferenciación de las CSM, prolongando su viabilidad en los cultivos.

1.7.8 Morfología y comportamiento de las CSM

Morfológicamente las CSM obtenidas de la médula ósea tienen un aspecto similar a fibroblastos y son difíciles de diferenciar del resto de células de un aspirado medular. Las células estromales de la médula son un tipo celular que muestra una gran plasticidad son, muy parecidas a los pericitos retinales, las células perivasculares del sistema nervioso central. Se ha propuesto que las regiones microvasculares, pueden constituir el nicho específico donde los progenitores multipotenciales se asientan y perviven en los tejidos adultos.

Las dos principales características de las células troncales mesenquimales son la capacidad de diferenciación a múltiples líneas celulares adultas y la capacidad de adherencia al plástico, muy útil esta última en investigación para conseguir obtener purificados celulares. Las células de estirpe hematopoyética no presentan esta cualidad de adherencia, excepto los monocitos, por lo que pueden ser lavadas de una preparación. Los marcadores de superficie específicos de células mesenquimales (ya se ha adelantado previamente que no hay ningún marcador único patognomónico) y la negatividad para marcadores específicos de la línea hematopoyética terminan de describir al tipo de células que nos interesan.

Aunque inicialmente no presentan ninguna característica específica de ningún tejido adulto, las CSM son reservorios de células con una finalidad regeneradora de diversos tejidos, se conoce su tropismo por los tejidos o zonas lesionados. Estas células pueden diferenciarse hacia osteoblastos, condrocitos, miocitos, adipocitos, tenocitos y posiblemente, también células de estirpe neural.

En condiciones experimentales en sistemas cerrados en cámaras de difusión se observó cómo las células trasplantadas producían una variedad de tejidos conjuntivos, desde tejido fibroso a cartílago, hueso o adipocitos, esta observación fue la que permitió a los primeros investigadores deducir que todos los tejidos mencionados derivan de un progenitor común pluripotencial. En un sistema abierto como los experimentos con CSM implantadas bajo la cápsula renal se han desarrollado osículos quiméricos en los que las células huésped proveen la estructura y las donantes aportan la hematopoyesis.

Las condiciones de cultivo, y el tiempo de este influyen de forma sutil en el producto final que se va a conseguir tras un cultivo de células mesenquimales, 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.

Con la utilización de 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 más antiguos.

1.7.9 Comportamiento de las CSM in vitro

Gracias a los estudios in vitro se van poco a poco afinando los mecanismos que rigen la diferenciación hacia distintas líneas celulares. La capacidad de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos o tejido adiposo depende de señales moleculares concretas. La secreción de Wnts favorece diferenciación osteogénica, la falta de expresión de la telomerasa favorece la expansión celular, inhibiendo la diferenciación.

Sería ideal, para la aplicación clínica, obtener una gran cantidad de células progenitoras y poder implantarlas en un solo procedimiento, con los aspirados de médula ósea esto es poco factible, debido a la baja densidad de CSM del total de células adherentes (0,001-0,01% o, aproximadamente, 1 CSM por 105 células estromales adherentes), lo cual obliga a tiempos de cultivo de días para conseguir cantidades suficientes.

A partir de grasa subcutánea se pueden obtener células con menor dolor que de cresta ilíaca, y obtener mayor cantidad, aproximadamente 4×10^7 células/100 cm³ de los aspirados grasos frente a 1×10^5 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 disminuye o elimina los costes del cultivo [122].

1.8. Biomateriales.

Los biomateriales (BM) se emplean en las técnicas de terapia celular como estructuras de soporte para los procesos de expansión y para la implantación

de células madre en tejidos lesionados. Aportan estructura tridimensional para las células y permiten también concentrar los factores de crecimiento que se deben añadir para implementar la función y actividad de las células que van a formar los nuevos tejidos ^[170,171].

1.8.1. Fundamentos de los biomateriales

Los requisitos necesarios que debe cumplir el biomaterial ideal son la estabilidad estructural, la biodegradación y la biocompatibilidad.

Desde el punto de vista estructural, el biomaterial debe ser capaz de soportar las cargas mecánicas del tejido en el que se introduce hasta que haya cumplido su función ^[172], además debe tener una estructura microporosa que permita a las células sobrevivir e interactuar entre ellas y con el resto del tejido.

Los biomateriales deben poder degradarse una vez cumplida su función de manera lo menos lesiva para el tejido y para las células que vehicula, debe ocurrir esta degradación con una mínima o nula respuesta inflamatoria por parte del huésped. Los polímeros, por ejemplo, se degradan mediante hidrólisis pasiva, produciendo monómeros ácidos. Esta degradación dependerá, no solo del tipo de material y su volumen, sino también del tejido en el que se ha implantado, de la calidad del proceso de fabricación ^[173].

La biocompatibilidad del BM implica que no producirá una respuesta inmune ni de cuerpo extraño que interfiera con el proceso de integración en el tejido y debe suplir las funciones de la matriz extracelular nativa con la mayor precisión, ya que esto es fundamental para la correcta diferenciación de las células ^[174].

1.8.2. Características de los biomateriales

Los BM que se emplean en terapia celular pueden ser metales, cerámicas, materiales naturales o polímeros sintéticos. En algunas situaciones puede interesar combinar dos biomateriales, por ejemplo, cerámicas o materiales naturales con polímeros sintéticos ^[175]. de este modo combinamos propiedades de los distintos materiales que pueden ser interesantes para favorecer la formación de la matriz extracelular ^[176, 177].

Dentro de los materiales naturales, el colágeno tiene muchas aplicaciones dentro de las terapias celulares, es biocompatible, se degrada por lisosomas con una mínima respuesta inflamatoria, produce poca respuesta autoinmune y tiene zonas cargadas eléctricamente muy apropiadas para la adhesión de las células troncales, lo que le convierte en un buen elemento estructural para empleo en situaciones en las que no sea preciso soportar cargas mecánicas, como ocurriría, por ejemplo en los huesos de carga ^[178].

El alginato es otro BM aprobado por la FDA para su empleo en terapia celular, presenta algunas limitaciones comparado con el colágeno, pero también presenta una buena biocompatibilidad. Está compuesto por polisacáridos, a diferencia del colágeno no presenta dominios reconocedores y el grado de la estructura mecánica es limitado.

Las queratinas extraídas a partir de fibras del cabello humano han llegado a ser un prometedor BM para la terapia celular gracias a su gran biocompatibilidad, su facilidad de extracción en solución y poseer sitios de reconocimiento

molecular donde las células se pueden integrar con facilidad ^[179].

Otros materiales naturales son los obtenidos de la submucosa intestinal porcina (SIS) y de la vejiga (BSM) se ha empleado en la formación de tejido de vejiga, fascias, uretra, vasos, cartílagos y huesos ^[175]. Estos materiales han mostrado ser biocompatibles y poseen capacidad de inducir la proliferación celular.

Los polímeros sintéticos son atractivos por su disponibilidad, sus cualidades de degradación y su consistencia en la producción. Por contra, sus productos de degradación pueden alterar de forma negativa el microambiente local. Los polímeros más usados en terapia celular son el ácido poliglicólico (PGA) y el poliláctico (PLA) y copolímeros. Estos productos están ganando popularidad por su relativa facilidad de fabricación, adecuadas propiedades mecánicas y biodegradación. Estos materiales ya se estaban usando en suturas y en fármacos. El poliuretano es otro de los polímeros más usados como BM en biomedicina por su durabilidad, elasticidad, resistencia, adaptabilidad y tolerabilidad ^[180].

1.8.3. Adaptaciones de los biomateriales para la implantación

Los BM usados para la terapia celular tienen que ser adaptados, dependiendo del resultado que se desea para producir cada tipo tisular. El objetivo de la terapia celular es reparar y reemplazar el daño tisular y restituir su función. En determinadas circunstancias, la inyección simple de células es el método vehicular más sencillo y menos lesivo de implantación, pero tiene limitaciones obvias de persistencia de las células y de los factores de crecimiento en el lugar de implantación. También se pueden inyectar biomateriales con células y

factores de crecimiento implantados en ellos de forma líquida, gel o hidrogel. Para hacer más biocompatibles los BM se pueden modificar sus características físicas y/o químicas previamente a su implantación. Los procedimientos químicos tales como la oxidación, hidrólisis y queratinización, cambian la composición superficial y modifican el comportamiento de los BM [181,182].

Añadiendo moléculas bioactivas como enzimas, proteínas, secuencias peptídicas y antibióticos aumentamos las funciones a los materiales. Modificar la superficie de los BM consigue mejorar 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 la migración, proliferación y diferenciación celular. Incorporar estas moléculas dentro de los BM es otro de los avances de la terapia celular [183].

El BM ideal sería aquel que integrara las mejores propiedades mecánicas con las mejores cualidades biológicas y fisiológicas, de esta necesidad han surgido las combinaciones de productos. Lógicamente, el objetivo cambia según el tejido a imitar, en este punto, a nivel del disco intervertebral, es básico conocer su estructura interna, para reproducirla fielmente, no solo desde el punto de vista físico, sino también químico.

Se ha empleado, por ejemplo, el cultivo de condrocitos suspendidos en alginato cálcico para implantes en torno al esfínter uretral en los casos de incontinencia por insuficiencia de este, con la intención de producir un efecto masa (bulking) que mejore la continencia, en lugar del Cotigen que se usaba habitualmente

con la misma finalidad y que obligaba a inyecciones periódicas, a veces en menos de tres meses ^[184]. Posteriores desarrollos, todavía por materializar en la práctica clínica habitual van más en la línea de regenerar el propio esfínter mediante la formación de nuevos miocitos.

En el campo de la traumatología se han utilizado cultivos de condrocitos para la reparación de defectos en el cartílago hialino de articulaciones de carga vehiculados por distintos soportes para fijarlos a la zona a reparar después de una preparación adecuada del lecho de implantación, los resultados han sido variables, y se sigue buscando la forma más idónea de conseguir mantener in situ las células y favorecer su diferenciación para la formación de tejido condral organizado y no fibrocartílago, como ocurre cuando se produce una cicatrización por medios naturales o tras procedimientos quirúrgicos clásicos como las perforaciones óseas ^[185]

HIPÓTESIS DE TRABAJO

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

¿Existen células madre en el núcleo pulposos de discos intervertebrales sanos, comparables a las de la médula ósea?

¿Son las células madres del disco intervertebral sano similares a las del disco degenerativo en su capacidad de diferenciación y de expresión de marcadores?

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Para responder a la hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos.

3.1 General: Identificar en pacientes con discos intervertebrales sanos la presencia de células multipotenciales según los criterios de la ISCT.

3.2 Específicos:

1. Aislar células con características de CSM a partir de muestras de NP lumbar sano.
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 en discos patológicos en otros estudios.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño

Se realizó el estudio en un grupo de 16 pacientes sometidos a cirugía vertebral por deformidad vertebral (escoliosis idiopática del adolescente), obteniendo, previo consentimiento informado, el material extraído de un disco intervertebral que normalmente se desecha, así como 5-10 ml de aspirado de la MO de la cresta iliaca. Las muestras se procesaron por procedimientos estándar establecidos para la obtención de CSM, como nuestro grupo ha publicado previamente [22]. El material discal fue dissociado mecánica y enzimáticamente y posteriormente cultivado en medio estándar DMEM, con 10% de suero bovino fetal y al mismo tiempo se obtuvieron, procedentes del aspirado de médula ósea, células mononucleada tras centrifugación en gradiente de densidad y posterior cultivo con el mismo medio antes mencionado. Se evaluó la capacidad proliferativa in vitro de las CSM 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).

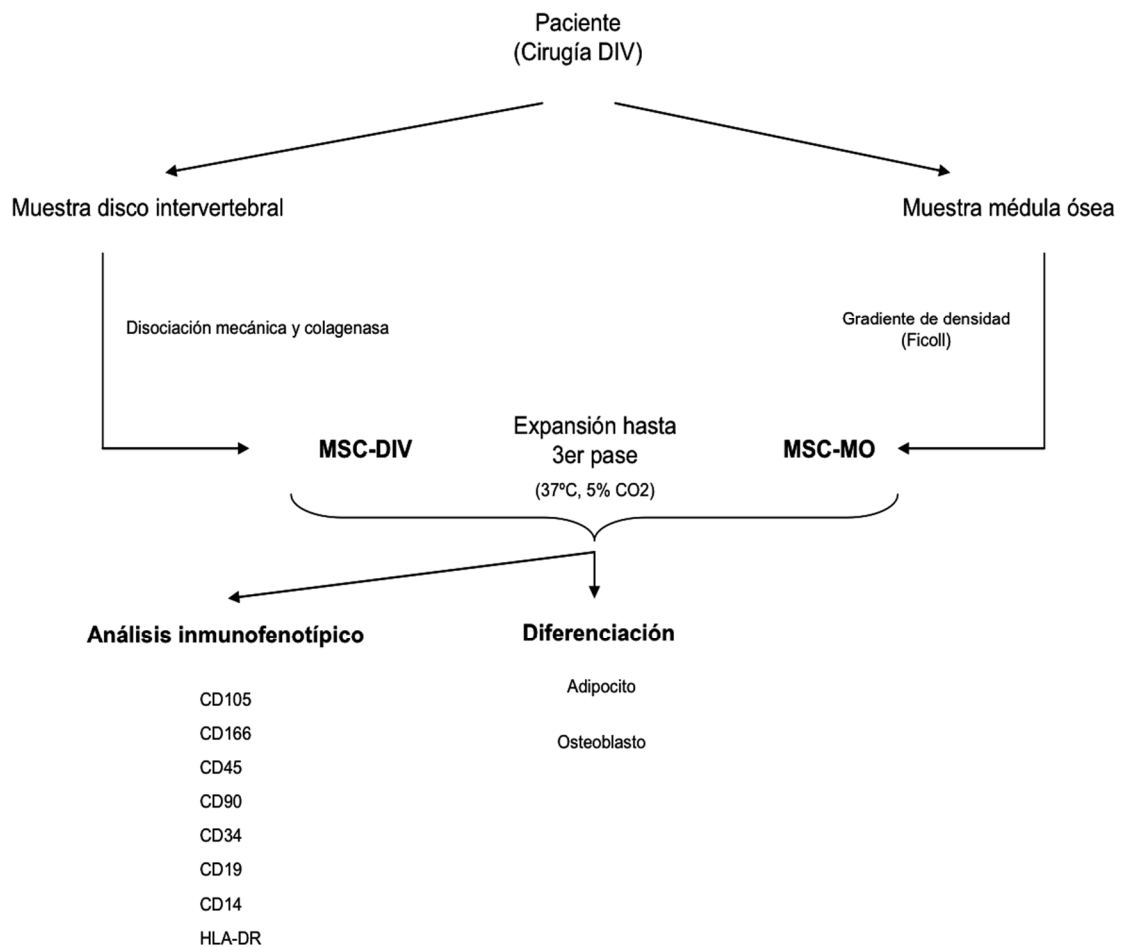


Figura 40. Diseño del estudio

4.2 Sujetos de estudio

Los pacientes incluidos en el estudio tenían edades comprendidas entre los 12 y los 35 años. Todos ellos fueron sometidos a cirugía para corregir una Escoliosis Idiopática. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron tanto en el Hospital Universitario Fundación de Alcorcón como en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. El procesamiento posterior 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 corrección

de la deformidad con una artrodesis vertebral instrumentada con aporte de auto y aloinjerto según el procedimiento estándar para esta patología. Se recogieron datos biodemográficos y clínico-radiológicos como edad, sexo, indicación quirúrgica, niveles fusionados y nivel de obtención de la muestra. Todos los discos de los que se obtuvo una muestra habían sido valorados mediante RMN según la escala de Pfirman modificada por Griffith para comprobar que se trataba de discos radiológicamente sanos ^[186] (Figura 42).

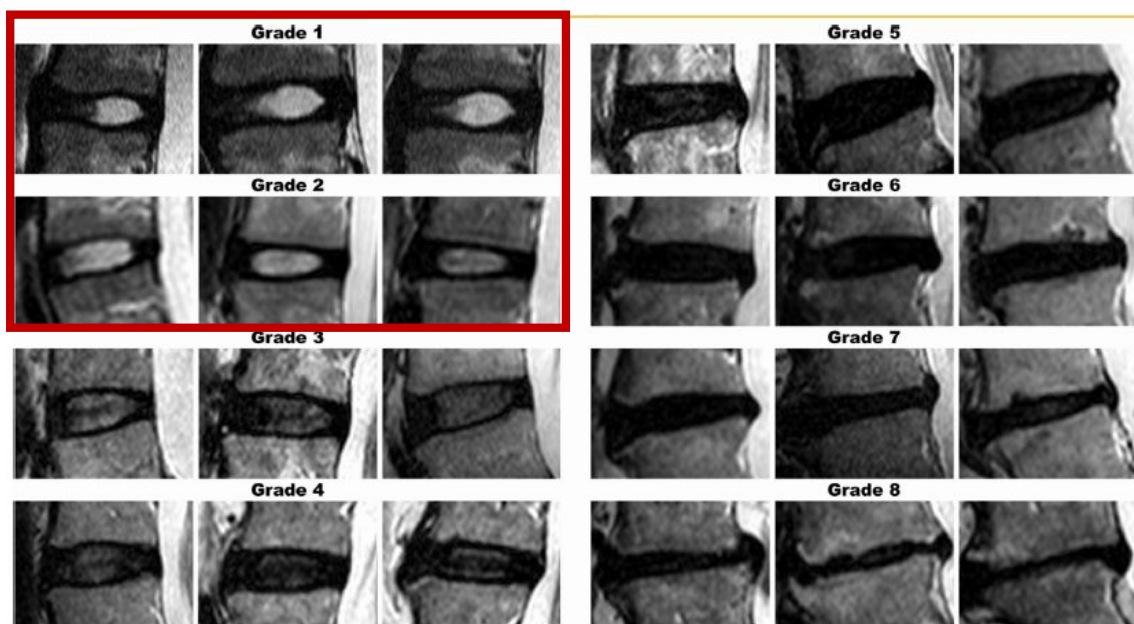


Figura 41. Morfología de los discos según la clasificación en RMN

Se excluyeron pacientes con cirugía previa, donantes de MO, pacientes que hubieran recibido quimio o radioterapia, padecido leucemia, discrasia sanguínea, patología traumática aguda, fractura pélvica, procesos tumorales activos, tratamientos con corticoides o alcoholismo. Todos los procedimientos, se hicieron bajo aprobación de los Comités Éticos de Investigación Clínica

(CEIC) de los hospitales participantes y de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2000.

La mediana de edad fue de 15.5 años (rango, 12-35) y la relación mujer/hombre fue 12/4. En la tabla siguiente se resumen los niveles intervenidos y se indican los dos casos en los que no se consiguió cultivar las muestras obtenidas (Tabla 1).

CASO	SEXO	EDAD	NIVEL	TOMA	OBSERV
1	F	14	T10-L4	L3-4	
2	F	15	T4-L4	L3-4	
3	F	16	T12-L5	L4-5	
4	V	15	T10-L3	L2-3	
5	F	15	T10-L5	L4-5	PERD
6	V	16	T3-L4	L3-4	
7	F	17	T10-L5	L4-5	PERD
8	F	14	T2-L5	L4-5	
9	V	17	T4-L3	L2-3	
10	F	35	T10-L5	L2-3	
11	F	13	T4-L4	L2-3	
12	F	16	T4-L3	L2-3	
13	F	19	T3-L4	L2-3	
14	F	14	T3-L3	L2-3	
15	V	16	T3-L3	L2-3	
16	F	12	T4-L4	L2-3	

Tabla 1. Datos recogidos de los pacientes intervenidos
F: femenino. V: varón. PER: pérdida de muestra

4.3 Desarrollo técnico

Gracias a trabajos previos del grupo en los que se habían analizado discos patológicos se tenían las bases del procedimiento de obtención, conservación, traslado y procesamiento de las muestras, ya establecidas. Se procedió a aplicar el procedimiento a nuestra serie de casos consecutivos.

1- Técnica quirúrgica:

Coordinados con el servicio de hematología y el transporte, se programan los pacientes, para realizar un procedimiento quirúrgico por día. (Figura 43), con el paciente en decúbito prono, bajo anestesia general y control de radioscopia, se realizó, en todos los casos un abordaje por vía posterior entre los niveles a artrodesar.

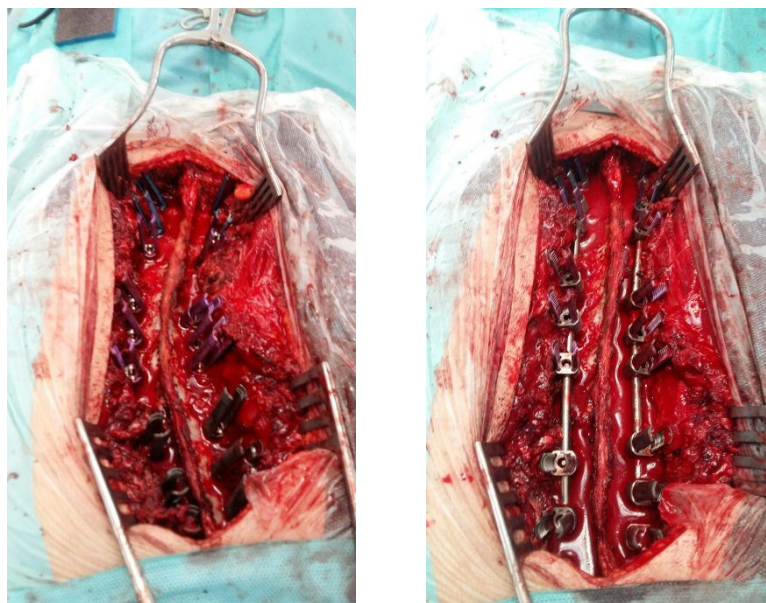


Figura 42. Intervención quirúrgica

Se extrajeron 5-10 ml de médula ósea mediante un trocar de manera percutánea de la cresta iliaca 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) (Figura 44). Todo debidamente identificado, conservado en nevera entre 4-8° hasta su llegada al laboratorio, entre 12-24 horas tras la cirugía, donde fueron procesadas como se resume más adelante.



Figura 43. Extracción de Médula ósea de cresta ilíaca posterior

2- Transporte de muestras:

Cada día de cirugía, las muestras fueron 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 fue 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 similares 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, se realizó una tripsinización y las células fueron subcultivadas hasta una densidad de 5×10^3 células/cm².

Aislamiento y expansión

Las células mononucleares (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 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 se ha conseguido que la pureza del cultivo de CSM supere 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 hasta 10^6 /cm²) en el mismo medio y en las mismas condiciones de las especificadas para las obtenidas de núcleo pulposo, hasta alcanzar también 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.

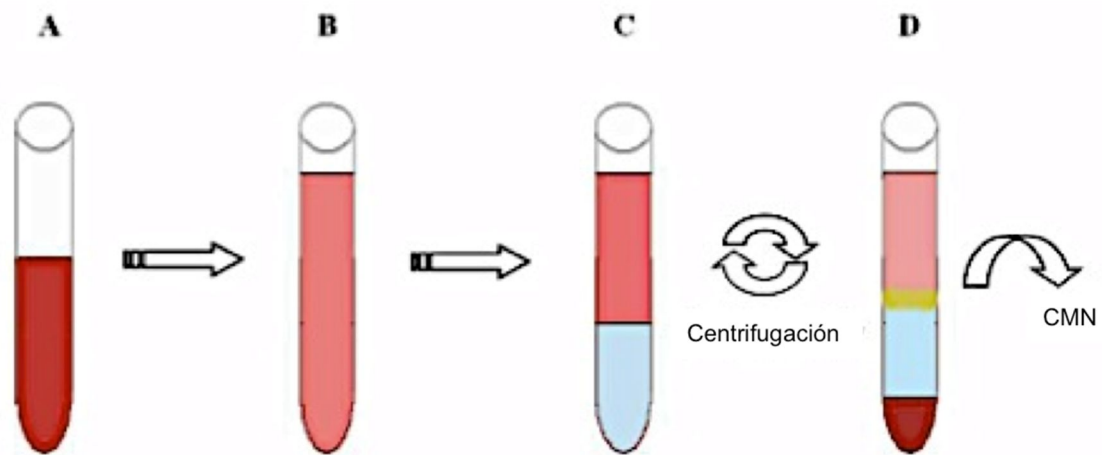


Figura 44. Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad. A) Muestra de MO. B) Dilución de la muestra con Hanks. C) Muestra diluida sobre Ficoll. D) Interfase en la que están presentes las CMN.

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 [151]. 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 alofococianina (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 isotópico

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 10⁵ 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 multilínea de CSM

Para la diferenciación a adipocito y osteoblasto, de cada muestra se sembraron cuatro placas de cultivo de 9,6 cm² de superficie del tipo “chamber slide”, a razón de 5x10³ células/ cm², 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 como control de la diferenciación a adipocito y osteocito. Todas las muestras se lavaron y prepararon para su visualización en el microscopio óptico. Se utilizó un microscopio Olympus BX41 utilizando el programa Micro DP70 controller and manager software pack.

4.4.5 Estudio genético

Puesto que las células maduras del núcleo pulposo son similares a condrocitos, se seleccionaron varios marcadores genéticos de diferenciación condrogénica para evaluar, a nivel molecular, posibles ligeras diferencias en la capacidad condrogénica entre las células troncales mesenquimales del núcleo pulposo y las de la médula ósea, y comprobar si las CSM-NP pueden presentar un estado de “prediferenciación condrogénica” o no, comparadas con las CSM-MO. Para el análisis molecular se obtuvo RNA tanto de disco intervertebral como de médula ósea empleando TriPure isolation reagent (Roche Diagnostics; Mannheim, Alemania). La transcripción inversa se realizó empleando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City,

California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de los diferentes genes se realizó utilizando el Step One Plus Real Time PCR System y Taq Man Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, California). Se emplearon los genes ABL-1 como control, ACAN-Agrecano, COL1A1- Colágeno tipo I, COL2A1- Colágeno tipo II, COMP (Cartilage oximeric matrix protein), SOX6 y SOX9.

4.4.6 Recogida y análisis de datos

La recogida de los datos a partir los cultivos valoró la 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.

4.4.7 Análisis de las 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 dicho intervalo, además de evaluar las características morfológicas de las células durante la expansión. Después de realizar 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 dicho intervalo, 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. Después de 3 pases en cultivo las CSM obtenidas de ambas fuentes se procesaron 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, de Becton-Dickinson.

Diferenciación multilínea de CSM

Se analizó su capacidad de diferenciación y se comprobó la capacidad de diferenciación multilínea (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 el programa informático 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 calcularon \pm dos desviaciones estándar. Para explorar las diferencias de cualquier variable entre CSM de disco intervertebral y CSM de médula ósea se utilizó 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 utilizó el Wilcoxon signed-rank test. Las diferencias encontradas se consideraron significativas para una $p < 0.05$.

4.4.8 Fases del proyecto

El proyecto se ha desarrollado en tres fases:

Primera fase:

Se seleccionaron los pacientes que cumplieran 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 posterior realización. En el acto quirúrgico, se extrajo el disco intervertebral sano 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 recibió las muestras y, mediante un proceso mecánico y enzimático complejo, se aislaron las células mesenquimales que posteriormente se cultivaron, estudiando la capacidad de diferenciación de estas.

Tercera fase:

En la que se incluye, el análisis estadístico de resultados, creación de tablas e imágenes, comparación de resultados y presentación de las 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 obtuvieron células mesenquimales de ambas fuentes, se procesaron en la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca. En dos casos no se consiguió cultivar células de las muestras obtenidas, probablemente por algún fallo en la cadena de transporte y conservación. 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 exhibían 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 donde se aprecia que las

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

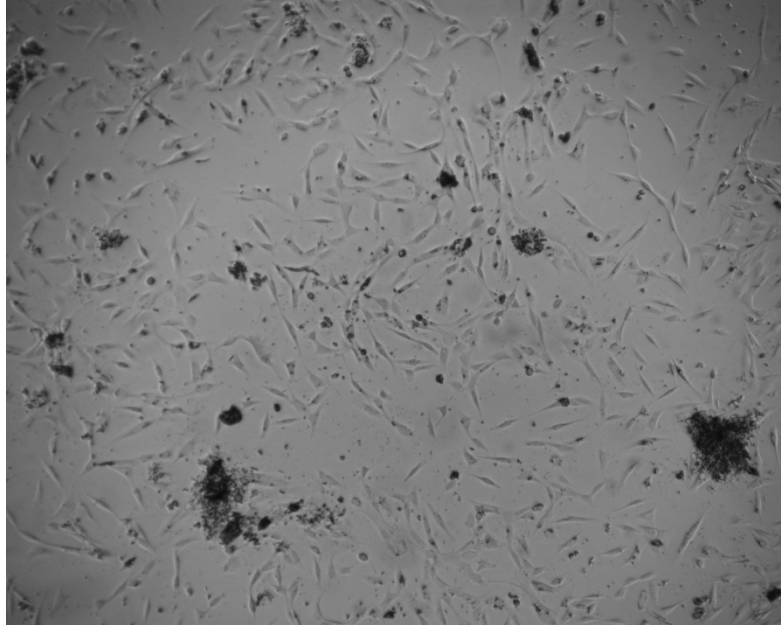


Figura 45: Morfología de las CSM del disco en fase inicial

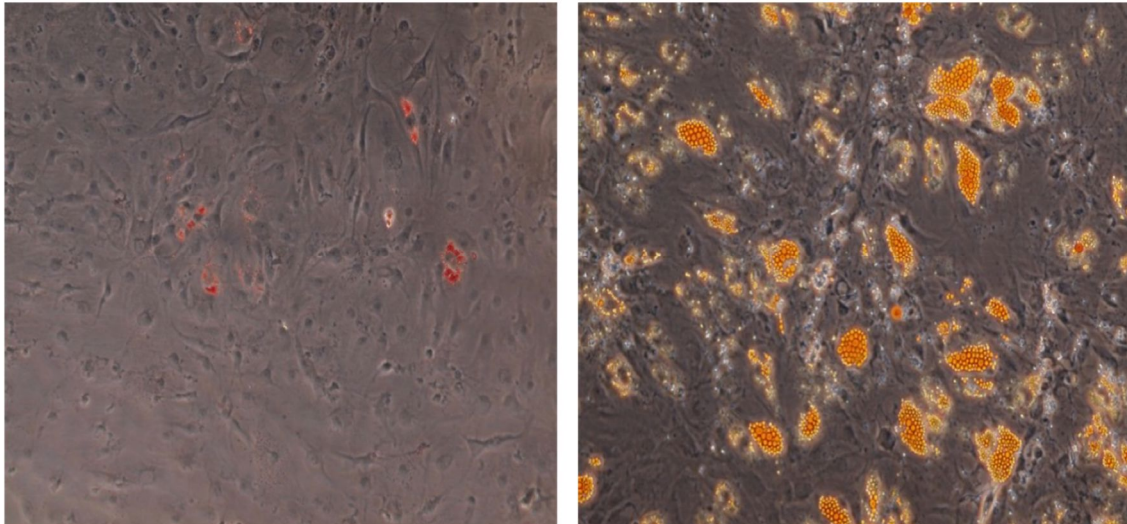
5.3 Diferenciación multilineal

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 degenerativos [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



CSM disco intervertebral

CSM médula ósea

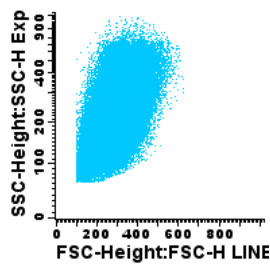
Figura 46: Diferenciación adipocítica de células procedentes de disco intervertebral y médula ósea

5.4 Estudio inmunofenotípico

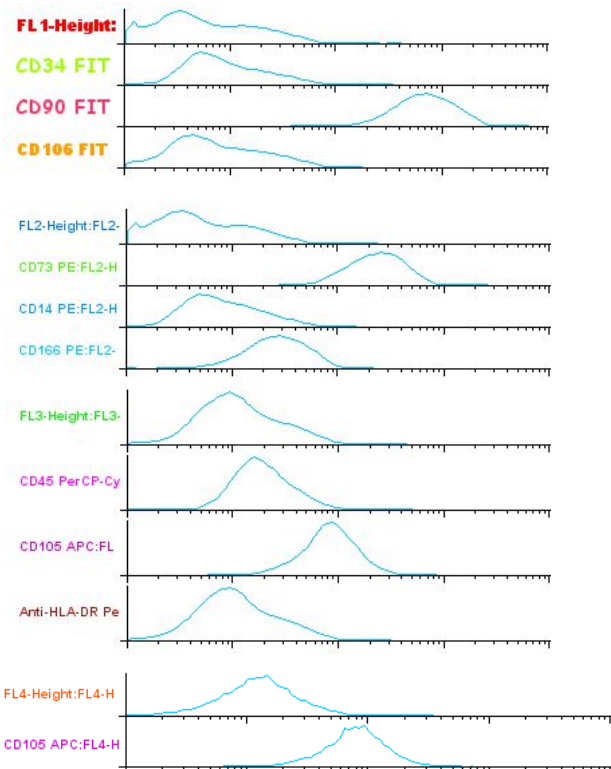
Tampoco se han demostrado diferencias en los marcadores inmunofenotípicos, como se puede observar en las siguientes figuras (Figura 48, Figura 49). Las células de ambos orígenes poseen los marcadores inmunofenotípicos característicos de las células mesenquimales, de acuerdo con los criterios de la International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

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

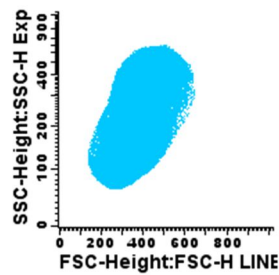


Viabilidad: 81%



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	4.96197
CD106 FITC:FL1-H	2.56751
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 47. 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	1.41708
FL2-Height:FL2-H	1.23500
FL3-Height:FL3-H	1.35984
FL4-Height:FL4-H	8.90691
CD34 FITC:FL1-H	0.83650
CD73 PE:FL2-H	18.79867
CD45 PerCP-Cy5.5:FL3-H	1.74869
CD105 APC:FL4-H	18.71015
CD106 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

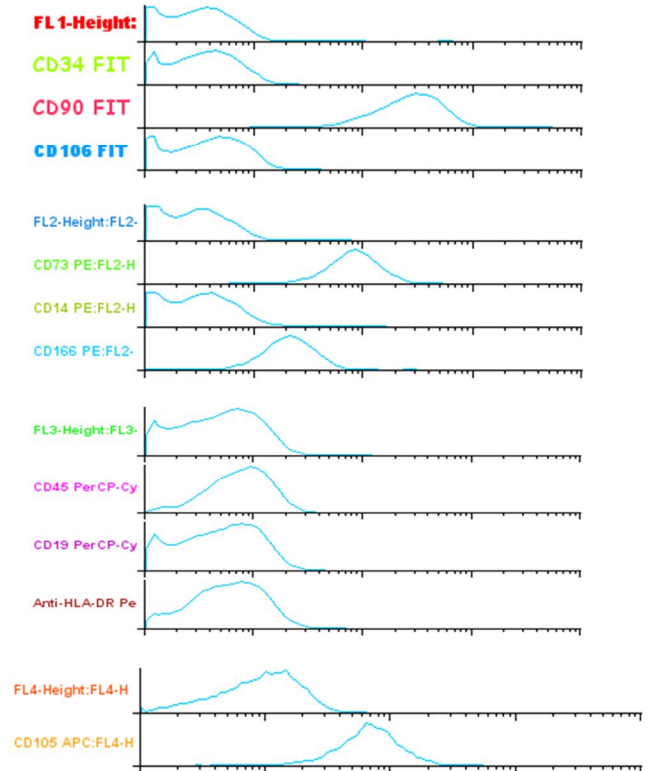


Figura 48. Marcadores inmunofenotípicos de CSM en MO.

5.5 Estudio genético

No se encontraron diferencias significativas entre las células del núcleo pulposo y las obtenidas de médula ósea en cuanto a la expresión genética para Agrecano, Colágeno tipo II, COMP, SOX6 y SOX9. Sin embargo, se encontró una significativa menor expresión del Colágeno tipo I en las CSM de disco intervertebral comparado con las de médula ósea

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La patología osteoarticular es una causa importante de dolor crónico y limitación funcional en la población mundial en general. Debido a su alta incidencia, les supone a las sociedades del primer mundo una importante carga en forma de absentismo laboral y gasto sanitario. De todas estas enfermedades, se estima que sólo la artrosis es responsable del 50% de las enfermedades crónicas en la población envejecida, superior a las patologías cardiopulmonares y los tumores malignos. Es verdad que la repercusión mediática que tienen los dolores mecánicos no va a ser nunca la misma que la de las patologías potencialmente mortales, pero no es menos verdad que el consumo de recursos en forma de asistencia médica, asistencia social, pérdidas de coste-oportunidad, cargas familiares y cargas sociales de las enfermedades degenerativas del aparato locomotor convierten a este grupo de patologías en un enemigo de primera magnitud para las sociedades desarrolladas. En los próximos años se espera que su incidencia sea aún mayor, debido, en parte al aumento de la esperanza de vida de la población y en otra parte a la disminución de la incapacidad debida a las otras enfermedades para las que sí se dedica una gran inversión en investigación y tratamientos. En Estados Unidos en el 2015, la artrosis afectaba a 91.2 millones de personas, si contamos muestreos que incluyan todos los pacientes con algún dolor articular y algún cambio degenerativo, independientemente del grado de limitación funcional.

En el pasado se le ha dado una gran importancia a factores como los traumatismos, los microtraumatismos repetitivos, los hábitos de vida

perjudiciales como el tabaquismo y el sobrepeso. Sin negar que tengan su influencia en la génesis del problema, sabemos ahora que la visión, fundamentalmente mecanicista, del problema degenerativo, solo explica un pequeño porcentaje de la realidad. Es verdad que los factores externos han sido, hasta ahora, los más fáciles de modificar con intención profiláctica o terapéutica. Hoy, sin embargo, estamos dirigiendo nuestros esfuerzos a conocer el funcionamiento biológico a nivel celular y molecular de las estructuras que forman la unidad funcional de la columna vertebral, sabemos que la constitución genética de cada individuo va a ser determinante para el desarrollo de una degeneración de dicha unidad funcional. Necesitamos, por tanto, conocer el modo en que la genética participa en la degeneración, y corregirla.

Datos de un estudio realizado en Estados Unidos, aporta que la mayoría de los adultos experimentarán dolor lumbar durante sus vidas ^[187]. Según 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 2004 ^[188]. Aunque el dolor lumbar agudo tiene una incidencia en torno al 80% de la población a lo largo de toda una vida, su cronificación es más rara, afectando solo al 5-10% de la población general ^[187]. En la situación de lumbalgia aguda lo más probable, en un 85% de casos, es no ser capaz de diagnosticar la causa del dolor de forma fehaciente. Incluso en los casos crónicos, es muy difícil en ocasiones, atribuir el origen del dolor a una u otra estructura basándonos solo en las pruebas de imagen y la exploración ^[189].

Sabemos que, a partir de cierto momento de la vida, a veces incluso antes de lo que imaginamos, empiezan a aparecer cambios en las pruebas de imagen que consideramos “degenerativos” sin que, por ello, el individuo tenga síntomas, es por ello evidente que hay que buscar en el nivel molecular, qué es lo que hace diferentes unas imágenes de otras cuando queremos entender por qué unos individuos tienen síntomas y otros no.

Sabemos también que los polimorfismos genéticos de diferentes receptores neuronales para mediadores del dolor pueden influir en la percepción individual del mismo y, por tanto, en el grado de limitación funcional y en el grado de demanda de asistencia de los pacientes ^[190].

6.1 Terapia celular

La finalidad de las CSM es diferenciarse a células maduras condrales, adipocíticas u osteoblastos para participar en la regeneración tisular ^[191] ya en 1998 Johnstone, y posteriormente Chamberlain, ^[125,130] describieron esta cualidad. Inicialmente se buscaban y obtenían este tipo de células de diversos tejidos embrionarios. Actualmente las más utilizadas son las adultas ya que desde un punto de vista biológico son más estables que las embrionarias y además no generan discusiones éticas. De los donantes adultos podemos conseguir CSM de tejido adiposo, médula ósea, sinovial y periostio, entre otros. Las que tienen mayor capacidad de diferenciación condrogénica son las obtenidas a partir de sinovial y médula ósea ^[192].

Otra alternativa consiste en obtener células IPS (del inglés: Induced Pluripotent Stem cells) descritas por Takahashi y Yamanaka ^[193] en 2006 a partir de

células de ratones y en 2007 a partir de células humanas. Estas células son de origen adulto, pero son desdiferenciadas hasta un estadio “embrionario” mediante la implantación en fibroblastos de retrovirus que vehiculizan e inducen la expresión de varios genes exógenos como Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 capaces de desdiferenciar a los fibroblastos “infectados”. El objetivo es obtener células con una estabilidad de adultas, pero una potencialidad de indiferenciadas.

Las técnicas actuales de trasplante de condrocitos, con cultivo entre medias, para reparar lesiones condrales en articulaciones de carga, están dando unos resultados relativamente pobres y, aunque se sigue trabajando para mejorar la metodología con la esperanza de desarrollar técnicas realmente útiles a nivel clínico, lo cierto es que el “envejecimiento” del ADN de las células diferenciadas es una limitación importante que no presentan las CSM ^[194].

La médula ósea proporciona una fuente accesible, sencilla y relativamente barata de obtención de CSM que se pueden expandir y diferenciar con relativa facilidad. Obliga, sin embargo, a una punción moderadamente dolorosa y a un cierto entrenamiento para la obtención de la muestra ^[195,196].

No todas las fuentes que se han mencionado previamente de las que se pueden obtener CSM proporcionan material de similares características. Se ha visto en este trabajo, y se sabe por otros estudios, que la capacidad de diferenciación de las células troncales varía en función del origen, se puede decir que están, en cierto modo, predefinidas. La médula ósea es una buena

fuelle para obtener células que se van a diferenciar hacia estirpe ósea y también cartilaginosa [197,198].

Para trabajos de terapia celular sobre el disco intervertebral, en la mayoría de los estudios las células proceden de otros tejidos tales como la médula ósea, el tejido adiposo y el tejido sinovial [199-200].

Es tentador buscar la forma de resolver todas las patologías que impliquen una lesión tisular y una necesidad de regeneración, más allá de la simple reparación cicatricial, a partir de la ingeniería de tejidos. El avance futuro en este campo va a ser inmenso, pero es preciso antes sentar unos fundamentos nosológicos sólidos, contrastados y que permitan controlar, si no eliminar, todas las posibles desviaciones indeseables de cualquier actuación modificadora sobre el genoma de las células, su capacidad de diferenciación y su capacidad inmunoreguladora, que al final es lo que está ocurriendo cuando empleamos términos tan sugerentes como “ingeniería de tejidos” o “terapia celular”. Son, por tanto, los estudios como este que presentamos, encaminados a identificar, describir y caracterizar las poblaciones de progenitores celulares, en este caso del disco intervertebral, la base sobre la que se fundamente en un futuro la terapia en sí. [201].

Conocer estas células, su comportamiento, es lo que ha permitido su empleo en patologías como la Enfermedad del Injerto Contra el Huésped (ICH) o la mejora del rendimiento de los trasplantes hematopoyéticos [202-207].

Sabemos por trabajos previos que existen células troncales mesenquimales en el núcleo pulposo de discos lumbares degenerados [22]. En este trabajo pretendemos confirmar la presencia como residentes habituales de las CSM en el Núcleo Pulposo, incluso aunque este no se encuentre degenerado. Para ello hemos realizado un típico examen comparativo, hemos comparado células troncales procedentes de discos sanos, las cuales son el objeto de nuestro estudio, y las procedentes de la MO en pacientes intervenidos de cirugía raquídea. Las muestras de médula ósea son una de las fuentes de células progenitoras más conocidas, mejor caracterizadas y más empleadas [195,196]. La cirugía de escoliosis idiopática del adolescente es un procedimiento relativamente frecuente que pretende corregir deformidades vertebrales que superan un cierto grado de rotación e inclinación, como se ha descrito a lo largo del trabajo. El interés de este tipo de patología es que el procedimiento quirúrgico nos permite acceder a discos lumbares sanos radiológicamente, previa comprobación con RMN según unos criterios preestablecidos. La obtención de una muestra de un tejido es un procedimiento cruento, y si este tejido es sano, es difícil encontrar justificación desde el punto de vista ético para el procedimiento. En el caso de la escoliosis, la indicación de la cirugía es la deformidad, no la patología discal, pero dichos discos quedan englobados en la instrumentación y anulada, por tanto, su función, por lo que no se está produciendo al paciente ninguna agresión adicional a la hora de obtener muestras de dichos discos.

El primer ingrediente para la ingeniería tisular, las CSM, fueron obtenidas, aisladas y expandidas en nuestro trabajo, se constató su capacidad de

diferenciación hacia las líneas adipogénica y osteogénica y se han analizado fenotípica y genéticamente.

El segundo ingrediente es el microambiente, en forma de moléculas inductoras de división y diferenciación. Estas moléculas permiten que los precursores proliferen y se diferencien para empezar a producir la matriz extracelular [197]. Históricamente se empezó empleando TGF- β y dexametasona, tal y como hizo Johnstone (1998) [130] para inducir la condrogénesis, mejorar el microambiente tisular y mantener el fenotipo celular. Aunque las CSM pueden, por si solas generar células adultas y matriz extracelular, la adición de factores estimulantes amplifica el proceso [208]. Dentro de la familia de las BMPs, se ha visto que, sobre todo BMP-2, incrementa la condrogénesis y aumenta la producción de proteoglicanos, como expresión de la síntesis de matriz extracelular [209]. También se conoce la actividad del IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) como estimulante de la formación de cartilago y hueso, la función del factor de crecimiento epidérmico (EGF) sobre fibroblastos y la función del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) como estimulante de la división de los condrocitos [210].

También se ha visto que el TGF- β 3, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, pueden inducir la diferenciación de CSM-MO humanas hacia células de NP [211].

Hay trabajos que también demuestran la capacidad de las células troncales para regenerar los tejidos, estimuladas únicamente por el microambiente

lesional, sin necesidad de la adición de factores de crecimiento ^[212]. El rendimiento es menor y los elementos que influyen en la estimulación de la actividad de las células están peor identificados. Tiene, sin embargo, cierto interés la posibilidad de expandir células sin necesidad de emplear productos xenogénicos para mejor adaptar el trabajo del laboratorio a las recomendaciones de GMP para aplicación clínica ^[213,214]

Se ha observado en discos patológicos como aparece tejido fibrocartilaginoso ^[215], calcificaciones ^[216], e hipertrofia de nervios y vasos ^[217,218] como consecuencia de lesiones, traumáticas o degenerativas, lo que hace pensar que, dentro del santuario avascular y aneural que es el disco intervertebral, puede haber células con capacidad para generar este tipo de tejidos en respuesta a estímulos lesionales diversos.

También se ha observado el aumento de la celularidad en el interior de discos degenerados, lo que sólo se podría explicar bien por una migración desde el exterior, cosa difícil si tenemos en cuenta la arquitectura en múltiples capas del anillo fibroso, o por una proliferación de una población de células con capacidad para ello, es decir, de células progenitoras ^[219].

En el trabajo de Gruber ^[220] con ratas de arena se implantaron células troncales y se comprobó su proliferación y actividad dentro de los discos, lo que apoya la tesis de que las células troncales residentes podrían tener capacidad de multiplicarse para reparar el disco, ayudando a la regeneración y mantenimiento de la función discal.

En este trabajo hemos podido comprobar que las CSM se pueden aislar de los DIV. La población de células mononucleares que hemos seleccionado cumple los requisitos de la ISCT para poder ser consideradas células troncales mesenquimales, como son la adherencia in vitro a las superficies de plástico, la morfología característica y el perfil inmunofenotípico, así como la capacidad de diferenciación hacia diferentes líneas celulares adultas, como la osteogénica y la condrogénica [22]. En nuestro trabajo se comprobó una débil capacidad de diferenciación hacia adipocitos en la población de células obtenida, hecho que, convenientemente analizado, no resta valor a la capacidad multipotencial de las células del disco intervertebral.

Un punto fuerte de este estudio es que el control con el que hemos comparado la potencialidad de las células obtenidas de los discos intervertebrales ha sido la médula ósea de los mismos individuos, lo que lo hace ideal para eliminar posibles variabilidades interindividuales a la hora de la interpretación de los datos.

Risbud et al [24] fueron capaces de aislar células a partir de fragmentos, tanto de anillo fibroso como de núcleo pulpos de disco intervertebrales y describieron una población heterogénea de CSM que fueron positivas para CD105, CD166, CD63, CD49a, CD90, CD73, CD133 y negativas para CD34. En este caso en particular, las células se obtuvieron de discos moderadamente degenerados, sugiriendo la posibilidad de que las células troncales participen de procesos de regeneración. Nosotros hemos comprobado también que estas células aisladas

de discos degenerados comparten características con las células aisladas de Médula Ósea [22].

En el artículo de Lui de 2011 se describe la presencia de células troncales en el platillo vertebral, zona de naturaleza cartilaginosa, estas células, con fenotipo y morfología similar a las CSM de Médula Ósea, tienen una mayor capacidad para diferenciarse hacia estirpes osteogénica y condrogénica [221].

Se ha especulado en el pasado con que todas las células multipotenciales mesenquimales pueden ser originariamente pericitos que, como tales, se localizan alrededor de los vasos sanguíneos en condiciones de normalidad tisular, a la espera de ser requeridos y migrar hacia alguna localización donde dividirse y diferenciarse [222]. Esta afirmación se contradice con los hallazgos de nuestro trabajo. El disco intervertebral, sobre todo el disco sano, es un tejido avascular. Nosotros hemos sido capaces de detectar células que cumplen criterios de CSM en discos intervertebrales sanos. Aunque se puede seguir debatiendo sobre la naturaleza de las células multipotenciales, el hecho es que, tanto en este trabajo, como en los artículos de Risbud y Blanco que hemos citado previamente, se han obtenido células troncales mesenquimales del interior de los núcleos pulposos de los disco intervertebrales. [22,24].

Hay trabajos que han encontrado la presencia de células multipotenciales en el anillo fibroso de discos intervertebrales en diferentes especies [223] y también en humanos [224], y se ha visto su capacidad para diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos, condrocitos, células neurales y células endoteliales. El hecho de demostrar que las células multipotenciales residen de forma habitual en discos

sanos, y no son fruto de una migración externa en situación de degeneración, abre la vía al entendimiento de cómo funciona, a nivel celular, el disco intervertebral en condiciones fisiológicas.

Sabemos que la vía Wnt puede estar implicada en patologías del raquis en las que la diferenciación a adipocito y la sobreexpresión de osteocitos están alteradas ^[225]. Cuando esta vía está activada inhibe la diferenciación a adipocito en células multipotenciales in vitro ^[226] ya que impide la inducción de los factores de transcripción PPAR y C/EBP ^[227].

El mediador Wnt10b actúa como inhibidor de la adipogénesis, y debe ser suprimido in vitro para conseguir diferenciar adipocitos ^[228,229].

También se está investigando como la estimulación de la osteogénesis suprime la adipogénesis y viceversa ^[230] mediante diferentes vías de señalización y mecanismos de oxido-reducción intracelular, no solo la Wnt, sino también FOXO, Hh, NELL-1, el factor de crecimiento relacionado con insulina y las BMPs están implicadas en la regulación de la diferenciación (Figura 50).

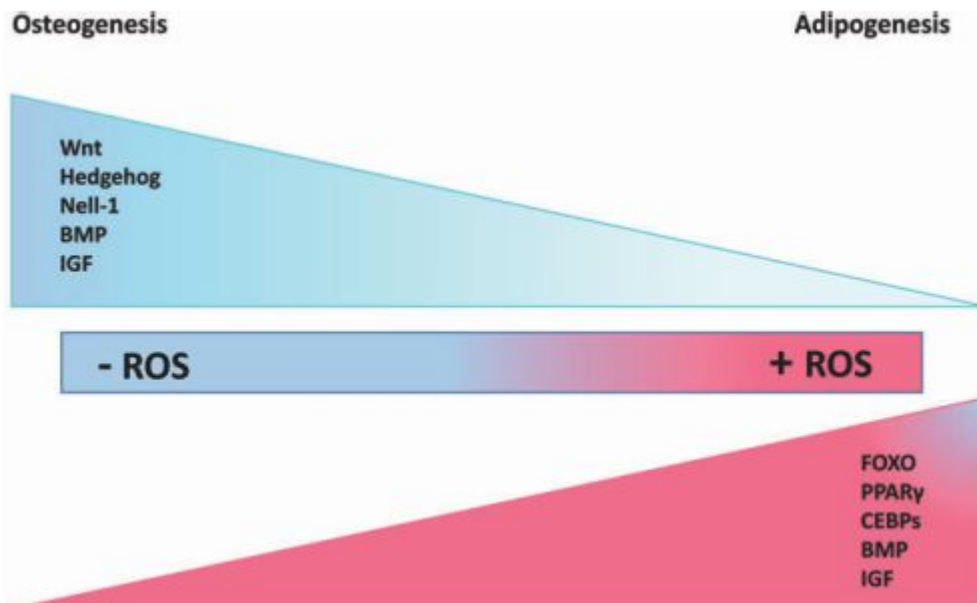


Figura 49. Factores que influyen entre la diferenciación osteogénica y adipogénica.

Anteriormente hemos dejado apuntado el hecho de que las células multipotenciales que hemos aislado en nuestras muestras presentaban una mermada capacidad de diferenciación hacia adipocitos, lo que podría ir en contra de su clasificación como CSM. Este hecho ya fue detectado por nuestro grupo de trabajo al estudiar discos lumbares degenerados ^[22] y entraba en discordancia con los hallazgos del trabajo de Risbud. En su momento se barajaron tres hipótesis. Primeramente, la posibilidad de que ligeras diferencias en el método de diferenciación pudieran afectar a los resultados, sabemos, por ejemplo, que el tratamiento con ATP influye en la expresión de genes que participan en la diferenciación a osteoblasto u adipocito por medio de la vía Wnt ^[231] en segundo lugar, se barajó la posibilidad de que la fuente de las muestras, en concreto el grado de degeneración de los discos en uno y otro estudio, fueran diferentes, de hecho, los discos del trabajo de Blanco presentaban un mayor grado de degeneración radiológica. Esta segunda posibilidad queda

descartada al haber encontrado la misma disminución de diferenciación adipogénica en los discos sanos. En tercer lugar, cabe la posibilidad de que las CSM discales, en comparación con las de MO estén ya, de alguna forma, predeterminadas hacia la formación de unos tipos de células adultas mesenquimales, y no de otros, por razón de su localización, recordemos que, en el disco intervertebral, tanto en el anillo como en la zona central, no hay tejido graso.

Ciertamente, las células multipotenciales del disco intervertebral no son similares al cien por cien a las de la médula ósea. Morfológicamente son idénticas. En cuanto a inmunofenotipo son prácticamente similares, aunque las procedentes del núcleo pulposo tienden a expresar menos ciertas moléculas de adhesión (CD105, CD106 y CD166), hecho que, queremos pensar, está relacionado con la posible influencia de la localización. No hemos incluido otros marcadores inmunofenotípicos empleados en otros trabajos, como por ejemplo el CD146 ^[232] que es un marcador que se expresa en situaciones de auto renovación y actualmente no entra dentro de la lista de marcadores recomendados por la ISCT ^[17], aunque pensamos que podría tener cierto interés en futuros trabajos. Por último, genéticamente también son prácticamente similares, aunque hemos visto que las células multipotenciales de núcleo pulposo tienen menor expresión de colágeno tipo I que las células de médula ósea.

Sabemos por otros trabajos que la influencia del ambiente es fundamental para modular la expresión de las células, e influye y modifica los parámetros

medibles de que disponemos para caracterizar estas células, como son la morfología, el fenotipo y la función ^[233] de las mismas en los tejidos en los que se encuentran, incluyendo el núcleo pulposo ^[234]. Entre las características de este microambiente al que nos referimos se incluyen el pH, los niveles de glucosa, la osmolaridad, la presión hidrostática derivada de la carga mecánica y la expresión de proteasas y citocinas que vamos a ir comentando.

Todavía falta mucho por avanzar en investigación básica y conocimiento puro antes de poder dar el paso a la aplicación práctica generalizada de las células multipotenciales en la degeneración discal. Precisamente hay que avanzar en el conocimiento de cómo el microambiente influye, no solo en la expresión de las células, sino también en algo tan elemental como es su propia supervivencia. Sabemos ^[235,236] que hay diferencias a nivel genómico entre las células de médula ósea y de disco. Sabemos que el ambiente discal es diferente al de la médula ósea, y el del disco degenerado presenta diferencias en cuanto a acidez, expresión de citocinas y osmolaridad con respecto al sano ^[237,238]. Se ha experimentado in vitro con diferentes niveles de glucosa y acidez para comprobar la capacidad de supervivencia de las células multipotenciales ^[239,240] y cómo se puede también afectar su capacidad de replicarse indefinidamente ^[241]. Sabemos que las CSM-MO pueden tolerar durante un tiempo limitado niveles de glucosa elevados sin alterar su funcionalidad ^[242,243]. Sin embargo, la acidez de un disco degenerado es mayor que la de un disco sano (pH de 6.8-6.2 frente a 7.0-7.2) ^[244,245], debido al consumo de glucosa en un ambiente anaerobio ^[246,247], esta acidez es un factor determinante de la apoptosis de CSM-MO.

El comportamiento celular ante cargas mecánicas en cultivos tridimensionales ha sido estudiado. Se ha comprobado como determinado rango de presiones hidrostáticas induce diferenciación condrogénica [248,249]. También se ha visto cómo aumenta la producción de matriz extracelular con el aumento de la presión [250]. Tanto en animales [251,252] Como en humanos [253-254] se ha comprobado como la compresión cíclica estimula la producción de genes y factores implicados en la condrogénesis en CSM-MO.

Las células nativas del disco intervertebral son capaces de amoldarse a los cambios en la osmolaridad que se producen inevitablemente con los cambios de presión debidos al propio movimiento [255] esto implica, no solo cambios en tamaño de las células, sino también cambios en la expresión de los genes de estas [256-258].

En el trabajo de Walker et al. de 2010 se experimentaron CSM-MO de ratas a las que se había producido una lesión cerebral experimental y se comprobó su supervivencia en medio hiperosmolar, incluso el balance beneficioso hacia la producción de citoquinas antiinflamatorias en vez de proinflamatorias [259].

Está estudiado cómo las metaloproteasas forman parte de los mecanismos de formación ósea durante el desarrollo y en la vida adulta y tienen una función también en la condrogénesis, por lo que se ha apuntado que podrían tener un papel en la diferenciación hacia condrocitos de las CSM-MO [260]. La proliferación celular y la diferenciación morfológica están influidas por las interacciones entre las metaloproteasas y sus inhibidores [261], esto afecta a la

remodelación de los tejidos y también a la patogénesis de determinadas enfermedades, desde degenerativas como la artritis, los aneurismas y la aterosclerosis hasta determinados tumores, pero el conocimiento que tenemos sobre estas interacciones es todavía incompleto ^[262]. A nivel discal pueden estar asociadas a la discopatía degenerativa ^[263] y a la diferenciación de las CSM ^[264].

En cuanto a las acciones de las diferentes citoquinas, estamos en el camino de desentrañar el mapa de las diferentes interacciones entre moléculas. Es necesario desentrañar este mapa si queremos controlar, primero experimentalmente y luego clínicamente, el potencial biológico de las células multipotenciales.

Se ha comprobado la actividad del TNF-alfa en el núcleo pulposo y en el anillo fibroso de los discos degenerados ^[265,266], sabemos su influencia en la diferenciación adipocítica, tanto en el disco ^[267] como en las células de médula ósea, sabemos también que no interfiere en la supervivencia de dichas células de forma significativa ^[268].

De la inducción de la proliferación parece ser responsable la IL-6, al menos en médula ósea está implicada en la comunicación paracrina entre células multipotenciales, evitando también la maduración de estas ^[269, 270].

Es evidente que los discos intervertebrales, en los que ya hemos demostrado la existencia de células multipotenciales residentes, degeneran. Resulta obvia la pregunta de cómo puede ocurrir esto, o para ser más precisos, en qué momento, o bajo qué circunstancias las células multipotenciales dejan de ser

capaces de mantener la estructura discal en condiciones óptimas para garantizar un buen funcionamiento mecánico.

Podría barajarse la hipótesis del envejecimiento celular, que disminuyera su capacidad de proliferación en cantidades suficientes para atender a la demanda, sin embargo, en nuestros trabajos previos sobre discos degenerados, las células pudieron ser expandidas hasta tres pases sin detectarse ninguna deficiencia, sería interesante aumentar el número de pases para comprobar la capacidad de las células para proliferar.

Se da la circunstancia de que es, precisamente, el ambiente que se genera cuando el disco se deteriora lo que más puede estimular a las células multipotenciales a proliferar ^[147,26].

Es relativamente fácil obtener células multipotenciales de médula ósea y expandirlas, además sabemos que en contacto con las células residentes de núcleo pulposo tiene un efecto paracrino que estimula la expresión de genes que codifican para colágeno tipos I, II y VI, agrecano y SOX-9, que es un regulador fundamental para condrogénesis ^[271-274] y recíprocamente, se aumenta la síntesis de ADN y prostaglandinas en las células del núcleo pulposo ^[275].

En el trabajo de Strassburg ^[276] que intenta dilucidar el mecanismo por el que las células en co-cultivo se comunican, se observó cómo las células de médula ósea evolucionaban hacia fenotipos de células del núcleo mientras favorecían la regeneración de células de núcleo pulposo hacia fenotipos “no degenerativos”, exploraron las posibles vías de comunicación, como las “gap-junctions” y las fusiones celulares y la transferencia de componentes de membrana, bien de forma directa, bien mediante la formación de

microvesículas, y abogaron por este último mecanismo como el principal para la comunicación entre ambas poblaciones celulares. Otros trabajos previos habían indicado la fusión entre células de poblaciones de CSM de médula ósea y de núcleo pulposo como mecanismo modificador [277].

El trabajo de Richardson de 2008 [278] sugería la posibilidad de emplear estructuras tridimensionales de hidrogel sembradas con CSM de médula ósea para regenerar discos intervertebrales, basándose en las observaciones de las células de médula ósea que adoptaban fenotipos de células de núcleo pulposo al interactuar con estas. Igualmente se ha visto esta regulación en células multipotenciales de tejido adiposo, que se han diferenciado hacia células de núcleo pulposo favorecidas por cocultivo con estas [279].

Existen trabajos experimentales implantando células multipotenciales de médula ósea en cerdos, ratones y en conejos con discos sanos que demuestran su viabilidad durante varios meses y su capacidad de producir proteoglicanos y de estimular a las células notocordales [200,280,281]. Estos trabajos ya expresaban dudas sobre si el comportamiento de dichas células en disco degenerados sería similar al observado en discos sanos.

Es un hecho que el DIV tiene en su interior los mecanismos necesarios para realizar el mantenimiento de su estructura a lo largo de los años, en forma de células con capacidad de dividirse, diferenciarse y madurar hacia células productoras de MEC. Es lógico pensar que este mantenimiento se realiza de forma continua y constante, probablemente hasta un momento en el que deja

de ser eficaz. No podemos afirmar qué condiciones se dan para que esto ocurra, la grandísima variación entre individuos en cuanto al momento y la velocidad a la que ocurre la degeneración discal no ayuda a determinar la causa. Puede ser un problema en la capacidad intrínseca de las células residentes que puede estar determinada genéticamente; puede ser un problema en el resto de estructuras que rodean al disco, como los platillos vertebrales, el aporte vascular al anillo fibroso o al interior de las propias vértebras, la densidad mineral ósea o la musculatura; puede ser la influencia de factores externos, como los tóxicos, o los factores biomecánicos, incluyendo el tipo de actividad, los traumatismos o microtraumatismos, el sobrepeso, infecciones subclínicas o algún grado de déficit nutricional. Puede ser, seguramente, una coalición de factores ambientales de base sobre los que se añaden eventos puntuales que influyen todos ellos sobre unos tejidos genéticamente predispuestos.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

7.1 General

Con respecto a la presencia de CSM en NP:

Podemos afirmar que el NP de los discos intervertebrales lumbares sanos 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 lumbar sano.

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 degenerados:

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. En discos lumbares sanos, la capacidad de diferenciación a adipocito está disminuida con respecto a los anteriores.

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 particularidades de diferenciación, como las descritas previamente.

BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

- 1- Jafarzadeh SR, Felson DT Updated estimates suggest a much higher prevalence of Arthritis in United States adults than previous ones. *Arthritis Rheumatol.* 2018 Feb;70(2):185-192
- 2- Hootman JM, Helmick CG. Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations. *Arthritis Rheumatol* 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, Lorch 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- Naylor A, Happey F, Turner RL, et al. Enzymic and immunological activity in the intervertebral disc. *Orthop Clin North Am.* 1975; 6:51-58.
- 42- Gertzbein SD. Degenerative Disc Disease of the lumbar spine: immunological implications. *CORR* 1977; 129:68-71.
- 43- Pritzker KP. Aging and degeneration in the lumbar intervertebral disc. *Orthop Clin North Am.* 1977; 8:65-77.
- 44- Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC. Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus *The Anatomical Record* 1982.
- 45- 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.
- 46- Battie MC, Videman T, Gibbons LE, et al. 1995 Volvo Award in clinical sciences. Determinants of lumbar disc degeneration. A study relating lifetime exposures and magnetic resonance imaging findings in identical twins. *Spine* 1995; 20(24): 2601-12.
- 47- 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.
- 48- 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.
- 49- 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.
- 50- Horst M, Brinckmann P. 1980 Volvo Award in biomechanics. Measurement of the distribution of axial stress on the end-plate of the vertebral body. *Spine* 1981;6(3):217-32.
- 51- 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.
- 52- McNally DS, Shackelford IM, Goedship AE, Mulholland RC. In vivo stress measurement can predict pain on discography. *Spine* 1996; 21(22):2580-87.

- 53- In: Canale ST, Beaty JH, eds. *Campbell's Operative Orthopaedics*. 11th ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier; 2011. 2274-75.
- 54- Latridis JC, ap Gwynnb I. Mechanisms for mechanical damage in the intervertebral disc annulus fibrosus. *Journal of Biomechanics* 2004;37: 1165-75.
- 55- Sullivan J, Farfan H, Kahn D. Pathologic changes with intervertebral joint rotational instability in the rabbit. *Can J Surg* 1971; 14:71-9.
- 56- Christian WA, Pfirrmann AM, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Magnetic Resonance Classification of Lumbar Intervertebral Disc Degeneration. *Spine* 2001; 26 (17): 1873–78.
- 57- 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.
- 58- 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.
- 59- 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.
- 60- 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.
- 61- Battié MC, Videman TJ. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics. *Bone Joint Surg Am* 2006; 88 Suppl 2:3-9.
- 62- 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.
- 63- 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.
- 64- 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.
- 65- 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.
- 66- 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.

- 67- Nachemson A. The load on lumbar disks in different positions of the body. *Clinical Orthopaedics* 1976; 45: 107-12.
- 68- 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.
- 69- 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.
- 70- 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.
- 71- Olmarker K, Rydevik B. Disc Herniation and sciatica; the basic science platform. In *Lumbar Disc Herniation*. Edited by Gunzburg R, Szpalski M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002:31-37.
- 72- 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.
- 73- 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.
- 74- Kenneth P, Botwin R, Gruber DO. Lumbar spinal stenosis: anatomy and pathogenesis. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2003;14: 1–15.
- 75- In: Rothman RH, Simone FA, eds. *The spine*. 3rd edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 832.
- 76- 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.
- 77- 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.
- 78- World Health Organization. *Cancer Pain Relief*. Geneva. 1986. *Anesthesia & Analgesia*. 1988; 67:1159 - 116.
- 79- Albee FH. Transplantation of a portion of the tibia into the spine for Pott's disease. *JAMA* 57: 885-886, 1911.
- 80- Hibbs RA. A report of fifty-nine cases of scoliosis treated by the fusion operation. *J. Bone Joint Surg.* 6:3, 1924.

- 81- Roy-Camille R, Saillant G, Mazel C. Internal fixation of the lumbar spine with pedicle screw plating. *Clin Orthop Relat Res* 1986(203):7-17.
- 82- Reddi AH. Bone matrix in the solid-state geometric influence on differentiation of fibroblasts. *Advances in Biological Medical Physics*. Vol 15. New York, Academic Press, 1973, p.1.
- 83- Urist MR, Mikulski A, Leitz A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:1828, 1978.
- 84- Weatherley Cr, Prickett CF, O'Brien JP. Discogenic pain persisting despite solid posterior fusion. *JBS Br.* 1986; 68(1): 142-3.
- 85- *Harms J, Rolinger H. A one-stage procedure in operative treatment of spondylolistheses: dorsal traction reposition and anterior fusion (author's transl.) Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1982; 120(3): 343-7.
- 86- Kirkpatrick JS. Thoracolumbar fracture management: anterior approach. *J Am Acad Orthop Surg* 2003; 11(5): 355-63.
- 87- Ozgur BM, Aryan HE, Pimenta L, Taylor WR. Extreme lateral interbody fusion (XLIF): a novel surgical technique for anterior lumbar interbody fusion. *Spine J* 2006; 6(4): 435-43.
- 88- 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.
- 89- 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.
- 90- Le H, Thongtrangan I, Kim DH. Historical review of cervical arthroplasty. *Neurosurg Focus* 2004; 15;17(3):E1.
- 91- 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.
- 92- Bao QB, Yuan HA. New technologies in spine: nucleus replacement. *Spine* 2002; 27(11): 1245-7.
- 93- Di Martino A, Vaccaro AR, Lee JY, Denaro V, Lim MR. Nucleus pulposus replacement: basic science and indications for clinical use. *Spine* 2005; 30(16 suppl): S16-22.
- 94- Ding F, Jia Z, Zhao Z, et al. Total disc replacement versus fusion for lumbar degenerative disc disease: a systematic review of overlapping meta-analyses. *Eur Spine J.* 2017 Mar;26(3):806-815.

- 95- Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger D. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop* 2007; 31(6): 773–81.
- 96- Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002;12(11):502-8.
- 97- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213- 22.
- 98- Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med* 2006;24(5):379-88.
- 99- 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.
- 100- 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.
- 101- Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:231-34.
- 102-Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp* 2005;265:55-61.
- 103- 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.
- 105- 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.
- 106- Loges S, Fehse B, Brockmann MA et al. Identification of the adult human hemangioblast. *Stem Cells Dev* 2004;13(3):229-42.
- 107- 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.
- 108- 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.

- 109- Holyoake TL, Alcorn MJ. CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev* 1994;8(2):113-24.
- 110- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87(1):1-13.
- 111- 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.
- 112- Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997;21(3):225-35.
- 113- 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.
- 114- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28(8):875-84.
- 115- 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.
- 116- 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.
- 117- 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.
- 118- 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.
- 119- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71-4.
- 120- 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.
- 121- 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.
- 122- 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.

- 123- Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181(1):67-73.
- 124- Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102(10):3483-93.
- 125- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25(11):2739-49.
- 126- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893):41-9.
- 127- 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.
- 128- 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.
- 129- Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(3):290-94.
- 130- 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.
- 131- 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.
- 132- 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.
- 133- 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.
- 134- Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21(3):429- 35.
- 135- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16(3):381-90.
- 136- 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.

- 137- 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.
- 138- 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.
- 139- 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.
- 140- 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.
- 141- 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.
- 142- Zarnett R, Salter RB. Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin. *Can J Surg* 1989;32(3):171-4.
- 143- Arai F, Hirao A, Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15(2):75-9.
- 144- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425(6960):841-46.
- 145- 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.
- 146- 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.
- 147- 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.
- 148- 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.
- 149- 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.

150- 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.

151- 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.

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

153- 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.

154- 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.

155- 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.

156- 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.

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

158- 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.

159- 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.

160- 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.

161- 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.

- 162- 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.
- 163- 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.
- 164- Ojeda-Uribe 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.
- 165- 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.
- 166- 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.
- 167- Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion* 1971; 11:345-9.
- 168- 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.
- 169- Thomas CB, Kellam JF, Burg KL. Comparative study of bone cell culture methods for tissue engineering applications. *J ATSM Int* 2004; 1:1-17.
- 170- Atala A. Recent developments in tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Opin Pediatr* 2006;18(2):167-71.
- 171- Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005;23(1):47-55
- 172- Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998;16(5):224-30.
- 173- 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.
- 174- Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2003; 5:1-16.
- 175- 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.

- 176- Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006;367(9518):1241-46.
177. 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.
- 178- Yang C, Hillas PJ, Baez JA et al. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs* 2004;18(2):103-19.
- 179- 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.
- 180- 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.
- 181- Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(1):3-12.
- 182- Stitzel J, Liu J, Lee SJ et al. Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials* 2006;27(7):1088-94.
- 183- Sakiyama Elbert SE, Hubbell JA. Functional biomaterials: Design of novel biomaterials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31:183-201.
- 184- 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.
- 185- 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.
- 186- Griffith JF, Wang YX, Antonio GE et al. Modified Pfirrmann grading system for lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 2007; 32: E708 –712.
- 187- Manchikanti L. Epidemiology of low back pain. *Pain Physician* 2000;3(2):167-92.
- 188- 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.
- 189- 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.

- 190- Armero P, Muriel C, López M, González-Sarmiento R. Análisis de polimorfismos del gen TRPV1 en pacientes españoles con dolor neuropático Med Clin (Barc). 2012;139(1):1–4.
- 191- 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.
- 192- 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.
- 193- Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. Cell Stem Cell. 2012 Jun 14;10(6):678-84.
- 194- 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.
- 195- 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.
- 196- 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.
- 197- Vaquero J, Forriol F. Knee chondral injuries: Clinical treatment strategies and experimental models. Injury 2012; 43(6): 694-705.
- 198- 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.
- 199- 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.
- 200- 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.
- 201- 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.

- 202- Van Laar JM, Tyndall A. Adult stem cells in the treatment of autoimmune diseases. *Rheumatology* 2006; 45:1187–1193.
- 203- Scheinberg P. Stem-cell transplantation for autoimmune diseases. *Cytotherapy* 2003; 5:243–251.
- 204- Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006; 108:2509–2519.
- 205- Friedrich W, Muller SM. Allogeneic stem cell transplantation for treatment of immunodeficiency. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 26:109–118.
- 206- Lundqvist A, Childs R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation as immunotherapy for solid tumors: current status and future directions. *J Immunother* 2005; 28:281–288.
- 207- Baird K, Cooke K., Schultz KR. Chronic Graft Versus Host Disease (GVHD) in Children. *Pediatr Clin North Am.* 2010 Feb; 57(1): 297–322.
- 208- 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.
- 209- 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.
- 210- 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.
- 211- 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.
- 212- 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.
- 213- Almudena de Laiglesia Moreno. Generación de células humanas de placenta para uso clínico. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Medicina. 2017.
- 214- Wuchter P, Bieback K, Schrezenmeier H. et al. Standardization of Good Manufacturing Practice- compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications. *Cytotherapy*, 2015; 17: 128-139.

- 215- Sobajima S, Kompel 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.
- 216- Rutges JP, Duit RA, Kummer JA, et al. Hypertrophic differentiation and calcification during intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18:1487–95.
- 217- 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.
- 218- Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, et al. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet* 1997; 350:178–81.
- 219- 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.
- 220- 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.
- 221- 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.
- 222- Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell* 2008; 3:229 –30.
- 223- 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.
- 224- 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.
- 225- Corr M. Wnt signaling in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2014; 33(6):759-62.
- 226- 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.
- 227- 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.
- 228- Bennett CN, Ross SE, Longo KA et al. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem.* 2002; 277(34):30998-1004.

229- Ross SE, Hemati N, Longo KA et al. Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* 2000; 289(5481):950-953.

230- 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; 24(10):1150-63.

231- 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.

232- 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.

233- 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.

234- 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.

235- 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.

236- 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.

237- 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.

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

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

240- 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.

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

242- 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.

243- 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.

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

245- 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.

246- Holm S, Maroudas A, Urban JP, et al. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connect Tissue Res* 1981;8: 101-19.

247- 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.

248- Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Sci* 1995; 108:1497-1508.

249- 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.

250- 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.

251- 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.

252- 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.

253- 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.

254- 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.

255- 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.

256- Urban JP, Maroudas A. Swelling of the intervertebral disc in vitro. *Connect Tissue Res* 1981; 9:1-10.

257- 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.

258- 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.

259- 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.

260- 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.

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

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

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

264- 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.

265- 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.

266- 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.

- 267- Olmarker K, Larsson K. Tumor necrosis factor alpha and nucleus pulposus-induced nerve root injury. *Spine* 1998; 23:2538–44.
- 268- 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.
- 269- 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.
- 270- 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.
- 271- Herrmann JL, Weil BR, Abarbanell AM, et al. IL-6 and TGF-alpha costimulate mesenchymal stem cell VEGF production by ERK, JNK, and PI3K-mediated mechanisms. *Shock* 2011; 35:512–6.
- 272- 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.
- 273- Richardson SM, Walker RV, Parker S et al. Intervertebral disc cell mediated mesenchymal stem cell differentiation, *Stem Cells* 2006;24:707–16.
- 274- 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.
- 275- 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.
- 276- 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.
- 277- 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.
- 278- 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.

279- 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.

280- 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(2):141–8.

281- 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.

ANEXOS

9 ANEXOS

9.1 Abreviaturas

AF: Anillo Fibroso.

ACI: Implante de condrocitos autólogos.

ATP: Adenosina Trifosfato.

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

BM: Biomateriales.

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

BSM: Matriz derivada de la submucosa de la vejiga.

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

CFU-F: Unidades formadoras de colonias fibroblásticas (del inglés Fibroblast Colony-Forming Units).

CM: Células Mesenquimales.

CMN: Células Mononucleadas.

CSM: Célula "Stem" mesenquimal.

CSM-MO: Células "Stem" Mesenquimales de médula ósea.

CSM-NP: Células "Stem" Mesenquimales de núcleo pulposo.

DIV: Disco intervertebral.

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

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

EP: Platinos epifisarios (del inglés End Plates).

FACS: Selector de Células Activas por Fluorescencia (del inglés: Fluorescence Activated Cell Sorter).

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

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

GAG: Glucosaminoglicanos.

GMP: Normas de correcta fabricación (del inglés: Good Manufacturing Practice).

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

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

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

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

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

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

MACS: Separación de células mediante recubrimiento de anticuerpos con bolas magnéticas (del inglés: Magnetic Antibody-Coated Bead Separation).

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

MEC: Matriz Extracelular.

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

MMP: Metaloproteinasas.

MO: Médula ósea.

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

NP: Núcleo pulposos.

PBS: Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (del inglés: Phosphate Buffered Saline).

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

PGA: Ácido poliglicólico (del inglés Polyglycolic Acid).

PGC: Proteoglicano.

PLA: Ácido poliláctico (del inglés Polylactic Acid).

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

RM: Resonancia magnética.

Rx: Radiografía.

SBF: Suero bovino fetal.

SIS: Matrices derivadas de la submucosa intestinal porcina.

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

TAC: Tomografía axial computerizada.

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

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

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

UVF: Unidad Vertebral Funcional.

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

Wnts: Mammalian homologues of *Drosophila wingless*.

9.2 Índice de tablas

Tabla 1. Datos recogidos de los pacientes intervenidos.....	139
Tabla 2. Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio del inmunofenotipo de las células mesenquimales.....	146

9.3 Índice de figuras

Figura 1. Procesamiento de “Stem Cells” derivadas de un lipoaspirado.....	11
Figura 2. El proceso mesogénico	14
Figura 3. Anfiartrosis. Disección de la unión disco- platillo vertebral.	15
Figura 4. Disco intervertebral. Facetas, ligamentos y sus relaciones.....	17
Figura 5. Desarrollo embrionario. A: 17 días. B: 19 días. C: 20 días. D: 21 días. Tomado de Langman, Embriología Médica. 5ªEd. Ed. Panamericana 1990....	18
Figura 6. Desarrollo embrionario canal raquídeo.....	19
Figura 7. Núcleo Pulposo y sus relaciones.....	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.....	34
Figura 16. Evolución de la degeneración discal hasta la hernia.....	36
Figura 17. Disco intervertebral al microscopio óptico.....	37

Figura 18. Molécula de agrecano.....	39
Figura 19. Proporción relativa de los componentes principales del disco y platillo del adulto.....	41
Figura 20. Disminución de la intensidad de señal, imágenes de RM ponderadas en T2.....	43
Figura 21. Plexo vasculonervioso discal.....	44
Figura 22. Discografía.....	45
Figura 23. Disminución de los espacios intervertebrales, por proceso degenerativo.....	47
Figura 24. Fisura anular. Lesión HIZ.....	46
Figura 25. Presencia de aire dentro de los discos, por proceso degenerativo.....	49
Figura 26. Cambios tipo I. Imágenes hipointensa en T1 (T1WI) e hiperintensa en T2 (T2WI)	50
Figura 27. Modic tipo II. Imagen hiperintensa en T1 e isointensa o ligeramente hiperintensa en T2WI.....	51
Figura 28. Cambios Modic Tipo III, hipointensa tanto en T1 y T2.....	51
Figura 29. Distribución de la carga en el disco degenerado.....	55
Figura 30. Estenosis foraminal.....	57
Figura 31. Peso relativo de los distintos factores que determinan la degeneración.....	65
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. Método de Cobb.....	84
Figura 37. Prótesis discales con puente óseo anterior.....	94
Figura 38. Prótesis discal lumbar Charité III.....	95
Figura 39. Marcadores de superficie para CSM según <i>Kolf et al.</i>	105
Figura 40. Diseño del estudio.....	136
Figura 41. Morfología de los discos según la clasificación en RMN.....	137
Figura 42. Intervención quirúrgica.....	140
Figura 43. Extracción de Médula ósea de cresta ilíaca posterior.....	141
Figura 44. Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad.....	144
Figura 45: Morfología de las CSM del disco cervical en fase inicial.....	155
Figura 46: Diferenciación adipocítica de células procedentes de disco intervertebral y médula ósea.....	156
Figura 47. Marcadores inmunofenotípicos de CSM en NP.....	157
Figura 48. Marcadores inmunofenotípicos de CSM en MO.....	158
Figura 49. Factores que influyen entre la diferenciación osteogénica y adipogénica.....	170

9.4 Méritos

- Beca de investigación GEER 2013.
- Comunicación Oral congreso Nacional GEER 2018.