



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

María
González Rodríguez

Tesis doctoral

Efectos inmunometabólicos en
la regulación de los procesos
degenerativos e inflamatorios
del disco intervertebral

Santiago de Compostela, 2024



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DE DOCTORADO

**EFFECTOS INMUNOMETABÓLICOS EN
LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS
DEGENERATIVOS E INFLAMATORIOS
DEL DISCO INTERVERTEBRAL**

María González Rodríguez

Director de tesis:

Oreste Gualillo

Co-directores de tesis:

Javier Conde Aranda

Jesús Pino Mínguez

Tutor:

Manuel Campos Toimil

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2024





DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES Y FINANCIACIÓN

La autora declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

El trabajo de esta tesis doctoral se encuentra apoyado económicamente por parte del proyecto PI20/00902 titulado “Adipokines and E74-like factor 3 (ELF3): a novel loop in the signaling pathways of inflammatory response in the intervertebral disc degeneration”, el cual el cual ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético de Galicia de Investigación Clínica (Código de Registro:2017/279). Adicionalmente, la autora obtuvo un contrato predoctoral otorgado por la Xunta de Galicia (IN606A-2020/010).

En Santiago de Compostela, a 16 de enero de 2024.

Índice

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	15
RESUMEN	19
ABSTRACT	21
RESUMO.....	23
1 INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 La columna vertebral	27
1.2 El disco intervertebral.....	28
1.2.1 Núcleo Pulposo.....	29
1.2.2 Anillo Fibroso.....	30
1.2.3 Placas terminales cartilaginosas	31
1.2.4 Matriz extracelular en el disco intervertebral	32
1.2.4.1 Colágenos	33
1.2.4.2 Proteoglicanos	34
1.2.4.3 Fibras elásticas	34
1.3 La degeneración de disco intervertebral	35
1.3.1 Escala Pfirrmann.....	37
1.4 Cambios en la matriz extracelular en la Degeneración de disco intervertebral.....	39
1.4.1 Metaloproteinasas de la matriz (MMPs)	40
1.4.2 Desintegrinas y metaloproteasas con motivos de trombospondina.....	41
1.4.3 Proteasas de serina.....	42
1.5 Factores de riesgo y desencadenantes de la Degeneración de Disco Intervertebral.....	43
1.5.1 Factor mecánico.....	43
1.5.2 Lesiones traumáticas	45
1.5.3 Envejecimiento	46
1.5.4 Genética.....	46
1.5.5 Consumo de tabaco y alcohol.....	47
1.5.6 Cambios metabólicos en el disco intervertebral.....	47
1.5.7 Obesidad como proceso inflamatorio: Influencia de las adipoquinas en la degeneración de disco intervertebral.	49
1.5.7.1 ADIPOQUINAS.....	49

1.6 Inflamación	55
1.6.1 Mediadores de procesos inflamatorios.....	55
1.6.1.1 Las citoquinas	55
1.6.1.2 Las quimiocinas	57
1.7 Factores de transcripción implicados en la degeneración de disco intervertebral	57
1.7.1 ELF3 Epithelium-specific ETS transcription factor (ESE-1)	58
1.7.2 NFκB.....	60
1.8 Relación entre la degeneración de disco intervertebral y la artrosis.	62
1.9 Tratamientos farmacológicos para la Degeneración de Disco Intervertebral	63
1.9.1 Fármacos antiinflamatorios esteroideos.....	63
1.9.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos.....	65
1.9.3 Nutracéuticos como tratamiento antiinflamatorio	65
1.9.4 Oleocanthal	67
1.9.4.1 Actividad antiinflamatoria del oleocanthal.....	68
1.9.4.2 Actividad anti-cancerígena del oleocanthal.....	69
1.9.4.3 Rol del oleocanthal en enfermedades neurodegenerativas	69
1.9.4.4 Oleocanthal como tratamiento en enfermedades reumáticas.....	70
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
3 METODOLOGÍA	79
3.1 Aislamiento y cultivo primario de disco intervertebral	79
3.2 Extracción de ARN mensajero	82
3.3 RT-qPCR	83
3.3.1 Reacción de transcripción inversa (RT).....	83
3.3.2 qPCR.....	83
3.4 Transformación y transfección.	86
3.4.1 Bacterias competentes.....	86
3.4.2 Transformación	86
3.4.3 Transfección para sobreexpresión de ELF3.....	87
3.4.4 Silenciamiento del gen ELF3.....	88
3.5 Viabilidad Celular	88
3.6 Ensayos inmunohistoquímicos	90
3.7 Extracción de proteína	90
3.7.1 Cuantificación de la proteína	91
3.8 Western Blot	91
3.9 Análisis metabólico de las células de disco intervertebral	95

3.10 Análisis Estadístico	96
3.11 Reactivos y aparatos.....	97
4 RESULTADOS	101
4.1 CAPÍTULO I: Caracterización del disco intervertebral	103
4.1.1 Perfil metabolómico hallado en el disco intervertebral	103
4.1.1.1 Análisis multivariante	103
4.1.1.2 Análisis univariante.....	106
4.1.2 Perfil comparativo de expresión génica del disco intervertebral en estado basal	109
4.1.3 Perfil comparativo de expresión génica del disco intervertebral con estímulos inflamatorios	111
4.2 CAPÍTULO II: Estudio del factor ELF3 en disco intervertebral.....	117
4.2.1 Niveles de expresión de ELF3 en disco intervertebral	117
4.2.1.1 La expresión de ELF3 depende del estado patológico del tejido.....	117
4.2.2 Regulación de los niveles de ELF3 con estímulos inflamatorios.....	118
4.2.2.1 Comparación entre el estímulo inflamatorio IL-1 α e IL-1 β en disco degenerado.	119
4.2.2.2 La IL-1 α regula la expresión de ELF3 y de otros mediadores en disco degenerado.	120
4.2.2.3 La estimulación con IL-1 α durante 24 horas es idónea para la inducción de ELF3 y otros mediadores proinflamatorios y procatabólicos.	122
4.2.3 Modulación farmacológica con glucocorticoides.....	123
4.2.3.1 Efecto de la dexametasona sobre la expresión de ELF3	123
4.2.4 Estudio de la leptina como regulador de la expresión de ELF3	125
4.2.4.1 Niveles basales de leptina en disco sano y degenerado	125
4.2.5 Sobreexpresión del gen ELF3	127
4.2.5.1 La sobreexpresión del gen ELF3 aumenta la expresión de genes inflamatorios.	127
4.2.5.2 La sobreexpresión del gen ELF3 aumenta la expresión de genes inflamatorios en combinación con IL-1 α	130
4.2.6 Silenciamiento del gen ELF3	134
4.3 CAPÍTULO III: Estudio de sustancias naturales como posibles terapias para la degeneración de disco intervertebral.....	139
4.3.1 Oleocanthal no altera la viabilidad de las células de disco intervertebral degenerado en combinación con LPS.	139
4.3.2 Oleocanthal reduce la expresión de genes involucrados en la inflamación y el catabolismo de matriz inducida por la estimulación con LPS.	140
4.3.3 Oleocanthal regula la activación de la vía de NF κ B inducida por el LPS	143

4.3.4 Oleocanthal no altera la viabilidad de las células de disco intervertebral degenerado en combinación con IL-1 α .	144
4.3.5 Oleocanthal reduce la expresión de genes involucrados en la inflamación y el catabolismo de matriz inducida por la estimulación con IL-1 α .	145
4.3.6 Oleocanthal regula la activación de la vía de NF κ B tras estimulación con IL-1 α .	148
5 DISCUSIÓN	151
5.1 Discusión: capítulo I. Perfil metabólico del disco intervertebral humano	151
5.2 Discusión: capítulo II. El factor de transcripción ELF3 en el disco intervertebral humano	157
5.3 Discusión: capítulo III. Oleocanthal	162
6 CONCLUSIONES	169
7 CONCLUSIONS	170
8 ABREVIATURAS	173
9 BIBLIOGRAFÍA	181
ÍNDICE DE FIGURAS	209
ANEXOS	215
9.1 Dictamen del comité de ética de la investigación de Santiago-Lugo	215
9.2 Permisos para la utilización de figuras con copyright en esta tesis	219
9.3 Publicaciones con datos derivados de esta tesis	233

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar gracias a todas las personas que han pasado por mi camino y que de alguna manera han contribuido en que el día de hoy esta tesis doctoral sea posible. No puedo empezar sin mencionar al Dr. Francisco Navarrete, que durante la realización de mi trabajo final de grado fue partícipe de mis comienzos en este mundo que es la investigación. Gracias a él y al Dr. Jorge Manzanares por la acogida en su laboratorio en el Instituto de Neurociencias de Alicante. En un contexto en el que todos los trabajos de final de carrera quedaban en el plano bibliográfico, el inconformismo me llevó a contactar al Dr. Antonio Oliviero y Manuel Nieto que, a los que debo agradecer enormemente la aceptación en su laboratorio en el Hospital Nacional de Parapléjicos ya que gracias a ello me ayudaron a iniciarme en el mundo de la investigación básica y clínica, siempre de la mano de mi tutor el Dr. Navarrete. Sin ellos, estoy convencida que todo este trabajo de tesis doctoral no habría sido posible.

Después de culminar mi grado, el impulso por continuar en el mundo de la investigación me llevó a contactar al Dr. Oreste Gualillo, uno de mis directores de tesis. Estoy profundamente agradecida por la gran acogida en su laboratorio y por haber compartido conmigo su sabiduría a lo largo de estos años. El Dr. Gualillo no solo me enseñó conceptos teóricos y prácticos, sino que también me transmitió una valiosa lección: que los límites de nuestras posibilidades los establecemos nosotros mismos. Siempre me alentó a aspirar a metas más grandes, desafiándome a superar cualquier obstáculo y a explorar nuevos horizontes en la investigación.

El paso por este laboratorio y de todo mi trabajo de tesis no habría sido posible sin la ayuda del Dr. Jesús Pino, al que agradezco profundamente por su dedicación y su compromiso incansable hacia la consecución de mi desarrollo académico como doctora.

El laboratorio NEIRID no se entiende sin mencionar la trayectoria profesional de algunos de sus antiguos miembros, en la que quiero destacar al Dr. Javier Conde, siempre ejemplo de buen hacer y dedicación. Quiero agradecer al Dr. Conde por su guía, paciencia y apoyo a lo largo de este arduo proceso. Sus consejos y sabiduría fueron fundamentales en cada etapa de la investigación, llegando incluso en los momentos más desafiantes.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Manuel Campos por su inestimable apoyo y por haberme acogido con calidez y generosidad en el departamento de Farmacología de la USC, asumiendo con dedicación y compromiso la tutorización de esta tesis.

Estar bajo vuestra tutela fue un honor y un privilegio que atesoro profundamente. Cada consejo, cada discusión y cada momento compartido con vosotros han sido pilares fundamentales en mi formación académica y personal.

Quiero expresar mi más sincera gratitud a todos los miembros del laboratorio NEIRID, en especial a la Dra. Vera Francisco y Dra. Clara Ruiz, por su guía durante mis primeros pasos en el laboratorio. Al Dr. Yousof Farrag, por su incansable apoyo y ayuda en los momentos más difíciles en este camino. A la Dra. Djidji Ait Eldjoudi por convertirse no solo en una compañera excepcional, sino en una amiga a quien llevaré siempre conmigo. A Alfonso, por compartir este trayecto tan complicado paralelamente. A mis compañeros Mariam, María V. y Carlos cuya colaboración y apoyo han sido fundamentales.

A la Dra. Rosaria Meli y a todo el laboratorio F9, mi paso por su laboratorio fue una experiencia excepcional, y un placer aprender y colaborar bajo su dirección. Estoy muy agradecida por la oportunidad de haber formado parte de su equipo y por haber compartido momentos tan enriquecedores con personas tan talentosas.

No puedo no mencionar a mis compañeros del laboratorio 15, Miguel y Laura, que han sido y serán siempre una parte del laboratorio 9, siendo imprescindibles en todo este trayecto y convirtiéndose en unos amigos incomparables. Y a mis compañeras del laboratorio 7, Sandra y Laura, por tantos momentos de reflexión y apoyo con el laboratorio 9.

A mi madre, mi padre y mi hermana: su presencia y apoyo han sido pilares inquebrantables en mi vida, aún desde la distancia. En cada paso de mi camino, su amor y sabiduría han sido aliento y fortaleza. A mi abuela, por haber sido y seguir siendo siempre un modelo a seguir.

Agradezco a Andrea por haber sido el regalo más precioso que este trayecto ha puesto en mi camino. Su incansable apoyo ha sido un pilar fundamental durante esta travesía. En los momentos más difíciles, su aliento y confianza fueron el impulso que necesitaba para seguir adelante a lo largo de estos últimos años de dedicación a esta tesis doctoral.

Resumen / Abstract / Resumo

RESUMEN

La degeneración de disco intervertebral (DDI) es un estado patológico caracterizado por el deterioro de uno o más de los discos situados entre las vértebras que provoca dolor en la espalda o el cuello. La repercusión de la DDI, una enfermedad huérfana de opciones terapéuticas en la actualidad, es cada vez más notable a nivel mundial. Por lo tanto, es de capital importancia aumentar el entendimiento de los procesos patogénicos que subyacen en la misma.

En este trabajo se describió el perfil metabolómico y molecular de las células de disco intervertebral humano sanas y degeneradas, con el fin de comprender las alteraciones de los metabolitos tisulares asociados a la degeneración de disco. Nuestros resultados revelaron una disminución en los niveles de triglicéridos, diacilglicéridos, fosfatidilcolinas, lisofosfatidilinositoles y algunos ácidos grasos en el disco degenerado respecto al sano, mientras que los niveles de ceramidas y ácidos biliares mostraron un aumento en esas condiciones.

Con el fin de comprender nuevos procesos asociados a la degeneración de disco, focalizamos nuestra atención en el estudio de expresión del factor de transcripción ELF3 y la regulación de su expresión en los tejidos sanos y degenerados del disco intervertebral humano. En primer lugar, observamos que la estimulación con diversos factores inflamatorios (LPS, IL-1 α , IFN γ y TNF α), aumentaba la expresión de ELF3.

Considerando la similitud fisiopatológica entre el cartílago articular y los tejidos intervertebrales, y la correlación entre ELF3 y genes involucrados en la inflamación y el catabolismo de la matriz extracelular (ECM) en los condrocitos, quisimos explorar el papel de este factor de transcripción en los procesos inflamatorios intervertebrales. Demostramos que, al igual que en el cartílago articular, la sobreexpresión del gen ELF3 promueve un estado catabólico celular, aumentando los niveles de expresión de las metaloproteinasas 3, 9, y 13, así como de la agrecanasa ADAMTS5. Además, se observó un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y de adipoquinas proinflamatorias como LCN2. Estos resultados se confirmaron al silenciar ELF3. Estos hallazgos no solo se limitaron a células de disco intervertebral degeneradas, sino que se constató que la sobreexpresión de ELF3 en discos

sanos provocaba efectos similares, lo que sugiere que ELF3 participa de manera crucial en el inicio y el desarrollo de la enfermedad de degeneración de disco intervertebral.

También exploramos el potencial farmacológico de diversas moléculas capaces de regular la expresión de ELF3. Dentro de estas, analizamos la actividad de la dexametasona, un glucocorticoide convencional, y el oleocanthal, una molécula de origen natural con estructura fenólica presente en el aceite de oliva virgen extra. Nuestros resultados revelaron que ambas moléculas tienen la capacidad de disminuir la expresión de ELF3. Además, nuestros datos pusieron de manifiesto que el oleocanthal era capaz de bloquear la fosforilación de la subunidad p65 de NF κ B, bien inducida por el LPS o por la IL-1 α en las células de disco degenerado. Además, esta inhibición se acompañaba de la reducción de la transcripción de genes inflamatorios, tales como IL-6, NOS2, ELF3, MMP3, MMP13 y ADAMTS5, demostrando que esta sustancia tiene un gran potencial para el tratamiento de los procesos inflamatorios y catabólicos en las células del disco degenerado.

Palabras clave: Degeneración de disco intervertebral, inflamación, metabolómica, ELF3, oleocanthal.

ABSTRACT

Intervertebral disc degeneration (IVDD) is a pathological condition characterized by the deterioration of one or more of the discs located between the vertebrae, causing pain in the back or neck. The impact of DDI, a disease that currently lacks therapeutic options, is increasingly notable worldwide. Therefore, it is of capital importance to increase the understanding of the pathogenic processes underlying this disease.

In this work, the metabolic and molecular profile of healthy and degenerated human intervertebral disc cells was described, in order to understand the alterations of tissue metabolites associated with disc degeneration. Our results revealed a decrease in the levels of triglycerides, diacylglycerides, phosphatidylcholines, lysophosphatidylinositols and some fatty acids in the degenerated disc compared to the healthy one, while the levels of ceramides and bile acids showed an increase in their regulation.

To understand new processes associated with disc degeneration, we focus our attention on the study of the transcription factor ELF3 and the regulation of its expression in healthy and degenerated tissues of the human intervertebral disc. Firstly, we observed that stimulation with various inflammatory factors (LPS, IL1 α , IFN γ and TNF α) increased the expression of ELF3.

Considering the pathophysiological similarity between articular cartilage and intervertebral tissues, and the correlation between ELF3 and genes involved in inflammation and catabolism of the extracellular matrix in chondrocytes, we wanted to explore the role of this transcription factor in intervertebral inflammatory processes. We demonstrate that, as in articular cartilage, overexpression of the ELF3 gene promotes a cellular catabolic state, increasing the expression levels of metalloproteinases 3, 9, and 13, as well as the aggrecanase ADAMTS5. Furthermore, an increase in the expression of proinflammatory cytokines such as IL-6 and proinflammatory adipokines such as LCN2 was observed. These results were confirmed by silencing ELF3. These findings were not only limited to degenerated intervertebral disc cells, but ELF3 overexpression in healthy discs was found to cause similar effects, suggesting the crucial participation of ELF3 in the initiation and development of intervertebral disc degeneration disease.

Also, in our research, we explored the pharmacological potential of various molecules capable of regulating ELF3 expression. Within these, we analyzed the activity of dexamethasone, a conventional glucocorticoid, and oleocanthal, a molecule of natural origin with a phenolic structure present in extra virgin olive oil. Our results revealed that both molecules had the ability to decrease ELF3 expression. Moreover, our results showed that oleocanthal was capable of blocking the phosphorylation of the p65 subunit of NFκB, either induced by LPS or IL-1α in degenerated disc cells. Furthermore, this inhibition was accompanied by a reduction in the transcription of inflammatory genes, such as IL-6, NOS2, ELF3, MMP3, MMP13 and ADAMTS5, demonstrating that this substance has great potential for the treatment of inflammatory and catabolic processes in the cells of the degenerated disc.

Keywords: Intervertebral disc degeneration, inflammation, metabolomics, ELF3, oleocanthal.

RESUMO

A dexeneración do disco intervertebral (DD) é unha condición patolóxica caracterizada pola deterioración dun ou máis dos discos situados entre as vértebras, que provoca dor nas costas ou no pescozo. O impacto da DDI, unha enfermidade que actualmente carece de opcións terapéuticas, é cada vez máis notable en todo o mundo. Polo tanto, é de capital importancia aumentar a comprensión dos procesos patóxenos que o subxacen.

Neste traballo describiuse o perfil metabólico e molecular das células do disco intervertebral humano sas e dexeneradas, co fin de comprender as alteracións dos metabolitos dos tecidos asociadas á dexeneración do disco. Os nosos resultados revelaron unha diminución dos niveis de triglicéridos, diacilglicéridos, fosfatidilcolinas, lisofosfatidilinosítoles e algúns ácidos graxos no disco dexenerado en comparación co san, mentres que os niveis de ceramidas e ácidos biliare mostraron un aumento da súa regulación.

Para comprender os novos procesos asociados á dexeneración discal, centramos a nosa atención no estudo da expresión do factor de transcrición ELF3 e na regulación da súa expresión en tecidos sans e dexenerados do disco intervertebral humano. En primeiro lugar, observamos que a estimulación con varios factores inflamatorios (LPS, IL-1 α , IFN γ e TNF α) aumentou a expresión de ELF3.

Considerando a semellanza fisiopatolóxica entre a cartilaxe articular e os tecidos intervertebrais, e a correlación entre ELF3 e xenes implicados na inflamación e catabolismo da matriz extracelular nos condrocitos, queriamos explorar o papel deste factor de transcrición nos procesos inflamatorios intervertebrais. Demostramos que, como na cartilaxe articular, a sobreexpresión do xene ELF3 promove un estado catabólico celular, aumentando os niveis de expresión das metaloproteinasas 3, 9 e 13, así como da agrecanasa ADAMTS5. Ademais, observouse un aumento na expresión de citocinas proinflamatorias como a IL-6 e adipocinas proinflamatorias como a LCN2. Estes resultados confirmáronse silenciando ELF3. Estes achados non só se limitaron ás células dexeneradas do disco intervertebral, senón que a sobreexpresión de ELF3 en discos sans causaba efectos similares, o que suxire que ELF3

participa de maneira crucial no inicio e desenvolvemento da enfermidade de dexeneración do disco intervertebral.

Tamén na nosa investigación, exploramos o potencial farmacolóxico de varias moléculas capaces de regular a expresión de ELF3. Dentro destes, analizouse a actividade da dexametasona, un glucocorticoide convencional, e do oleocantal, unha molécula de orixe natural con estrutura fenólica presente no aceite de oliva virxe extra. Os nosos resultados revelaron que ambas moléculas teñen a capacidade de diminuír a expresión de ELF3. Ademais, os nosos datos mostraron que o oleocantal era capaz de bloquear a fosforilación da subunidade p65 de NFκB, ben inducida por LPS ou IL-1α en células de disco dexeneradas. Ademais, esta inhibición estivo acompañada dunha redución na transcripción de xenes inflamatorios, como IL-6, NOS2, ELF3, MMP3, MMP13 e ADAMTS5, demostrando que esta substancia ten un gran potencial para o tratamento de procesos inflamatorios e catabólicos nas células do disco dexenerado.

Palabras clave: Dexeneración do disco intervertebral, inflamación, metabolómica, ELF3, oleocantal.

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA COLUMNA VERTEBRAL

La columna vertebral es la estructura fundamental que sostiene el cuerpo y sirve de almacén para el sistema nervioso. Este sistema, está formado por una unidad estructural llamada vértebra que da nombre al subfilo animal de los vertebrados. La estructura de la columna vertebral consta de diversos elementos, entre los que se encuentran las vértebras, los discos intervertebrales, los ligamentos y los nervios. En los seres humanos, la columna vertebral está formada por 33 vértebras, de las cuales 7 son cervicales, 12 torácicas, 5 lumbares, 5 sacras (fusionadas formando el sacro) y 4 coccígeas (fusionadas formando el coxis) (Figura 1) [1].

La vértebra típica está formada por el cuerpo y el arco vertebral y proporciona un soporte resistente para la médula espinal que se aloja en su canal central. Este canal, que varía en tamaño a lo largo de la columna, actúa como un conducto protector para la médula espinal desde donde surgen los nervios espinales, que forman el tronco simpático que se ramifican hacia diferentes áreas del cuerpo, y los nervios esplácnicos [1].

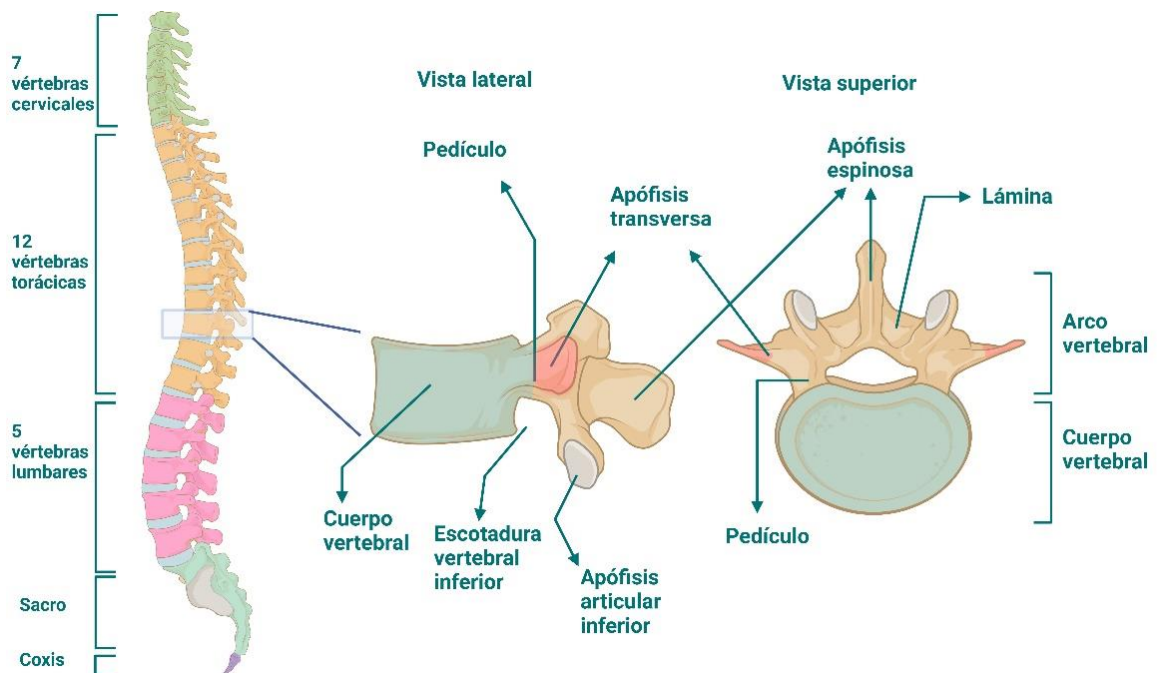


Figura 1. Representación de la columna vertebral y los subtipos de vértebras existentes, junto con la representación de una vértebra típica y sus partes en vista lateral y superior.

Figura de elaboración propia (Biorender®).

1.2 EL DISCO INTERVERTEBRAL

El disco intervertebral es una estructura fibrocartilaginosa que se encuentra entre los cuerpos vertebrales de la columna vertebral. El disco intervertebral sirve como amortiguador de las vértebras, absorbiendo los impactos y permitiendo la movilidad de la columna. El disco está formado por dos estructuras básicas: el anillo fibroso (AF) y el núcleo pulposo (NP). Ambas estructuras están rodeadas en la parte superior e inferior por placas terminales cartilagosas (CEP), que se adhieren a los cuerpos vertebrales y suministran nutrientes vitales tanto al AF como al NP (Figura 2) [2]. Las células del AF y del NP se encuentran dentro de un nicho que da lugar a una matriz extracelular especializada y a una estructura avascular en el interior del disco intervertebral [3,4].

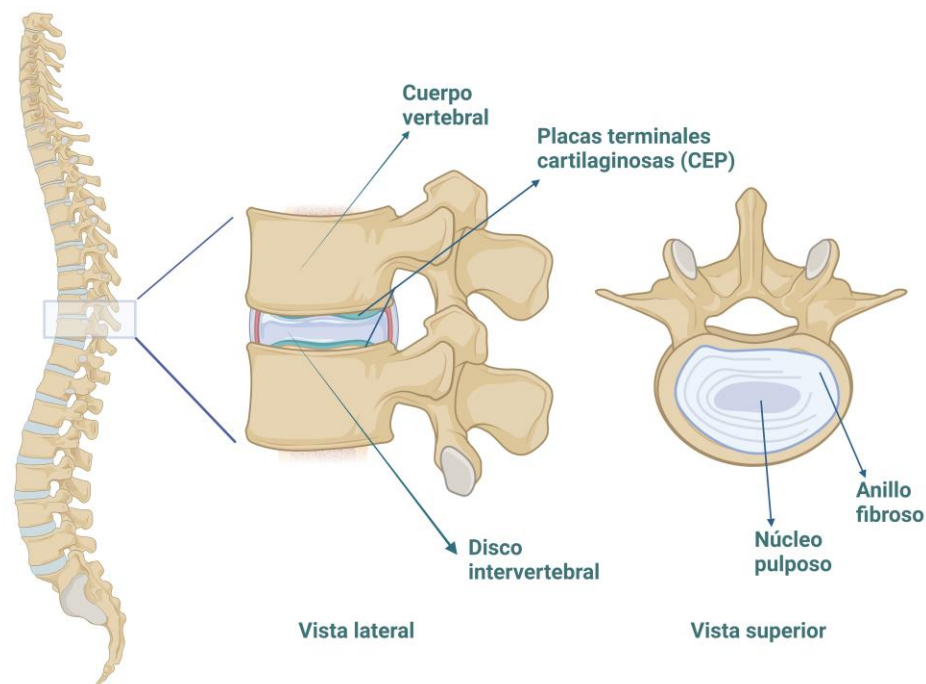


Figura 2. Esquema de la estructura del disco intervertebral.

Estructura anatómica del disco intervertebral. Figura de elaboración propia (Biorender®).

El disco intervertebral se forma en la cuarta semana del desarrollo embrionario, a partir de fragmentos del esclerotomo, que son porciones de los somitas derivados del mesodermo paraaxial. Entre las partes cefálica y caudal de los esclerotomos segmentarios se localizan células mesenquimales. Estas células desempeñan un papel fundamental durante la quinta semana de gestación al llenar el espacio entre dos cuerpos vertebrales pre-cartilagosos, contribuyendo así de manera significativa a la conformación del disco intervertebral [5].

En la zona de los cuerpos vertebrales, la notocorda comienza un proceso de retroceso y segregación a lo largo del eje anteroposterior. Con el tiempo, la notocorda se expande y juega un papel crucial en la formación del núcleo pulposo. En esta etapa temprana del desarrollo, el núcleo pulposos está principalmente compuesto por células derivadas de la notocorda. Por lo tanto, es importante destacar que los tejidos que componen los discos intervertebrales tienen su origen en células notocordales y células mesenquimales derivadas del esclerotoma (Figura 3) [5]. Este proceso de formación del disco intervertebral es fundamental para la estructura y funcionalidad de la columna vertebral en el desarrollo posterior.

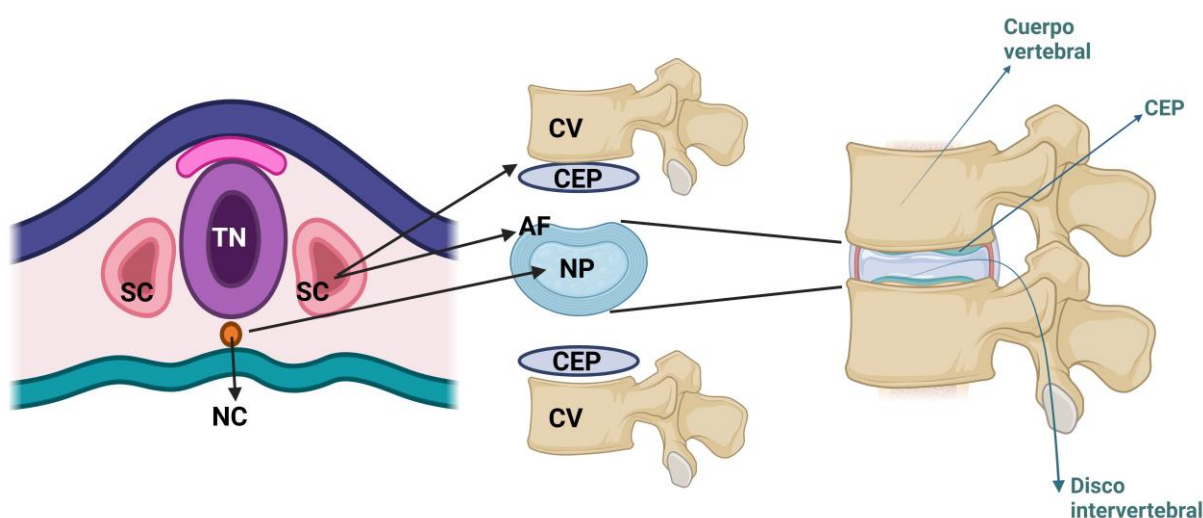


Figura 3. Representación gráfica del desarrollo de las vértebras y los discos intervertebrales a partir de la notocorda y el esclerotoma.

En la imagen izquierda, se representa un esquema de un embrión en los días 10.5 y 11.5 de desarrollo, mientras que en la imagen derecha se muestra el esqueleto axial maduro. El núcleo pulposos se forma a partir de la notocorda, mientras que el anillo fibroso y otros tejidos, como el cuerpo vertebral, los ligamentos y las placas terminales, se originan a partir del esclerotoma. TN (tubo neural), SC (esclerotoma), NC (notocorda), CV (cuerpo vertebral), NP (núcleo pulposos), AF (anillo fibroso), y CEP (placa terminal cartilaginosa). Figura de elaboración propia (Biorender®).

1.2.1 Núcleo Pulposos

El núcleo pulposos (NP) conforma la parte interna del disco (Figura 4), posee consistencia de gel y está formado principalmente por agua en un 70-90%, colágeno tipo II y proteoglicanos (agrecano, ácido hialurónico y pequeños proteoglicanos ricos en leucina). El núcleo pulposos separa las dos vértebras distribuyendo la presión en las placas terminales cartilaginosas adyacentes. Las moléculas de proteoglicanos presentes en esta estructura están dotadas de carga negativa, y juegan un papel fundamental en la retención de agua, lo cual contribuye a mantener

un alto nivel de hidratación en el disco intervertebral, permitiendo resistir a deformaciones reversibles, especialmente relacionadas con la compresión. Sin embargo, se ha observado que el envejecimiento produce una disminución en la presencia de estos proteoglicanos y de la capacidad de retención de agua.

Desde un punto de vista celular, el núcleo pulposo está compuesto por células notocordales y células similares a condrocitos (llamadas condrocitos-like). Como se ha mencionado anteriormente, la función principal del núcleo pulposo radica en su capacidad para soportar cargas compresivas sin sufrir colapso, asegurando una distribución equitativa de estas cargas hacia otros componentes del disco intervertebral y a lo largo de la columna vertebral. Las células del núcleo pulposo obtienen energía principalmente del proceso metabólico de la glucólisis.

1.2.2 Anillo Fibroso

El anillo fibroso (AF) es la parte externa con forma anular que recubre la parte interna del disco y la protege (Figura 4). Su estructura está formada por hebras de colágeno cuya disposición en capas concéntricas da fuerza y estabilidad al disco intervertebral. El anillo fibroso es una estructura más rígida en comparación con el núcleo pulposo, y principalmente está compuesto de colágeno tipo I, proteoglicanos agregados y no agregados, que contiene un alto porcentaje en agua (60-80%).

Desde un punto de vista estructural, el anillo fibroso está compuesto aproximadamente de 15 a 25 anillos dispuestos de forma concéntrica que contienen fibras de colágeno dispuestas de forma oblicua entre ellas.

Además de esta red de colágeno, se encuentra presente una red de fibras de elastina que contribuyen a conformar la estructura del AF. Se ha observado que el AF interno exhibe una mayor concentración de glucosaminoglicanos en comparación con el AF externo, y también presenta una menor densidad celular. Las células del AF han sido caracterizadas como fibroblastos de morfología alargada con prolongaciones citoplasmáticas extensas. Sin embargo, con el proceso de envejecimiento, la morfología celular puede variar, volviéndose más redondeadas y adquiriendo una naturaleza similar a la de los condrocitos.

1.2.3 Placas terminales cartilaginosas

En la parte más externa del disco intervertebral, se encuentran las placas terminales cartilaginosas (CEP) formando una capa horizontal delgada (1mm de espesor aproximadamente) (Figura 5), compuesta por fibras de colágeno orientadas horizontalmente y paralelas a las vértebras. Esta estructura supone la vía principal por la cual llegan los nutrientes entre los capilares y las células discales mediante difusión y separan el núcleo pulposo y el anillo fibroso del cuerpo vertebral adyacente.

El agua constituye el 58% del peso total del CEP, mientras que el porcentaje de peso en seco de glucosaminoglicanos sulfatados (s-GAG) representa el 17% y el de colágeno oscila entre el 60% y el 80% del peso en seco [6]. Desde un punto de vista estructural, las células del CEP presentan similitudes morfológicas con las células del cartílago hialino articular, y al igual que este tejido, la placa terminal también se caracteriza por estar formada de condrocitos inmersos en una matriz extracelular rica en agregano y colágeno tipo II [6].

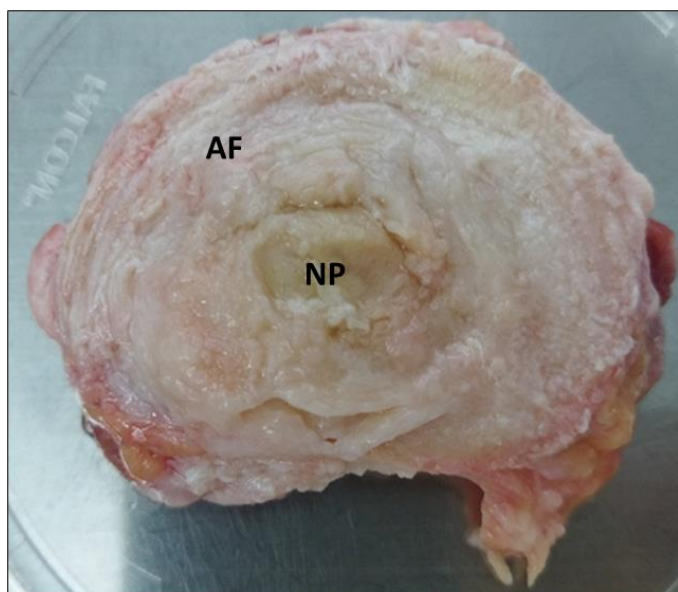


Figura 4. Disco intervertebral sano.

Estructura del disco intervertebral sano, imagen tomada de una muestra de sujeto sano previa al protocolo de extracción celular. Anillo fibroso (AF); Núcleo pulposo (NP). Imagen de archivo propio.

Los nutrientes difunden por gradiente de concentración desde los capilares pasando por las placas terminales cartilaginosas hasta las células de disco internas, donde los productos de desecho viajan en dirección totalmente opuesta, lo cual genera un aporte de nutrientes limitado y niveles de acidez más altos [7]. Además, la característica única del disco intervertebral, es

que el núcleo pulposo está aislado del sistema nervioso, convirtiendo al disco intervertebral en un órgano inmune privilegiado [3]. Con el paso de los años, el CEP comienza a calcificarse, lo cual merma el suministro de nutrientes hacia el núcleo pulposo.

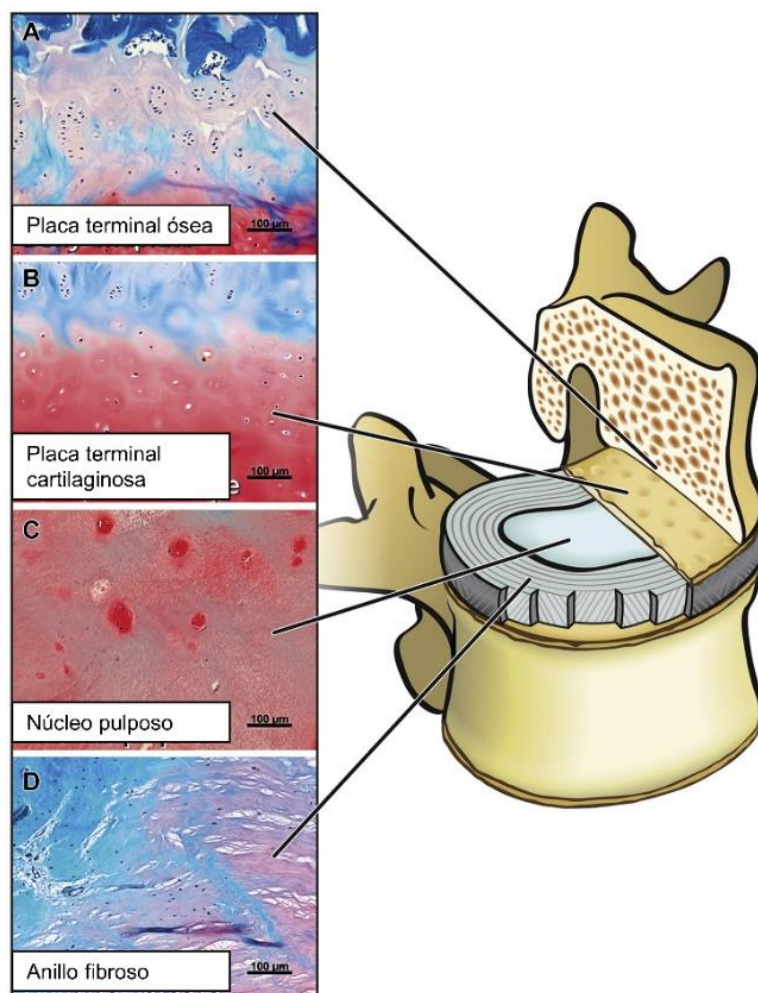


Figura 5. Composición del disco intervertebral a nivel tisular y anatómico.

En la figura podemos ver una representación gráfica de las partes que forman el disco intervertebral, junto con la correspondiente histología de cada tejido. Figura adaptada de Kirnaz et al (2022) [8].

1.2.4 Matriz extracelular en el disco intervertebral

La matriz extracelular (ECM) es una estructura compuesta por cientos de proteínas. En el caso del disco intervertebral, la matriz está compuesta principalmente de colágenos, proteoglicanos y proteínas no colágenas [9]. En el caso del núcleo predomina el agua y los proteoglicanos, mientras que en el caso del anillo fibroso predomina el colágeno y el agua (Figura 6).

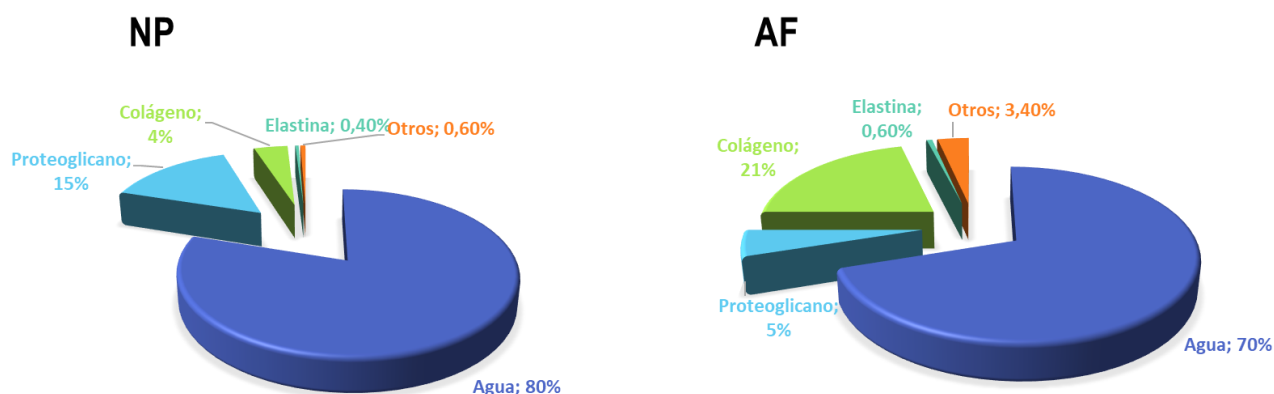


Figura 6. Porcentaje de composición de la matriz extracelular en el núcleo pulposo (NP) y anillo fibroso (AF) de disco intervertebral sano.

En la figura podemos observar los diferentes porcentajes de agua (80% NP, 70% AF), proteoglicano (15% NP, 5% en AF), colágeno (4% NP, 21% AF), elastina (0,40% NP, 0,60%AF) y otros componentes. Imagen de elaboración propia.

1.2.4.1 Colágenos

Los colágenos son los principales componentes de la matriz y confieren a las células soporte mecánico. Los colágenos poseen la capacidad de actuar en los receptores de membrana (integrinas) y regulan diferentes procesos como la migración, proliferación y diferenciación de las células [10].

Existen tres tipos de colágenos: fibrilares (tipos I, II, III, V y XI), formadores de red (IV y VI) y asociados a fibrillas con triple hélice (colágeno tipo IX) [11]. Los colágenos fibrilares se encuentran en su mayor parte en forma de heterotrímeros, aunque también se pueden encontrar como homotrímeros para formar fibras de colágeno.

La principal parte de la matriz fibrilar del disco está constituida por los subtipos de colágeno I y II, y en menor cantidad los subtipos III, V, VI, IX y XI [12,13]. El subtipo II se encuentra principalmente en el núcleo pulposo y en la placa cartilaginosa terminal. El núcleo pulposo se encuentra formado por fibras dispuestas con una orientación al azar [14]. Por lo que respecta al anillo fibroso, está formado principalmente por colágeno tipo I en su parte externa, mientras que la parte interna posee en mayor abundancia el tipo II. Durante el desarrollo del tejido del anillo fibroso, las fibras se posicionan formando láminas orientadas en red [15]. Cuando existe una degeneración de disco intervertebral, algunos tipos de colágeno pueden cambiar a otros, como es el caso del II que transiciona a I [16]. Además, cuando se produce la degeneración se puede ver un cambio en la distribución de éstos, acumulándose más el subtipo I en el núcleo pulposo y en el anillo interno y el subtipo II en la parte externa del anillo [17].

1.2.4.2 Proteoglicanos

Los proteoglicanos son moléculas que juegan un papel importante en el correcto funcionamiento de los discos intervertebrales. Son macromoléculas formadas por proteínas y cadenas de glucosaminoglicanos. El proteoglicano más abundante que existe en los discos intervertebrales es el agrecano. Éste es responsable de la capacidad de retención de líquidos debido a su densidad de carga fija [16]. Ésta es otorgada por la cantidad de grupos de carga negativa en su estructura, como grupos sulfato y carboxilo. La alta densidad de carga fija capacita al agrecano para atraer y mantener moléculas de agua en la matriz del disco, lo que contribuye a preservar la elasticidad y resistencia de los discos [16].

El agrecano puede agregarse a lo largo de cadenas de ácido hialurónico por enlace proteico. Este enlace muestra afinidad tanto por el ácido hialurónico como por el agrecano (en concreto el dominio G1 de su núcleo), y estabiliza las interacciones entre ellos, protegiendo de la degradación en condiciones catabólicas [18,19].

A medida que el disco envejece y degenera, el agrecano se escinde en fracciones que pierden la capacidad de agregarse, y por tanto reduce la capacidad de hidratación del disco intervertebral [20].

La malla de fibras de colágeno en el núcleo pulposo normal atrapa a los agregados de agrecanos y junto con los proteoglicanos polianiónicos favorecen la retención del agua, el mantenimiento de la homeostasis y la estabilidad del disco intervertebral contra la carga por compresión [21].

Entre otros proteoglicanos de gran dimensión, nos encontramos con el versicano, que tiene un rol importante en la división, adhesión o la diferenciación de la matriz. Su expresión es mucho mayor en disco que en cartílago articular y predomina sobre todo en el núcleo pulposo, actuando como protector al promover la proliferación y adhesión de las células del núcleo [22].

En la matriz extracelular se encuentran también otro tipo de proteoglicanos pequeños ricos en leucina, como la decorina, el biglicano, la fibromodulina y el lumicano, que contribuyen al ensamblaje de la matriz mediante la unión a otras proteínas de la matriz como los colágenos [23].

1.2.4.3 Fibras elásticas

La composición de estas fibras consiste en un núcleo central compuesto de elastina. Dicha elastina está rodeada de microfibrillas de fibrilina, proteínas de unión al factor de

crecimiento transformante beta (TGF- β) latentes y microfibrillas asociadas a glicoproteínas [24]. En el anillo fibroso, las fibras elásticas se ordenan en la misma dirección que las fibras de colágeno (láminas) formando en su conjunto una red integrada [25].

1.3 LA DEGENERACIÓN DE DISCO INTERVERTEBRAL

El dolor lumbar es una de las principales causas de discapacidad con un coste social y económico creciente [26,27]. Según los datos recogidos en el Estudio de la Carga Global de Enfermedades 2021 ("Global Burden of Disease Study 2021"), la incidencia de esta dolencia alcanza alrededor de 619 millones de individuos a nivel mundial. Basándose en estas cifras, se prevé un aumento significativo que llevaría esta cantidad a 843 millones para el año 2050 [27]. Como podemos ver en la Figura 7, la tasa de prevalencia estandarizada por edad más alta en 2020 fue en Europa central, seguida del este de Europa y Australia. Debido a ello, el dolor lumbar es considerado un problema de salud pública creciente de suma importancia para la población. Aproximadamente entre el 70% y el 85% de la población occidental sufre estos síntomas a lo largo de su vida [28] y esto no es solo incapacitante para las personas, sino que se convierte en una carga para el sistema sanitario, la economía y la sociedad en general [29]. El dolor lumbar es una de las principales causas de discapacidad, siendo su prevalencia incluso más alta que la depresión mayor, la diabetes y las enfermedades cardíacas [30].

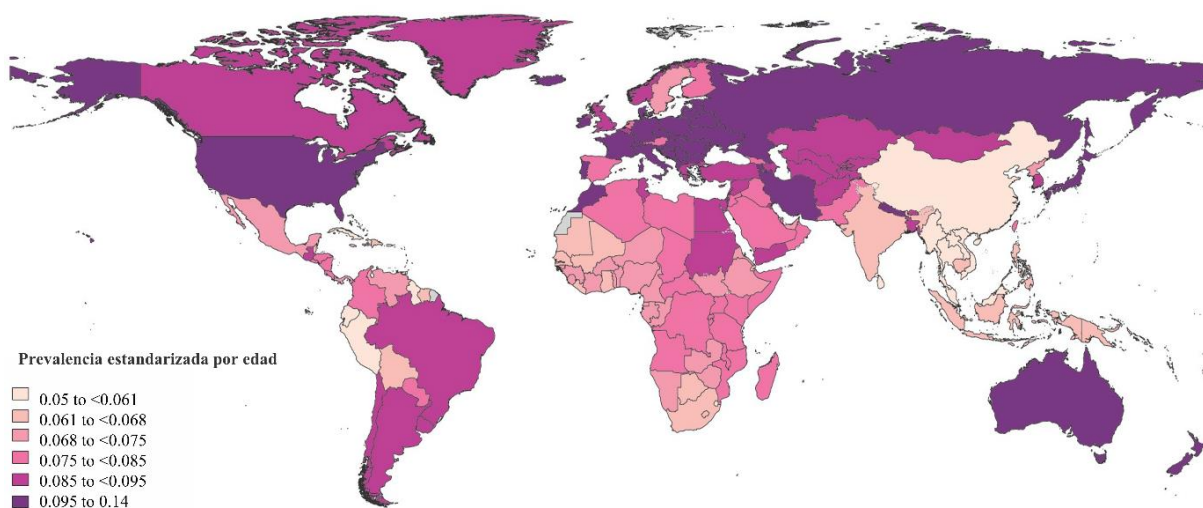


Figura 7. Prevalencia estandarizada del dolor lumbar por país en 2020.

Prevalencia mundial del dolor lumbar en el año 2020. Análisis recogido del "Global Burden of Disease 2021". Imagen libre: Creative Commons CC-BY license, extraída de [31].

El dolor lumbar es causado principalmente por la degeneración de disco intervertebral (DDI), una afección musculoesquelética crónica [32]. El deterioro de los discos conlleva la pérdida de su capacidad para funcionar correctamente, lo que desencadena la DDI. Entre los síntomas más relevantes de esta degeneración se encuentran el dolor de espalda, la rigidez y la reducción de la movilidad, aspectos que pueden limitar significativamente el bienestar del paciente.

La DDI es una enfermedad compleja debida a múltiples procesos que pueden causar un dolor de espalda crónico y otras complicaciones. Este trastorno generalmente lleva asociado alteraciones metabólicas y estructurales del disco [2]. La DDI está caracterizada por un daño de las placas terminales cartilaginosas, comprometiendo la nutrición tanto del núcleo pulposo como del anillo fibroso. Esto perturba el metabolismo celular llevándolo a procesos catabólicos, como la degradación de la matriz, y otros cambios de los tejidos como fibrosis o la pérdida de masa en el disco [2]. En este escenario, la respuesta inflamatoria también juega un papel importante en la DDI. El deterioro de los discos intervertebrales, supone la liberación de mediadores inflamatorios, entre ellos citoquinas y enzimas proteolíticas, en las proximidades de los mismos. Estos factores proinflamatorios activan células inmunitarias y no inmunes, originando una respuesta inflamatoria a nivel local [33]. Este tipo de inflamación a largo plazo termina por cronificarse y dañar aún más los discos intervertebrales y las estructuras adyacentes a los mismos, produciendo una mayor degeneración de los discos intervertebrales.

La causa precisa de esta enfermedad es desconocida, pero hay múltiples factores que intervienen en su aparición, como la edad, la genética, el esfuerzo mecánico, traumatismos, el tabaquismo, la obesidad y la inflamación. En los últimos años se han incrementado los esfuerzos para desarrollar tejidos basados en biomateriales como estrategia de regeneración celular para la enfermedad de DDI [34]. Aunque su desempeño en entornos clínicos ha sido muy limitado y por lo tanto la necesidad de una investigación más exhaustiva sobre los mecanismos subyacentes de la enfermedad sigue siendo una prioridad [35]. Esto es aún más importante cuando actualmente solo existen opciones limitadas de terapia quirúrgica que lamentablemente solo mejoran los síntomas clínicos a corto plazo [36].

1.3.1 Escala Pfirmann

Para evaluar el grado de degradación de los discos intervertebrales, se utiliza habitualmente la escala de Pfirmann, en la que, mediante imágenes de resonancia magnética evalúa el grado de degradación. Esta escala, que clasifica de manera sistemática y objetiva la degeneración discal en 5 grados de severidad, siendo el I el disco sano, y el grado V el disco en su estado más degenerado (Figura 8). Los discos degenerados utilizados en esta tesis eran clasificados, según esta escala en grados IV y V de degeneración. Conforme avanza el grado de degeneración, las estructuras del disco intervertebral se van perdiendo (Figura 9), hasta llegar a un punto en el que las partes del disco casi no se diferencian entre sí (Figura 9D).

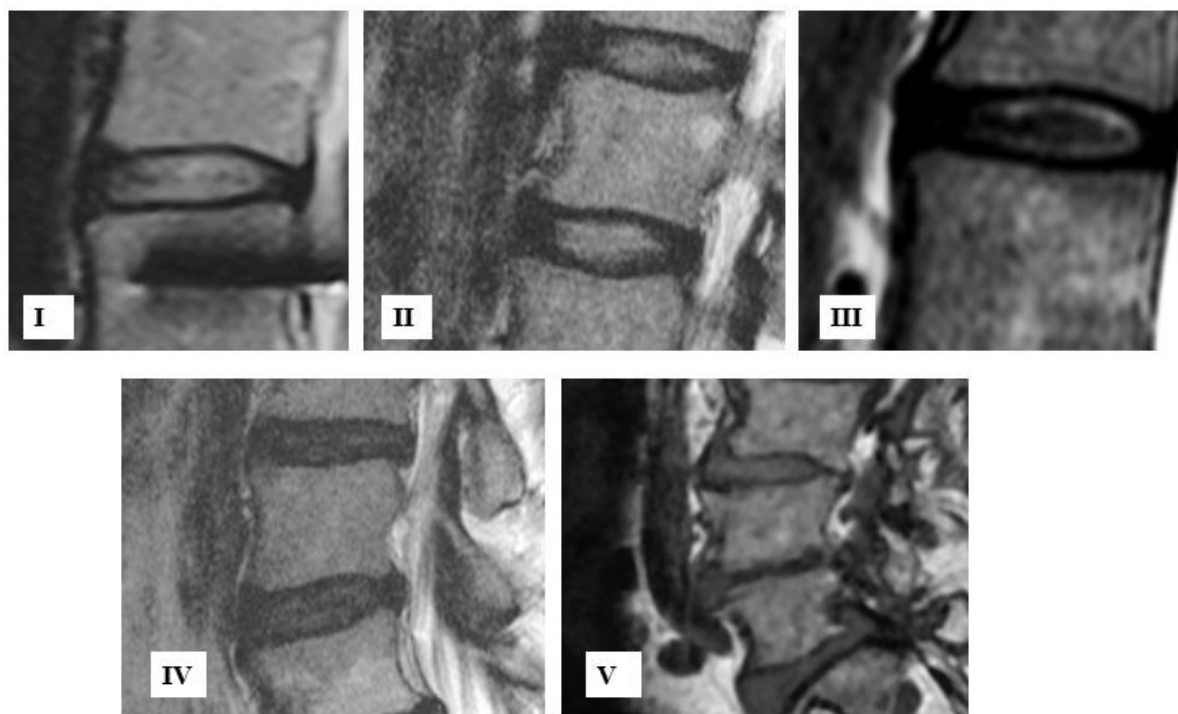


Figura 8. Escala de Pffirman representada con resonancias magnéticas de paciente. Las imágenes se obtuvieron de pacientes con DDI, obteniendo sus consentimientos informados correspondientes.

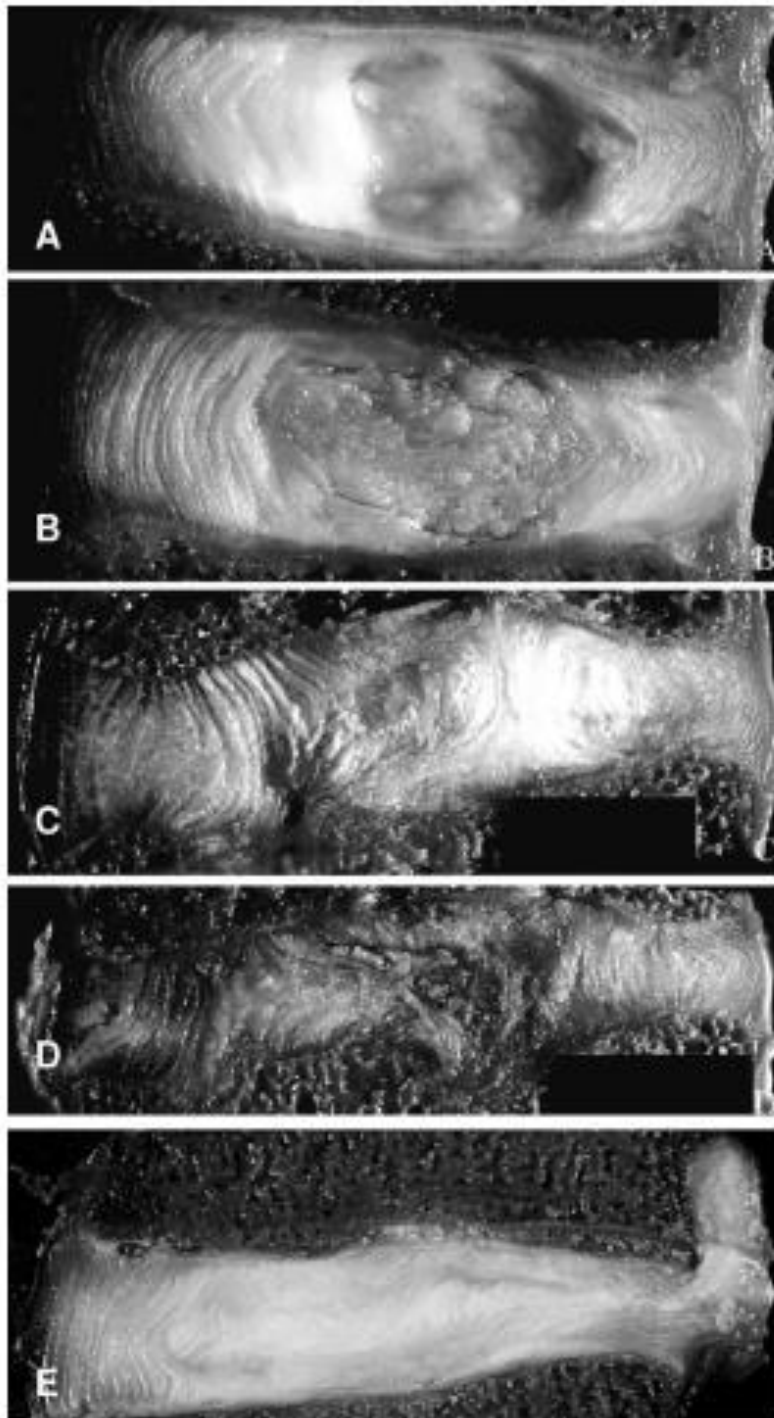


Figura 9. Discos intervertebrales procedentes de cadáveres seccionados en plano sagital medio. (A) Disco sano procedente de paciente de 35 años. (B) Disco maduro de paciente de 47 años. (C) Disco de paciente de 31 años de edad. (D) Disco joven degenerado gravemente (31 años). (E) Disco inducido al prolapso en laboratorio. Los discos de la A a la D corresponden a la escala de degeneración de disco intervertebral. Imagen adaptada de Adams et al.2006 [37].

1.4 CAMBIOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LA DEGENERACIÓN DE DISCO INTERVERTEBRAL

La matriz extracelular puede verse influenciada por varios factores como son la nutrición, la sobrecarga mecánica y la diabetes, entre otros. Estos factores causan un cambio en la homeostasis de la misma y, por lo tanto, esto se traduce en lesiones en las células de disco. La degeneración discal viene acompañada de una transformación primaria de las células del núcleo pulposo tipo notocordales a tipo condrocitos [38].

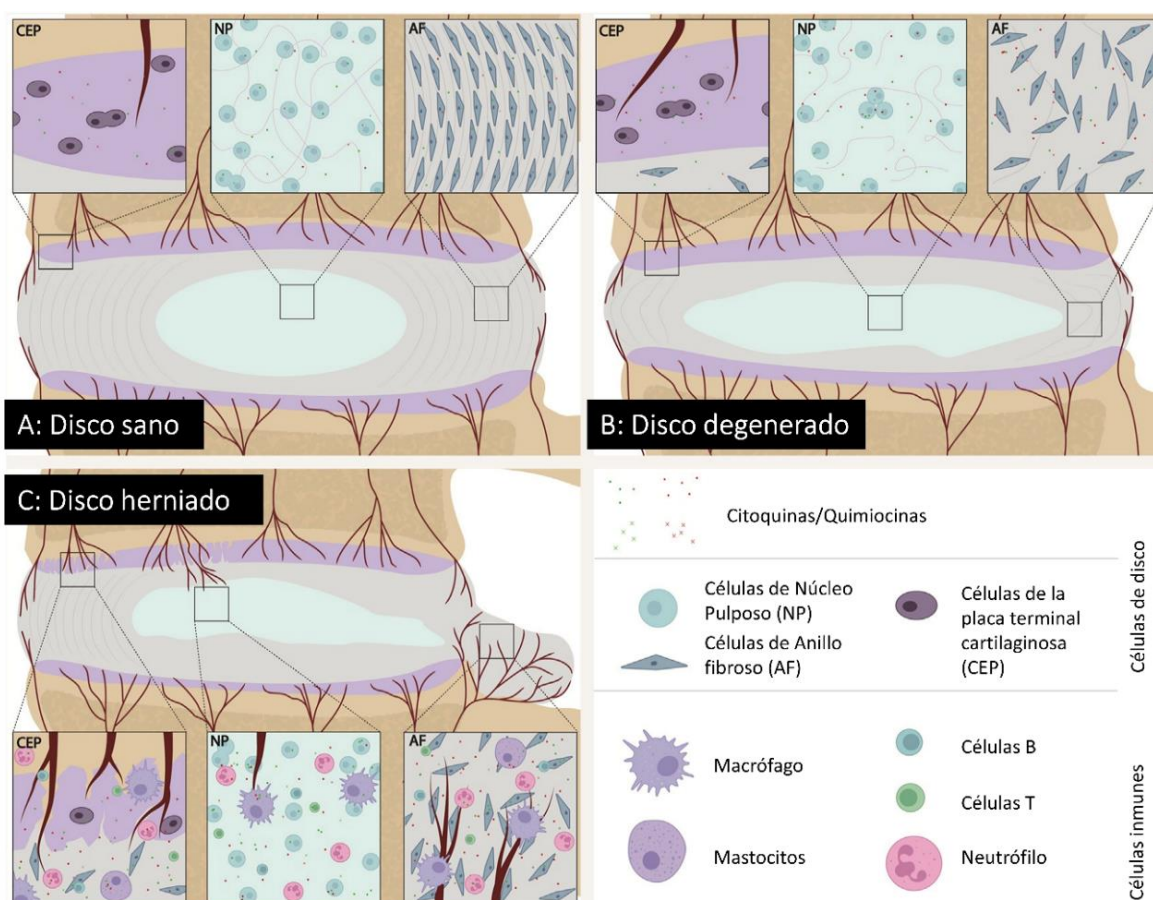


Figura 10. Representación de los cambios de composición según el estado patológico del disco intervertebral. (A) Disco intervertebral sano: las células del disco producen una cantidad comedida de citoquinas y quimiocinas que mantienen la homeostasis del mismo de forma paracrina y autocrina. Las células de NP están formadas por un alto contenido de proteoglicanos, las células de AF están alineadas y los vasos sanguíneos del CEP intactos. (B) Disco degenerado: las células se rodean en este caso de un entorno catabólico. Las citoquinas son expresadas por las propias células del disco. El número de los vasos sanguíneos del CEP aumenta, la cantidad de proteoglicanos del NP disminuye y hay una pérdida de la alineación de las células de AF. (C): Disco herniado con fisura en el CEP: Cuando se origina una lesión o degeneración de disco, las células inmunitarias migran hacia el disco intervertebral. Las células inmunitarias, incluidas las células T, las células B, los macrófagos, los neutrófilos y los mastocitos, contribuyen a un ambiente inflamatorio dentro del disco, lo que aumenta aún más la expresión de citoquinas y quimiocinas y contribuye a un círculo vicioso de catabolismo impulsado por la inflamación. Se produce el crecimiento de vasos sanguíneos. Imagen reproducida con permisos de Bermudez-Lekerika et al. Imagen libre: Creative Commons CC-BY license [39].

El correcto mantenimiento estructural de las células de disco intervertebral es muy importante para el correcto mantenimiento de la matriz, ya que afecta a su composición [40,41]. Además de los cambios estructurales mencionados anteriormente, durante la degeneración se observa un notable aumento en la expresión de una gran cantidad de citoquinas derivadas del núcleo durante la degeneración (Figura 10), que a su vez aumentan la expresión de proteasas que participan en la remodelación de la matriz (Figura 11) [42,43].

1.4.1 Metaloproteinasas de la matriz (MMPs)

Las metaloproteinasas (MMPs) entran dentro de la categoría de endopeptidasas dependientes de calcio que poseen zinc. En total, a día de hoy, se conocen 23 MMPs diferentes, clasificadas en: colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisinas, MMP tipo membrana y otros tipos no clasificados [44,45]. Las metaloproteinasas de tipo colagenasa (MMP1, MMP8, MMP13 y MMP18) se encargan de escindir principalmente colágenos fibrilares y las gelatinasas (MMP2 y MMP9) degradan aquellos colágenos que están desnaturalizados, como las gelatinas y laminina. Por otro lado, existen las estromelisin (MMP3, -19 y -11) que se encargan de la proteólisis de proteoglicanos, gelatinas y colágenos y las matrilisinas (MMP7 y -26) que actúan sobre el agregano [45]. Por último, las metaloproteinasas tipo membrana (MMP14, -17, -24, y -25) se encuentran en la membrana plasmática y participan en la transducción de vías de señalización y activación de otras MMP. El resto de metaloproteinasas no están clasificadas, pero igualmente participan en la degradación de los componentes de la matriz extracelular.

En condiciones fisiológicas, las metaloproteinasas se expresan en niveles bajos. No obstante, durante procesos de reparación o inflamación, se observa un aumento significativo en la expresión de estas enzimas [44]. Este fenómeno se ejemplifica en el tejido del disco intervertebral, donde los niveles de metaloproteinasas son notablemente inferiores en discos sanos en comparación con discos degenerados [46]. De hecho, los niveles de MMPs aumentan proporcionalmente al nivel de degeneración de disco intervertebral [47]. La presencia de la expresión de MMPs en el disco intervertebral degenerado ha sido observada en varios modelos animales, estableciéndose una conexión que permite anticipar el grado de severidad de la degeneración. Esta predicción se basa en la correlación existente entre los niveles de metaloproteinasas y la intensidad de la degeneración [48,49].

Cuando la presión soportada por el disco intervertebral se incrementa, el núcleo pulposo responde generando niveles elevados de MMPs. En concreto, se ha observado un aumento en la MMP13 debido a la presión sostenida en el disco intervertebral, lo que desencadena el estado catabólico en ese tejido [50]. Además de la presión, el entorno inflamatorio también contribuye al incremento de expresión de determinadas MMPs [51]. Algunas citoquinas inflamatorias tienen la capacidad de inducir el poder hidrolítico de la MMP2, aumentando la expresión de las metaloproteinasas de tipo membrana [52].

El estrés oxidativo y la aparición de especies reactivas del oxígeno tienen relación con la sobreactivación de las metaloproteinasas [53]. Experimentos en células de núcleo pulposo tratadas con peróxido de hidrógeno, han demostrado un incremento en la expresión de MMP1, MMP3 y MMP9 [54]. Se ha descrito recientemente que el estrés oxidativo produce una reducción de proteínas antioxidantes (FOXO) y un aumento de la MMP13 lo cual promueve el estado catabólico del disco [55].

Hoy en día se están estudiando numerosas terapias dirigidas para tratar la degeneración de disco usando como diana las MMPs. Ejemplos de ello son el uso de ácido ferúlico como diana para la MMP3 [56], o bien el miR-29a dirigida a la MMP2 [57], ambos utilizando hidrogeles como método de suministro de estas moléculas.

1.4.2 Desintegrinas y metaloproteasas con motivos de trombospondina

Existe otra familia de metaloproteasas que contienen trombospondina en su dominio, son las llamadas desintegrinas y metaloproteasas con motivos de trombospondina (ADAMTS). Estas proteínas tienen la capacidad de unirse a los componentes de la matriz extracelular y promover la proteólisis de la misma [58]. Dependiendo de su función y unión a sustratos se clasifican en: hialectanasas (ADAMTS1, -4, -5, -8, -9, -15 y -20) que se unen a los proteoglicanos; N-propeptidasas de procolágeno (ADAMTS2, -3 y -14) que se dirigen a los colágenos I, II y III; ADAMTS13 escinde el factor de von Willebrand, relacionado con la coagulación; y el resto de ADAMTS no están clasificadas por desconocimiento de su función [9].

En la degeneración de disco, las hialectanasas juegan un papel muy importante, ya que son las encargadas de degradar el agregado, que es uno de los proteoglicanos degenerados asociados a la enfermedad [59]. Durante el proceso de degeneración de disco, ADAMTS1, -4, -5, -9 y -15 se acumulan y participan en la modificación de la matriz extracelular [60]. Se ha demostrado que el tratamiento con citoquinas inflamatorias aumenta la expresión de ADAMTS5 a través

de sindecán-4, aumentando la progresión de la degeneración de disco [61]. También, en modelos animales de compresión se ha visto un incremento de ADAMTS4 y -5 [62].

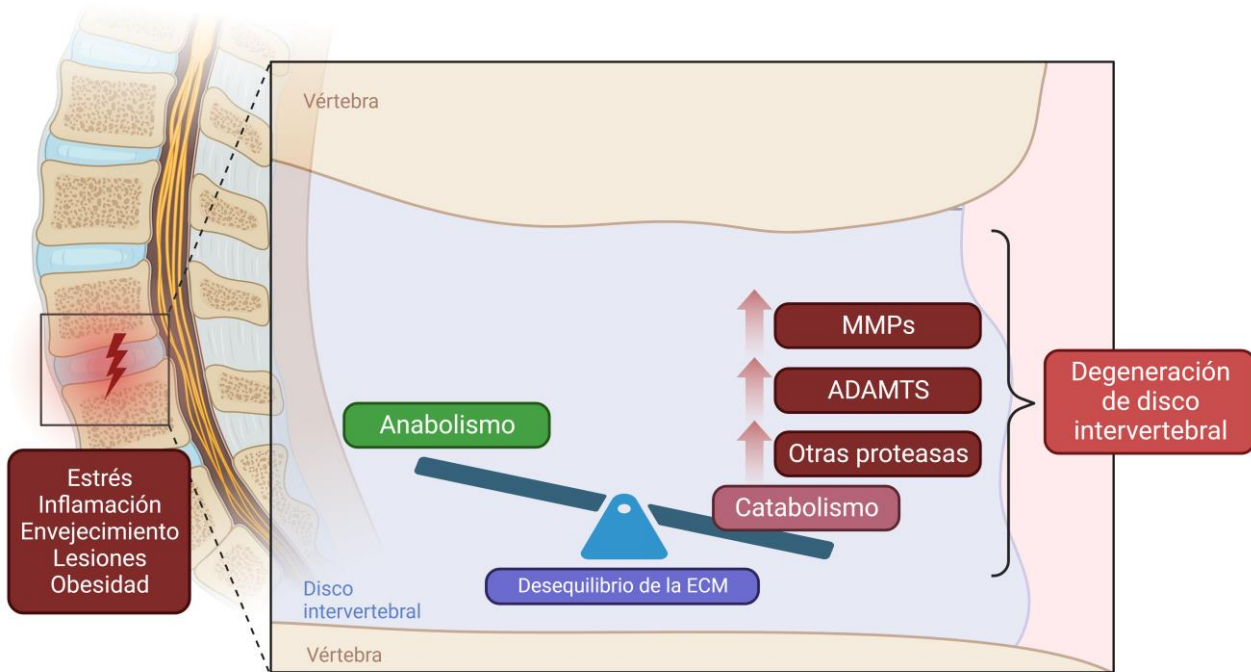


Figura 11. Esquema gráfico sobre la implicación de las MMPs y ADAMTSs en la degeneración de disco. Figura de elaboración propia (Biorender®).

1.4.3 Proteasas de serina

Las proteasas de serina también se han descrito como moléculas involucradas en la patogénesis de la degeneración de disco intervertebral. La plasmina, una de las proteasas de serina encargadas de degradar el disco intervertebral, se produce a través de plasminógeno y degrada la fibrina del disco. Esta degradación propicia la patogénesis del disco intervertebral y afecta a la estructura del disco [63].

La proteasa nexin-1 (PN-1) también conocida como miembro 2 de la familia de las serpinas E (SERPINE2) es un inhibidor de proteasa de serinas que pertenecen a la superfamilia de las serpinas [64]. El grupo de Wu *et al.*, describió que la proteasa nexin-1 se expresa en el disco intervertebral y su expresión aumenta durante el proceso de degeneración. Este mismo grupo pudo demostrar que la SERPINE2 es capaz de inhibir la activación de las MMPs y ADAMTS a través de la vía de señalización regulada por quinasas extracelulares 1/2 / factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (ERK1/2/NFκB) [64].

1.5 FACTORES DE RIESGO Y DESENCADENANTES DE LA DEGENERACIÓN DE DISCO INTERVERTEBRAL

La enfermedad de degeneración de disco intervertebral, se ve afectada por una serie de factores que pueden desencadenar su inicio y perpetuar su gravedad. Entre ellos podemos encontrar factores mecánicos, biológicos, inflamatorios y metabólicos, teniendo un papel fundamental el sobrepeso y los procesos inflamatorios (Figura 12).

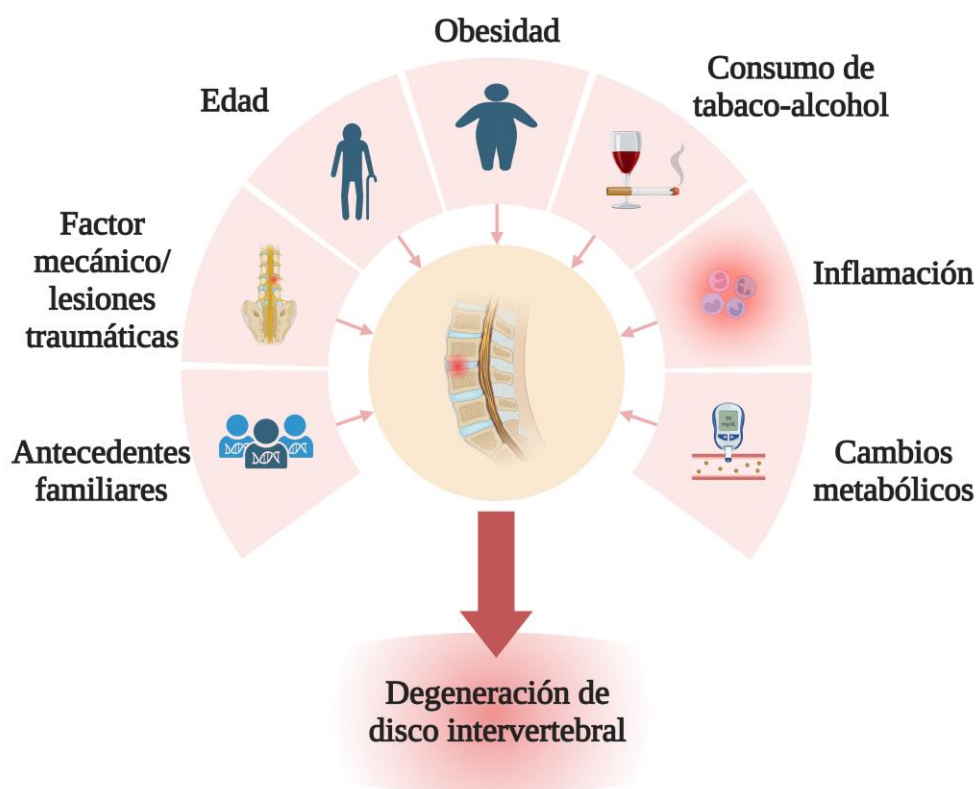


Figura 12. Principales factores de riesgo y desencadenantes de la enfermedad de degeneración de disco intervertebral.

Figura de elaboración propia (Biorender®).

1.5.1 Factor mecánico

La carga y descarga repetida de la columna vertebral puede provocar el desgaste y degeneración de los discos. Actividades técnicas de levantamiento inapropiadas, malas posturas, actividades deportivas o relacionadas con el trabajo, ejercen una tensión repetitiva sobre la columna vertebral que acaban generando un sobreesfuerzo y malfuncionamiento de los discos [65]. La obesidad es un factor que influye por el aumento de carga mecánica, además del aumento en la producción de adipocinas y el factor de riesgo inflamatorio [66].

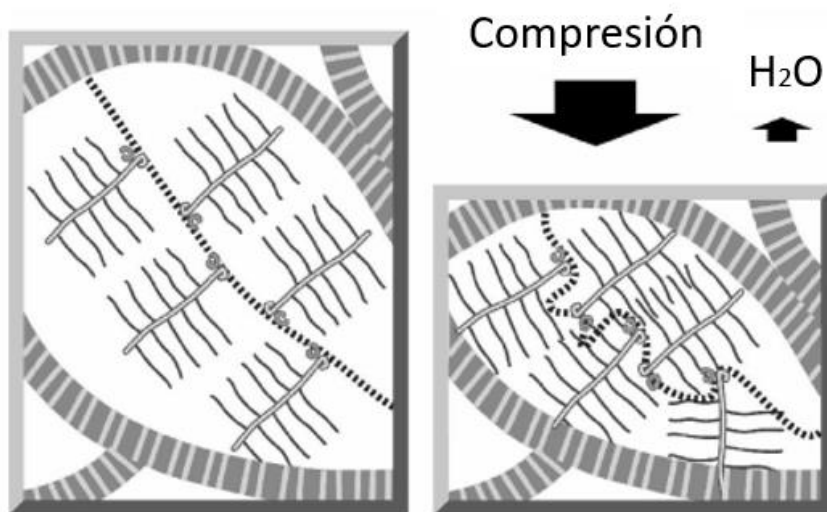


Figura 13. Función de resistencia del agregano y el colágeno en el disco intervertebral. Representación del núcleo pulposo con agregados de proteoglicanos en una fibra de colágeno. Los agregados de proteoglicanos se representan como una molécula de hialuronato central (línea discontinua) sustituida con moléculas de agregano que poseen una proteína de núcleo central (línea abierta) y cadenas laterales de glucosaminoglicano sulfatado (línea continua). Figura adaptada de Adams et al. 2006 [37].

El agregano es el proteoglicano más abundante en el disco intervertebral, y junto con los glucosaminoglicanos aniónicos (sulfato de condroitina y sulfato de queratán), otorgan al disco intervertebral propiedades osmóticas que permiten la resistencia a la compresión (Figura 13). El núcleo y su alto contenido de agua hace que este tejido sea muy gelatinoso y la parte externa del anillo actúe como contenedor del mismo. Con el paso del tiempo y aumento de la edad, el porcentaje de agua se ve disminuido, especialmente en la parte interna (núcleo) lo que hace que la resistencia del disco intervertebral se vea reducida notablemente y por ende la resistencia a la compresión del mismo [37].

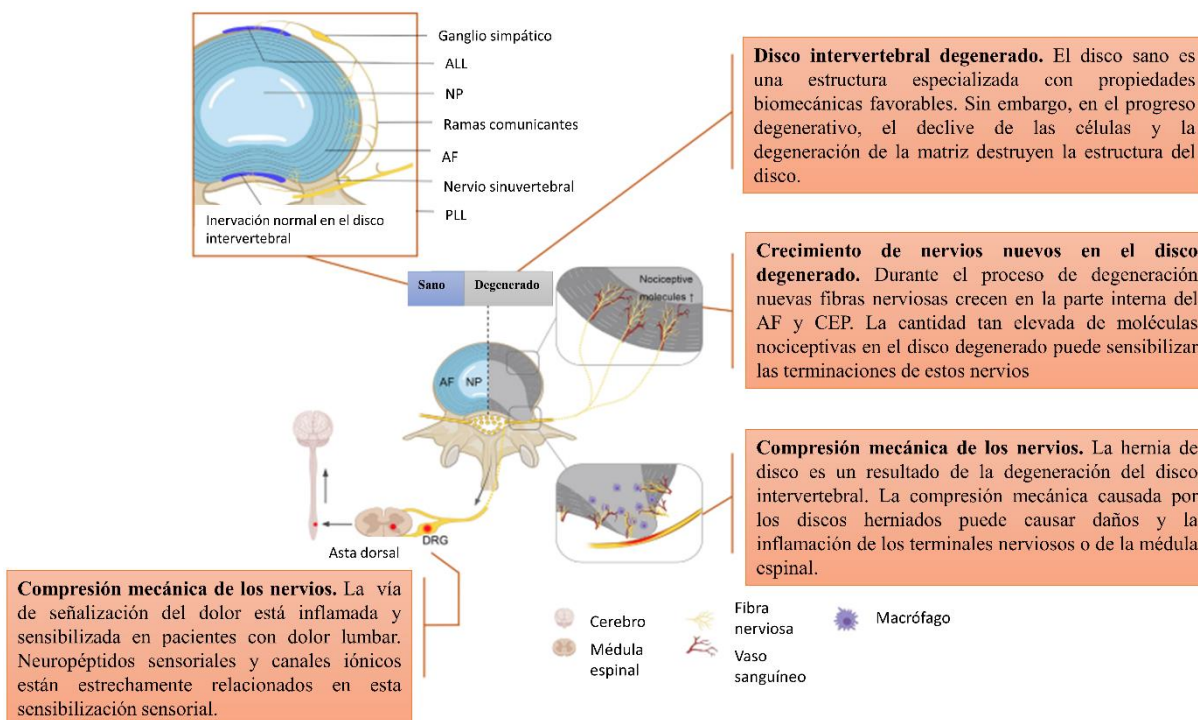


Figura 14. Representación esquemática de la estructura y cambios en la función sensorial del sistema nervioso en la degeneración de disco intervertebral.

La estructura y la función del sistema nervioso se ven afectadas por la degeneración de disco intervertebral. En primer lugar, la hernia de disco produce daño e inflamación de los nervios afectados. En segundo lugar, se produce un crecimiento de los nervios en el disco degenerado que aumenta el nivel de moléculas nociceptivas en las terminales sensoriales. Por último, podemos ver en la figura que, bajo estimulación mecánica y proinflamatoria, la vía de transmisión del dolor exhibe un estado funcional sensibilizado y, en última instancia, conduce a dolor lumbar. PLL: Ligamento longitudinal posterior; ALL: Ligamento longitudinal anterior; AF: Anillo fibroso; NP: núcleo pulposo; ECM: Matriz extracelular; DRG: Ganglio de la raíz dorsal. CEP: Placa terminal cartilaginosa. Figura traducida de Zhang et al. 2021 [67].

La compresión mecánica causada por los discos herniados puede causar daños e inflamación en las terminales nerviosas o de la médula espinal (Figura 14). Durante la degeneración de disco se produce un proceso de crecimiento de las terminales nerviosas que aumentan los niveles de sustancias nociceptivas en las terminales sensoriales, que conlleva a un aumento del dolor lumbar [67].

1.5.2 Lesiones traumáticas

La DDI puede surgir a consecuencia de una reparación incompleta tras una lesión traumática. Estudios comparativos entre individuos sanos y aquellos que han experimentado traumatismos en la columna revelan una mayor degeneración discal en los últimos, con un proceso degenerativo acelerado [68]. Cuando se produce un traumatismo en los discos, se liberan factores de crecimiento como son el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el



TGF- β 1 que juegan un papel crucial al estimular el crecimiento de vasos sanguíneos hacia el interior del disco. Por otro lado, los mastocitos, al liberar el factor de crecimiento nervioso (NGF), actúan como inductores del crecimiento nervioso [68]. A consecuencia de esto, se puede ocasionar herniación (salida del material discal) debido a las fisuras del anillo, desencadenando dolor discogénico como resultado de la estimulación de fibras nerviosas, tanto las preexistentes, como las de nueva formación [68].

1.5.3 Envejecimiento

Como ya hemos comentado, los nutrientes llegan al disco intervertebral mediante una red de capilares en la CEP. A partir de la primera década de vida este sistema comienza a deteriorarse por la calcificación progresiva que sufre el CEP [69]. Además, otros procesos asociados con la edad y el envejecimiento, como es la senescencia celular, se consideran mecanismos que inducen la DDI [70]. A pesar de no haber establecido una relación directa de causa y efecto, se ha observado una estrecha asociación entre la acumulación de senescencia en las células del disco, particularmente en el núcleo pulposo, y la reducción significativa de su capacidad de autorreparación. Este proceso se ve agravado por un estado proinflamatorio, un aumento en el catabolismo celular y una mayor actividad en la vía de la glucólisis anaerobia, lo cual desencadena un aumento en la producción de lactato [69].

Como proceso lógico de envejecimiento, la senescencia podría ocasionar que la capacidad de replicación y reparación se viese mermada, lo cual se agravaría por la falta de factores de crecimiento, lactato y procesos inflamatorios. Junto a este proceso, otros factores como la avascularidad y la sobrecarga mecánica agravan de forma natural la enfermedad [69].

1.5.4 Genética

Investigaciones exhaustivas sobre la degeneración del disco intervertebral han revelado un panorama complejo en el que, además de los factores ambientales, el componente genético ejerce una influencia significativa en el desarrollo de esta enfermedad. Los estudios recopilados hasta el momento han sugerido que la degeneración del disco intervertebral es una condición influenciada por la genética, marcando así un importante aspecto en su etiología.

Un análisis donde se compararon las similitudes entre gemelos idénticos (compartiendo el 100% de su información genética) y no idénticos (compartiendo el 50% de sus genes), ha

evidenciado una marcada influencia genética en la degeneración y progresión de la enfermedad del disco intervertebral. Estos estudios han indicado una probabilidad de heredabilidad del orden del 75 % en mujeres del Reino Unido y Australia, mientras que en hombres finlandeses las estimaciones oscilan entre un rango de 30 % y 55 % [71–73]. A pesar de que aún no se ha dilucidado completamente cómo las variaciones genéticas inciden precisamente en el desarrollo de la degeneración del disco intervertebral, investigaciones específicas han señalado la correlación de polimorfismos genéticos, como los de los genes COL1A1, COL9A2, COL11A1, VDR y agregano, con esta condición [74]. Estos hallazgos indican una posible relación entre ciertos perfiles genéticos y la susceptibilidad a la degeneración discal, aunque el mecanismo exacto aún requiere una mayor clarificación mediante estudios funcionales adicionales.

1.5.5 Consumo de tabaco y alcohol

Varios estudios han destacado la notable influencia del tabaquismo y el consumo de alcohol en el desarrollo de la DDI [75]. El tabaquismo se ha vinculado con ciertas enzimas, como la tetramérica triptasa, la cual podría acelerar el proceso de DDI mediante el desencadenamiento de cambios epigenéticos en las células de disco intervertebral [76]. Además, investigaciones sobre la incidencia de DDI y el tabaquismo han confirmado una conexión evidente entre ambos factores [66]. Estos descubrimientos resaltan el efecto nocivo que el tabaco y el alcohol tienen sobre la salud de los discos intervertebrales. La consideración de estos factores de riesgo modificables es fundamental para prevenir y manejar la DDI. Sin embargo, se necesita una investigación más exhaustiva para comprender completamente los mecanismos mediante los cuales el tabaquismo y el alcohol contribuyen a la DDI [66].

1.5.6 Cambios metabólicos en el disco intervertebral.

El estado metabólico del disco intervertebral y el cartílago articular circundante está muy relacionado al suministro de nutrientes que reciben. Como mencionamos anteriormente, los nutrientes llegan al NP y a las zonas avasculares por difusión a partir de la placa terminal cartilaginosa. Esta placa es nutrida mediante una red vascular, que a medida que la degeneración del disco avanza, se ve reducida (Figura 15) [77].

Las células del disco son extremadamente sensibles a la ausencia de suministro de glucosa y a la acumulación de ácido láctico [78]. Las células notocordales, conforme van madurando,

cambian sus necesidades en términos nutricionales. Cuando las células maduran a núcleo pulposo, se vuelven mucho más sensibles a los cambios y a la privación de nutrientes, esto puede verse incluso incrementado debido a la edad y otras enfermedades concomitantes [79].

La parte del disco que más sufre la ausencia de aporte nutricional es el núcleo pulposo, que desde estados de degeneración temprana tiene que adaptarse a situaciones de hipoxia, ausencia de nutrientes y glucólisis anaerobia, lo que en consecuencia se traduce en un aumento de la concentración de lactato y cambios en el pH. Estos cambios generan en su conjunto una pérdida de la correcta función del disco y de la síntesis de la matriz extracelular, contribuyendo así al proceso de degeneración [2].

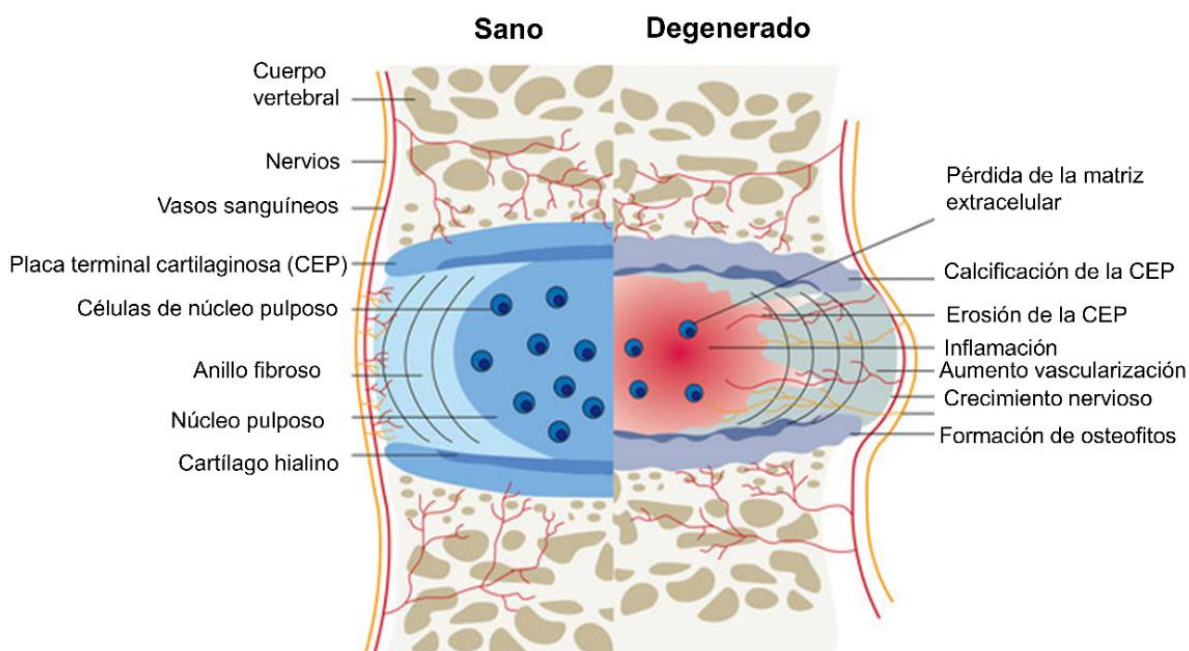


Figura 15. Anatomía y fisiopatología del disco intervertebral degenerado y sano.

En la parte izquierda de la imagen se pueden ver los elementos que conforman el disco intervertebral sano, mientras que en la parte derecha se observan la anatomía del disco en degeneración, que supone una pérdida de la matriz extracelular debido al estado catabólico del disco, una calcificación y erosión de la placa terminal cartilaginosa, estado inflamatorio, aumento de vascularización, crecimiento nervioso y formación de osteofitos. Imagen adaptada de Lu et al. [80].

Algunas enfermedades concomitantes pueden agravar la degeneración de disco intervertebral. Es el caso de pacientes con diabetes mellitus [81], en el que las células del núcleo pulposo cambian su contenido en aminoácidos, además de potenciar la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono, lo cual genera que el proceso de síntesis de proteoglicanos sea defectuoso y su capacidad de retención hídrica se vea perjudicada [82].

Cualquier situación que cause cambios mecánicos o afecte a la difusión de sustancias puede perturbar el metabolismo o el ya limitado suministro de nutrientes, acelerando así el proceso de DDI. Las alteraciones en la estructura del CEP afectan negativamente a la nutrición celular del disco, promoviendo el metabolismo anaeróbico, la producción de lactato. La producción de lactato debido al metabolismo anaeróbico en el disco intervertebral genera estrés en las células, lo que conduce a la degradación de la matriz extracelular esencial para su correcto funcionamiento. Esta situación puede desencadenar la apoptosis, un proceso de muerte celular programada, en las células del disco [84].

1.5.7 Obesidad como proceso inflamatorio: Influencia de las adipocinas en la degeneración de disco intervertebral.

La obesidad genera una presión mecánica adicional que los discos intervertebrales deben soportar, lo cual es un agravante en términos mecánicos para la integridad de la estructura de los discos. Tradicionalmente, el tejido adiposo era meramente considerado como una reserva pasiva de energía y sistema de protección contra la pérdida de calor. Sin embargo, a día de hoy, sabemos que su función es más amplia. Existe también una pérdida de la homeostasis en esta condición, que hace al organismo con exceso de peso secretar mayor cantidad de adipocinas por parte del tejido adiposo. La obesidad está considerada como una enfermedad metabólica e inflamatoria que afecta de forma severa a la homeostasis del disco intervertebral [85]. Los cambios en el microambiente del disco producen inflamación tisular que podría desencadenar procesos como la apoptosis celular, la autofagia y consecuentemente la ruptura de la matriz [86]. De hecho parece ser un factor mucho más importante que la edad o el sexo, ya que se han descrito que pacientes jóvenes con obesidad tienen un mayor riesgo de degeneración de disco, que los pacientes que desarrollan obesidad en la mediana edad (40-45 años) [87].

1.5.7.1 ADIPOQUINAS

Las adipocinas han sido descritas ampliamente por tener un papel muy importante en la respuesta inmune e inflamatoria [88]. Además, estos péptidos de bajo peso molecular son capaces de contribuir a procesos degenerativos e inflamatorios en la matriz extracelular del disco intervertebral [89].

Leptina

La leptina fue descubierta en 1994 y su identificación cambió la forma de entender el tejido adiposo como un mero tejido de reserva a un tejido con capacidad endocrina [90]. La leptina está principalmente producida por el tejido adiposo blanco, pero también se expresa en otros tipos de tejidos adiposos como el marrón o el medular e incluso por células cartilaginosas y células de disco intervertebral, entre otras [91–94].

Las propiedades anorexigénicas de la leptina la convierten en un regulador clave del apetito y del gasto energético al activar su receptor (LepR) [95], actuando a través del eje hipotálamico. Es por ello que, mutaciones en el gen de la leptina o en su receptor pueden ser responsables del desarrollo de la obesidad [96]. De hecho, la obesidad conlleva alteraciones en la señalización del receptor de la leptina, lo que se conoce como resistencia a la leptina [97].

Por otro lado, se ha descrito que la leptina tiene una implicación en la homeostasis de los tejidos del disco intervertebral de forma directa (a través de su receptor) o de forma indirecta (a través de citoquinas que son inducidas por la leptina) (Figura 16) [98]. Estudios *in vitro* realizados en células aisladas de NP y AF bovinos, estimuladas con leptina, revelaron aumentos significativos en los niveles de MMP3 y MMP9 [99]. Asimismo, se observó un incremento de MMP7, MMP11 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en las células de AF, mientras que en las células de NP se registró un aumento en la expresión de agreganasa, interleuquina 6 (IL-6) y TNF α . Estos hallazgos sugieren fuertemente que la leptina podría desempeñar un papel relevante en los procesos degenerativos del disco intervertebral, así como potenciar los procesos inflamatorios en curso [99].

Del mismo modo, en el líquido sinovial de pacientes con artrosis (OA) se ha descrito una correlación directa entre los niveles de leptina y los niveles de MMP1 y MMP3 [100]. En condrocitos, la estimulación con leptina sola y en combinación con el estímulo inflamatorio IL-1 β , aumentaban los niveles de MMP1, MMP3 y MMP13 [100].

En un estudio con ratones jóvenes sin el gen para el receptor de leptina, se demostró que, en particular las hembras de ratón, desarrollaban alteraciones en la columna vertebral, con cambios morfológicos en las células notocordales [101]. Este hecho, sugiere una proliferación y diferenciación retardada en las células del disco intervertebral. El papel de la leptina y su receptor en disco intervertebral aún está por clarificarse, pero gracias a estudios como este, sabemos que posee un papel importante en el desarrollo del disco [101]. Sin embargo, se

necesitan investigaciones adicionales para precisar los mecanismos mediante los cuales la leptina puede influir en el disco intervertebral.

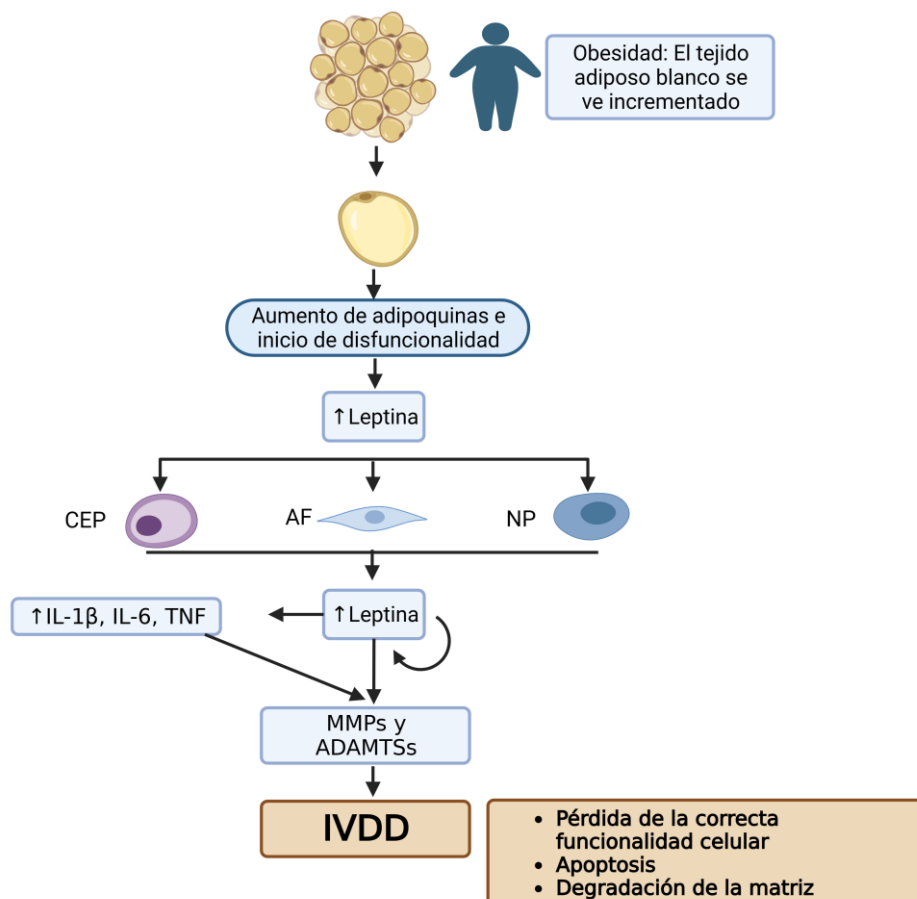


Figura 16. Leptina aumenta en obesidad e incrementa la inflamación de bajo grado y respuesta metabólica. El incremento de grasa corporal causa que los adipocitos pierdan su correcta función y el aumento de la secreción de adipocinas, que generan un estado de inflamación de bajo grado secretando adipocinas como IL-1β, IL-6 y TNF. A su vez, aumentan las concentraciones de MMPs y ADAMTSs, aumentando el estado catabólico de las células. Figura de elaboración propia en Biorender®

Visfatina

La visfatina es una adipocina también conocida por el nombre de nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) o factor potenciador de colonias de células pre-B (PBEF) que aparece aumentada en niveles graves de degeneración de disco intervertebral comparada con aquellos de menor grado de degeneración [102]. La visfatina está relacionada con la diferenciación celular, respuesta al estrés y la apoptosis y se ve aumentada en estados metabólicos alterados, así como en enfermedades inflamatorias [103].

Se ha demostrado que la expresión de visfatina aumenta tras un estímulo con IL-1β en las células del núcleo pulposo, respondiendo además de forma dosis-dependiente [104]. Por otro

lado, ha sido descrita la relación entre la expresión de la visfatina y el aumento de diversas enzimas encargadas de la degradación de matriz (MMP13, ADAMTS4 y -5) y la disminución de agreganos y colágeno II. Al aplicar un inhibidor de la visfatina (APO0866) y realizar un knockout de la misma, se prevenía la degradación de matriz del disco intervertebral [104]. También se ha descrito que esta adipoquina está implicada en la autofagia de células del núcleo pulposo, debido a que aumenta la conversión de LC3-I a LC3-II e incrementa beclin-1 [104].

Lipocalina-2

La lipocalina-2 (LCN2) es una adipoquina de 198 aminoácidos también conocida como lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) [105]. LCN2 es reconocida por desempeñar un papel crucial en procesos inflamatorios, tales como la artrosis y la artritis reumatoide [106], y ha sido identificada como un biomarcador de degeneración del cartílago en dichas enfermedades [107]. En la degeneración de disco intervertebral su rol no está muy bien descrito, aunque existen algunos datos sobre su regulación. En las células de anillo fibroso y núcleo pulposo la expresión lipocalina-2 aumenta tras el estímulo inflamatorio con proteína C reactiva [108].

La actividad y expresión del factor de crecimiento nervioso juegan un papel crucial tanto en el dolor de espalda como en el proceso de degeneración de disco intervertebral, ya que es un factor inductor del estado catabólico del disco. Se ha evidenciado una correlación directa entre la actividad de este factor y los niveles de lipocalina-2 en células del anillo fibroso [109]. También, se ha descrito que la lipocalina-2, en células de anillo fibroso de rata, produce un complejo covalente junto con la MMP9 promoviendo un perfil catabólico en las células [109].

Grelina

La grelina (GHRL) es una hormona secretada por el estómago que actúa a través de un receptor propio, el receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (GHS-R). Su principal función es el estímulo de la ingesta de alimentos, almacenamiento de grasa y liberación de la hormona del crecimiento [110]. Por otro lado, cabe destacar el papel del péptido antimicrobiano expresado en el hígado-2 (LEAP2), que actúa como antagonista endógeno de GHS-R. Se secreta en el intestino e hígado y su liberación es inhibida por el ayuno [111,112]. LEAP2 actúa inhibiendo la activación del receptor por parte de la grelina y por lo tanto sus efectos [112].

La presencia de grelina ha sido detectada en células de núcleo pulposo de disco degenerado y su expresión se ve disminuida tras el estímulo inflamatorio con IL-1 β [113]. La función de la IL-1 β se ve afectada por la presencia de grelina, ya que esta actúa como antagonista del catabolismo y la inflamación producida por esta citoquina en células de núcleo pulposo [113].

En estudios *in vitro* en células de núcleo pulposo humano, se ha descrito que el tratamiento con grelina es capaz de revertir la proliferación desorganizada y la apoptosis provocada por la IL-1 β . Además, en un modelo de degeneración en conejo, se describió que disminuía los niveles de MMP3, ADAMTS4 y -5 en células de núcleo pulposo [113]. También esta adipoquina puede promover el anabolismo de las células de núcleo pulposo a través de la activación de la vía de la proteína quinasa B (AKT) y además actúa inhibiendo la vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B) y la traslocación de su subunidad p65 al núcleo [113].

Progranulina

La progranulina (PGRN) es una adipoquina formada por una estructura de 7 dominios y medio, también conocida como precursor de epitelina granulina (GEP), factor de crecimiento derivado de células PC (PCDGF), proepitelina y acrogranina [114]. La progranulina se caracteriza por su actividad antiinflamatoria, pero al ser sometida a procesos proteolíticos, se convierte en granulinas con actividad proinflamatoria [115]. Estas granulinas tienen la capacidad de incrementar la expresión de genes proinflamatorios como son IL-1 β , IL-8 y TNF α , y además tienen la capacidad de activar la vía de TLR9 (receptor tipo Toll 9) [116].

Estudios con ratones knockout de progranulina, revelaron deficiencias en la organización ósea, así como niveles elevados de metaloproteinasas y agrecanasas (MMP13 y ADAMTS5). Esta condición ha demostrado generar un desequilibrio en el catabolismo óseo y afectar a la difusión de nutrientes hacia el núcleo pulposo, lo cual incrementa el desarrollo de la degeneración de disco intervertebral [117].

Los niveles de progranulina en el suero de pacientes con degeneración de disco aumentan notablemente, al igual que su expresión en las células del disco degenerado en comparación con los individuos sanos [118]. Se ha documentado el papel protector de la progranulina en los discos degenerados, ya que tiene la capacidad de estimular la producción de citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10, y de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias, como el TNF α [118].

Quemerina

La quemerina es una adipoquina también conocida por el nombre de proteína reactiva 2 del receptor del ácido retinoico (RARRES2) o gen 2 inducido por tazarotina (TIG2) [119]. Esta adipoquina está aumentada en pacientes con obesidad, presentando concentraciones elevadas tanto en el suero sanguíneo como en el tejido adiposo blanco y otros tejidos [120]. En 2009, se realizó la primera descripción que relacionaba el aumento de la síntesis de quemerina con la acción de la IL-1 β y el TNF α [121]. Estudios recientes han revelado que los niveles basales de quemerina tienden a ser bajos, pero aumentan significativamente en casos de discos intervertebrales degenerados. Específicamente, se han documentado niveles elevados tanto de quemerina como de su receptor CMKLR1 (receptor tipo quimiocina-1) en el núcleo pulposos, y este aumento está relacionado con el grado de degeneración de disco [122]. Por otra parte, se ha evidenciado que esta adipoquina puede activar la vía de NF κ B a través del receptor tipo Toll 4 (TLR4), y fosforilar AKT en función de la cantidad presente [122]. Además de estas vías de señalización, se ha observado que esta adipoquina tiene la capacidad de reducir la expresión de componentes clave de la matriz extracelular, como el colágeno, el agregano y el factor de transcripción SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9 (SOX9). Simultáneamente, aumenta los niveles de MMP9, MMP13 y ADAMTS5. Estos cambios conducen a un desequilibrio en la homeostasis de la matriz extracelular del disco intervertebral, lo que podría traducirse en una mayor degeneración [122].

Nesfatina-1

La nesfatina-1, descubierta en 2006, es un polipéptido reconocido por sus efectos anorexigénicos [123]. Está codificado por la secuencia de nucleobindina-2 (NUCB2), una clase de proteína de unión a calcio y ADN que desempeñan un papel fundamental en la señalización celular. Este tipo de proteínas actúan como precursores de factores reguladores bioactivos en el sistema endocrino [124]. En 2010, se determinó que tanto el tejido adiposo humano como el murino tenían la capacidad de producir nesfatina-1, lo que en aquel momento la catalogó como una nueva adipoquina por describir [125]. De hecho, los niveles de esta adipoquina están correlacionados con la obesidad y el índice de masa corporal [125].

En pacientes con artrosis, se han identificado niveles elevados de nesfatina-1 en el fluido sinovial, mostrando una alta correlación con la severidad de la enfermedad [126]. Scotece *et al.* fueron los primeros en describir que los condrocitos humanos y murinos eran capaces de

sintetizar y producir nesfatina-1 y su aumento en respuesta a un estímulo inflamatorio [127]. Debido a la similitud fisiopatológica del cartílago con el disco, el estudio de esta adipocina en la degeneración de disco intervertebral sería interesante, ya que aún no ha sido descrito.

1.6 INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta fisiológica en respuesta a estímulos potencialmente dañinos, como microorganismos, sustancias extrañas o lesiones tisulares. Cuando el sistema inmunológico detecta alguno de estos factores, se activa una cascada de eventos destinados a eliminar la amenaza y reestablecer la homeostasis. Los síntomas característicos de la inflamación incluyen enrojecimiento, hinchazón, aumento de la temperatura local y dolor. Estos signos son manifestaciones comunes que acompañan a la reacción del organismo para protegerse y reparar el tejido afectado [128].

1.6.1 Mediadores de procesos inflamatorios

El proceso inflamatorio se desencadena como respuesta del organismo para detener el daño tisular y restaurar el funcionamiento normal del tejido. Durante este proceso, una amplia variedad de moléculas interacciona entre sí, muchas de las cuales se originan a partir de ácidos grasos poliinsaturados como prostaglandinas, leucotrienos y otras son proteínas como citoquinas, factores de transcripción, entre otras.

Las citoquinas y las quimiocinas, como mediadores proteicos, se liberan desde depósitos intracelulares [129]. Cuando estos mediadores inflamatorios se unen a receptores en las células diana, activan o inducen la liberación de más factores inflamatorios. Este proceso conduce a la formación de un exudado inflamatorio que contiene proteínas plasmáticas y leucocitos [130].

1.6.1.1 Las citoquinas

Las citoquinas son proteínas que participan en la señalización intracelular, y pueden ser secretadas por varios tipos de células, como macrófagos, linfocitos, mastocitos e incluso en las células de disco intervertebral [85]. Dentro de las citoquinas inflamatorias más relevantes asociadas con la degeneración de disco intervertebral se encuentran la IL-1, el TNF α y la IL-6 [131].

Estas citoquinas tienen una función crucial en el sistema de defensa y en la respuesta inflamatoria. Regulan procesos clave como el crecimiento, la diferenciación, la migración o la activación de las células inmunes. Se distinguen dos tipos principales de citoquinas: las proinflamatorias (como IL-6, IL-1 y TNF α) y las antiinflamatorias (tales como IL-4, IL-10 e IL-13) [132].

La IL-1 contribuye significativamente a la degeneración de disco intervertebral, ya que participa en la degradación de la matriz extracelular y está involucrada en procesos como la senescencia celular, la angiogénesis, la apoptosis y la respuesta inflamatoria a nivel discal [43,133]. Investigaciones realizadas en un modelo de hernia de disco lumbar en ratas han evidenciado que la degeneración del disco se acelera significativamente después de la inyección de IL-1 β [134]. Estos descubrimientos resaltan la importancia fundamental de la IL-1 en el proceso de degeneración del disco intervertebral, señalando su posible uso como objetivo terapéutico para tratar esta condición.

Por otro lado, el TNF α es una citoquina ampliamente reconocida por sus efectos proinflamatorios y desempeña un papel crucial en varios procesos inmunológicos, incluyendo la diferenciación celular, el metabolismo lipídico y la apoptosis celular en el disco intervertebral [135]. Se han identificado niveles basales de expresión de TNF α e IL-1 β en discos intervertebrales sanos, los cuales aumentan significativamente en estados de degeneración [135]. Además, estas dos citoquinas han demostrado una correlación positiva con la edad del paciente y el grado de degeneración [135].

La IL-6 es una proteína con un peso molecular de alrededor de 26 kDa, reconocida por su naturaleza proinflamatoria y su capacidad para estimular el crecimiento y la proliferación de las células inmunitarias [136]. Esta citoquina desempeña un papel crucial como regulador en enfermedades inflamatorias crónicas [137] y también juega un papel relevante en los procesos asociados con la degeneración de disco intervertebral.

Al igual que ocurre con otras citoquinas, los niveles basales de IL-6 en el disco intervertebral no son generalmente elevados, pero pueden incrementarse en respuesta a estímulos inflamatorios o debido a la acción de otras citoquinas como el TNF α y la IL-1 β [136].

1.6.1.2 Las quimiocinas

Las quimiocinas son proteínas de bajo peso molecular que desempeñan un papel esencial en la respuesta celular de defensa. Se clasifican como moléculas proinflamatorias que se producen en respuesta a estados inflamatorios agudos o crónicos. Son una subclase de citoquinas cuya función principal radica en atraer y dirigir el movimiento de los leucocitos hacia áreas inflamadas o infectadas del organismo. Las quimiocinas actúan como señales de migración para los leucocitos, facilitando su desplazamiento desde la circulación sanguínea hacia los tejidos afectados, donde pueden llevar a cabo funciones importantes en la respuesta inmune y la resolución de la inflamación.

Se ha observado que el desarrollo de la degeneración de disco intervertebral está vinculado a la presencia de diversas quimiocinas entre las que destaca la IL-8 (conocida también como ligando de quimiocina con motivo C-X-C 8 o CXCL8) [138]. Niveles elevados de ciertas quimiocinas han sido relacionados con la enfermedad de degeneración de disco y se ha demostrado además que los niveles están correlacionados positivamente con el grado de degradación [139]. Del mismo modo, se ha sido descrito que la vía de CCL20/CCR6 (ligando 20 de quimiocina/receptor del ligando 6 de quimiocina) puede reclutar células productoras de IL-17 a sitios inflamados en los tejidos de disco intervertebral degenerado en un modelo de rata [140] y que la CXCL12 inducía la degradación de la matriz extracelular de células de disco intervertebral así como la producción de metaloproteinasas [141]. También, el eje SDF-1/CXCR4 (factor 1 derivado de células estromales/receptor 4 de quimiocinas con motivos C-X-C) muestra niveles elevados en discos degenerados y contribuye a la apoptosis de las células precursoras neurales a través de la vía de NF κ B, lo que promueve la enfermedad de degeneración de disco intervertebral [118]. Además, este mismo eje SDF-1/CXCR4, a través de la vía de PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) /AKT, desempeña un papel en la regulación de la supervivencia de las células endoteliales vasculares, su migración y la angiogénesis en los discos degenerados [118,119].

1.7 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA DEGENERACIÓN DE DISCO INTERVERTEBRAL

En el contexto de la degeneración de disco intervertebral, varios factores de transcripción desempeñan un papel crucial al regular los procesos moleculares subyacentes. Estos factores

suelen estar relacionados con la respuesta inflamatoria y la remodelación del tejido, coordinando y regulando la expresión de genes vinculados con la matriz extracelular, la homeostasis celular y la apoptosis.

Estos factores de transcripción no solo controlan la expresión génica, sino que también interactúan con mediadores inflamatorios como citoquinas y quimiocinas, contribuyendo a la regulación de los mecanismos inflamatorios y la progresión de la enfermedad de degeneración de disco intervertebral [142,143]

La comprensión de estos factores de transcripción es crucial para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos destinados a detener la progresión de la degeneración de disco y restaurar la función normal del tejido. Entre los factores de transcripción más importantes en el disco intervertebral se encuentran NFκB, el factor de activación de proteínas 1 (AP-1), SOX9 y la proteína p53, entre otros [142]. NFκB es un factor que se asocia con la regulación de procesos inflamatorios y apoptosis de las células de disco intervertebral [142]. AP-1, por su parte, regula procesos de estrés y en la modulación de la expresión de genes de matriz [143]. SOX9 está también implicado en la codificación de proteínas de matriz, además del mantenimiento del tejido de disco intervertebral [143]. Por último, p53 regula procesos apoptóticos y de senescencia celular [144].

El entendimiento de la influencia y las funciones de estos factores de transcripción, y de otros cuya participación aún no ha sido descrita, en el contexto de la degeneración de disco intervertebral es esencial para desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas y dirigidas hacia esta enfermedad.

1.7.1 ELF3 Epithelium-specific ETS transcription factor (ESE-1)

ELF3, conocido también como ESE-1, ESX, ERT y JEN, es un factor de transcripción que desempeña un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos epiteliales. Pertenece a la familia ETS de factores de transcripción y se expresa específicamente en células epiteliales, influyendo en procesos como la diferenciación, proliferación, migración e inflamación [145].

La familia de factores de transcripción ETS está formada por 30 miembros los cuales se encargan de regular la diferenciación, proliferación celular y remodelación de la matriz extracelular en condiciones tanto sanas como patológicas [146]. A pesar de la similitud de ELF3

con la secuencia del dominio ETS de otros factores de transcripción ETS, posee diferencias que le confieren propiedades únicas. ELF3 tiene la característica de poseer dos tipos de dominios: uno de unión al ADN (como el resto de factores de la familia ETS) y otro de unión a proteína (este último exclusivo de ELF3) [147]. ELF3 como factor de transcripción es capaz de unirse a elementos de respuesta E74 y actuar aumentando o inhibiendo la expresión de ciertos genes relacionados con la inflamación [148], la diferenciación celular [147], la angiogénesis [149] y la apoptosis [149].

La inducción de ELF3 está regulada a través de la vía canónica de NFκB. Su promotor se activa y facilita la subsiguiente transcripción cuando NFκB se une a un sitio de unión de alta afinidad en el promotor de ELF3 [148]. Una vez producido, ELF3 interviene en la respuesta inflamatoria de diversos tipos celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que este factor es inducible en células de músculo liso vascular, células endoteliales y monocitos/macrófagos tras un estímulo inflamatorio [148]. Del mismo modo, se ha descrito que ELF3 regula la expresión de varios genes inflamatorios relevantes como la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) y ciclooxigenasa 2 (COX2) [148,150].

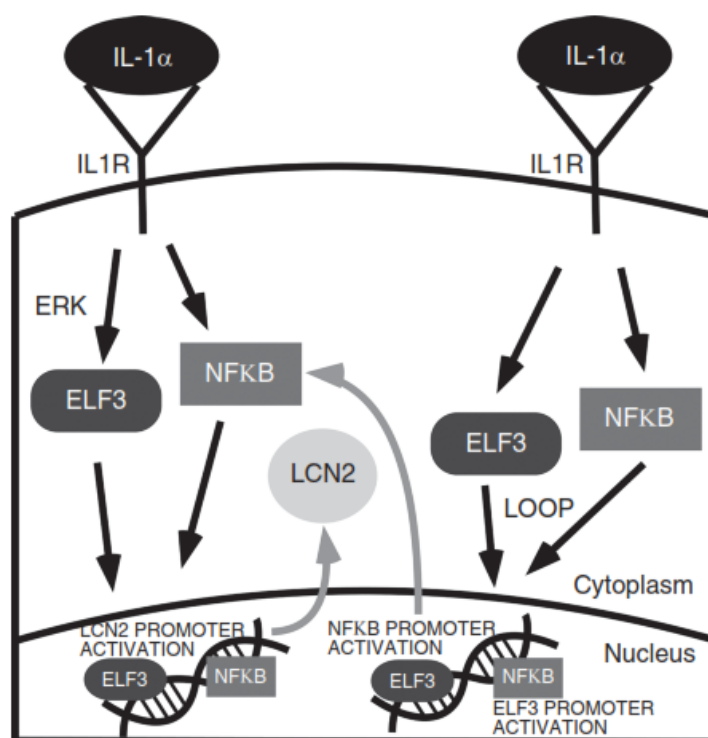


Figura 17. Representación esquemática del funcionamiento de ELF3 en cartílago articular.

IL-1α activa los factores de transcripción ELF3 y NFκB, los cuales inician la inducción de LCN2. Esta activación simultánea genera un circuito de retroalimentación positiva entre ambos factores de transcripción por parte de IL-1α, provocando así la inducción en la expresión de LCN2. Imagen reproducida con permisos de Conde et al.[151].

Aunque en condiciones fisiológicas la expresión de ELF3 se encuentra principalmente restringida a células epiteliales, su presencia en otros tipos celulares como condrocitos o sinoviocitos en pacientes con artrosis o artritis reumatoide [152], sugiere que su expresión y regulación está influenciada por estímulos inflamatorios, y por lo tanto, podría ser sobreexpresado por otros tejidos musculoesqueléticos como el disco intervertebral, en condiciones patológicas.

Estudios previos en cartílago articular humano con artrosis demostraron que en los condrocitos hay una mayor expresión de ELF3 [153]. También se identificó que este factor de transcripción desempeñaba un papel significativo en la regulación de la expresión de citoquinas proinflamatorias en cartílago articular (Figura 17) [153–157], así como en la inhibición de la expresión de colágeno tipo II alfa 1 (COL2A1) y la inducción de la expresión de la MMP13 [158]. De igual manera, se ha descrito en condrocitos humanos y murinos, la interacción entre ELF3 y el factor de transcripción NFκB en la inducción de la expresión de la lipocalina-2, una adipocina proinflamatoria (Figura 17) [151]. Además de estos hallazgos, se ha demostrado que el tratamiento conjunto con leptina e IL-1β produce sinergia en la expresión de ELF3 en el mismo tipo celular [146].

1.7.2 NFκB

En 1986 fue descubierto el factor NFκB un factor crítico en la respuesta inflamatoria [159,160]. Su activación contribuye a estimular la liberación de moléculas o factores proinflamatorios y enzimas capaces de degradar la matriz extracelular, además de inhibir la síntesis de colágeno en el disco intervertebral, lo que puede contribuir a su degeneración.

La familia de NFκB incluye cinco subunidades: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 y p52 [161]. Estos factores pueden formar homodímeros y heterodímeros y se encuentran en el citoplasma cuando la vía no está activada, unidos a proteínas inhibitorias como IκB [161]. Cuando NFκB está en su forma activa, tiene la capacidad de crear diversas combinaciones de heterodímeros con los diferentes miembros de la familia y traslocarse al núcleo. Estas proteínas tienen una región conservada en la parte amino terminal, donde se encuentran los dominios responsables de la formación de dímeros, la localización en el núcleo celular y la capacidad de unión al ADN. Otros miembros, como c-Rel, Rel B y p65 tienen además otro dominio no-homólogo en la parte carboxi-terminal, con función activadora de la transcripción de genes específicos con sitios de

unión para NF κ B [161]. Por otro lado, el homodímero de p50 carece del dominio de transactivación, pero aun así pueden unirse a las secuencias de unión de NF κ B presentes en el ADN y actuar como represores [161].

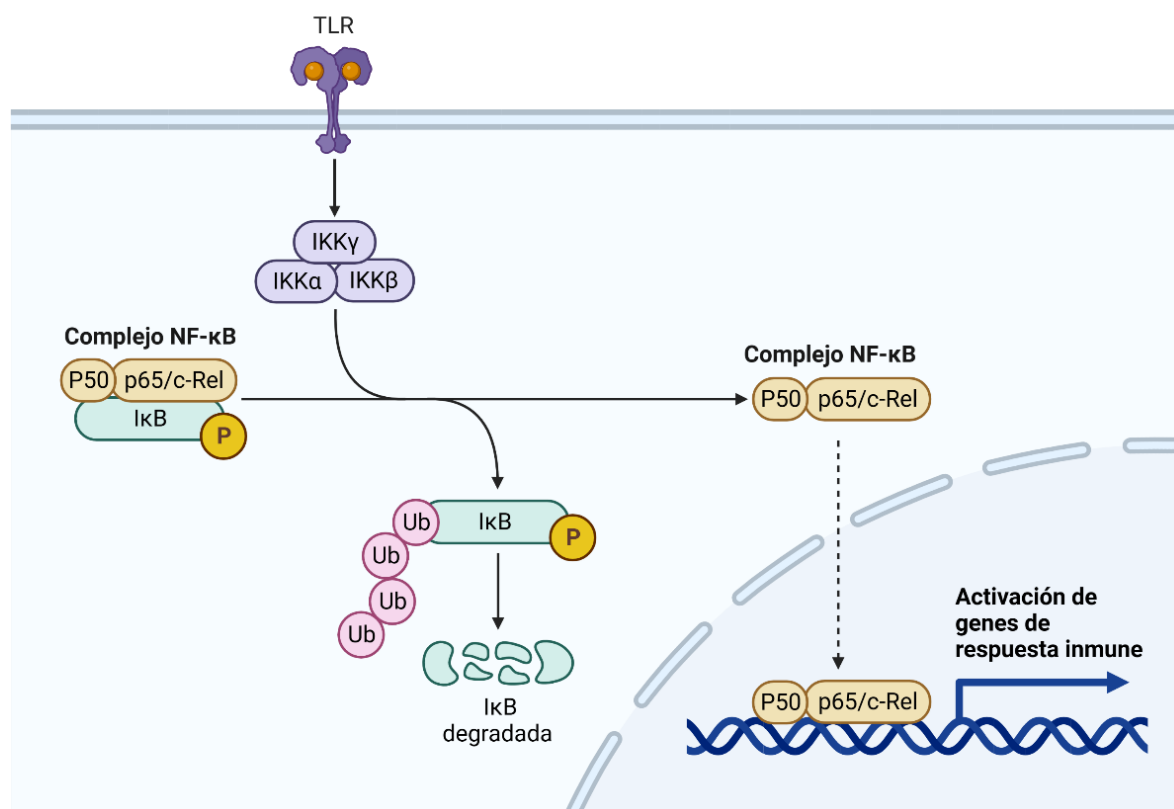


Figura 18. Esquema de la vía de señalización canónica de NF κ B. Imagen de elaboración propia con BioRender®.

La activación de la ruta de NF κ B puede ocurrir de dos maneras: la clásica llamada canónica y la no canónica. El proceso canónico (Figura 18) depende de las quinasas IKK β e IKK γ , que pueden ser activadas por distintos factores, entre ellos las citoquinas, factores de crecimiento, mitógenos, componentes microbianos y factores inducidos por estrés [162] que estimulan receptores de membrana como el TLR, receptores de TNF y el receptor de IL-1. IKK es un complejo trimérico compuesto por dos subunidades catalíticas (IKK α e IKK β) y una subunidad regulatoria llamada IKK γ , que es esencial para la modulación de NF κ B. Por lo general, NF κ B se encuentra en su forma inactiva en el citoplasma, por la unión a las proteínas I κ Bs. Para la liberación y activación del factor nuclear kappa β es imprescindible que las proteínas I κ B se degraden. Cuando IKK se activa, se fosforila I κ B α y se produce su degradación en el

proteosoma, lo que a su vez desencadena la liberación de los dímeros p65/p50. Estos dímeros son capaces de translocarse al núcleo y regular la transcripción de genes diana [163]. Entre estos genes diana se encuentran citoquinas proinflamatorias, como son la IL-1, IL-6 y TNF; quimiocinas como CXCL8, CCL2 y CCL3; moléculas de adhesión de leucocitos o genes antiapoptóticos [162].

La forma no canónica de activación de esta ruta ocurre por la estimulación de ciertos miembros de la familia de receptores de TNF. El TNF α requiere que su receptor trimerice y que se reclute una proteína adaptadora llamada dominio del receptor de TNF asociado a la vía de muerte (TRADD) al dominio citoplasmático. Como resultado, TRADD activa el factor asociado a receptor de TNF 2 (TRAF2) y una serie de MAP quinasas, desencadenando la activación de las IKKs y, en última instancia, propiciando la activación de NF κ B [164].

1.8 RELACIÓN ENTRE LA DEGENERACIÓN DE DISCO INTERVERTEBRAL Y LA ARTROSIS.

A pesar de ser afecciones distintas, la artrosis y la degeneración de disco intervertebral exhiben múltiples similitudes. Ambas condiciones involucran cambios degenerativos en el sistema musculoesquelético, y presentan una notable superposición en las vías y procesos moleculares de degeneración que tienen lugar en el disco y en el cartílago, respectivamente [165]. La OA y DDI comparten procesos moleculares endógenos, que abarcan desde la degeneración de la matriz extracelular hasta la inflamación, el estrés oxidativo, la apoptosis, la senescencia y la disminución de la autofagia [166].

La composición de la ECM del disco intervertebral y de las articulaciones sinoviales presentan muchas similitudes a pesar de las diferencias de estructura. La estructura de la ECM del núcleo pulposo y el cartílago es rica en colágeno tipo II y agrecano, mientras que la parte del anillo fibroso y la cápsula articular es rico en colágeno tipo I y elastina. Los condrocitos y las células del disco se ocupan de la remodelación de la matriz extracelular y son sensibles a los cambios extracelulares, especialmente a la carga mecánica. Estos estímulos externos que conllevan a la degradación de la matriz, presentan un perfil similar en ambos tejidos. De modo que vemos aumentada la expresión de metaloproteinasas, desintegrinas y metaloproteasas con motivos de trombospondina, así como la reducción de la expresión de colágeno II y agrecano [166].

Ambas enfermedades eran tradicionalmente consideradas como enfermedades degenerativas causadas meramente por factores mecánicos y por desgaste debido al envejecimiento. Sin embargo, a día de hoy, se ha descrito ampliamente que la inflamación y las adipocinas juegan un papel fundamental en la aparición y desarrollo tanto de la DDI [167,168], así como de la OA [169]. La inflamación sistémica de bajo grado, los traumatismos y la carga mecánica pueden inducir la producción de citoquinas inflamatorias como IL-1 β o TNF, que también contribuyen a un estado de degeneración de la matriz [166].

Los productos resultantes de la degeneración de la matriz extracelular, como el péptido Ag 32-mer derivado del agregano, son capaces de activar los receptores tipo Toll (TLRs), desencadenando así una respuesta inflamatoria amplificada que conduce a la progresiva destrucción articular, tanto en la DDI como en la OA [170]. Se ha demostrado, en modelos *in vitro* de ambas enfermedades, que los TLRs están sobreexpresados. Esta situación desencadena la activación de vías que provocan la liberación de citoquinas proinflamatorias [171] y la apoptosis celular, tanto en cartílago [172], como en disco [173]. Estos procesos, que fomentan la desintegración de la matriz, la presencia de inflamación crónica y la apoptosis celular, establecen un ciclo destructivo persistente en ambas afecciones.

En resumen, aunque la OA y la DDI se consideran distintas desde el punto de vista médico, comparten varios aspectos fisiopatológicos fundamentales. Desde los procesos moleculares hasta los efectos biomecánicos y cambios degenerativos, por lo que podemos concluir que existen similitudes notables entre ambas condiciones.

1.9 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS PARA LA DEGENERACIÓN DE DISCO INTERVERTEBRAL

1.9.1 Fármacos antiinflamatorios esteroideos

Los glucocorticoides son los fármacos más utilizados para controlar el proceso inflamatorio y autoinmune de enfermedades como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y otras enfermedades inflamatorias autoinmunes y/o degenerativas [174]. Estos medicamentos se han utilizado ampliamente para tratar el dolor de espalda asociado a la degeneración de disco intervertebral, particularmente para el tratamiento del dolor de hernia discal aguda y radiculopatía [175]. Se ha demostrado que la infiltración de este tipo de fármacos a nivel

epidural es efectiva para el tratamiento del dolor [175]. Sin embargo, estos fármacos han demostrado provocar complicaciones como puede ser la osteonecrosis vertebral [176].

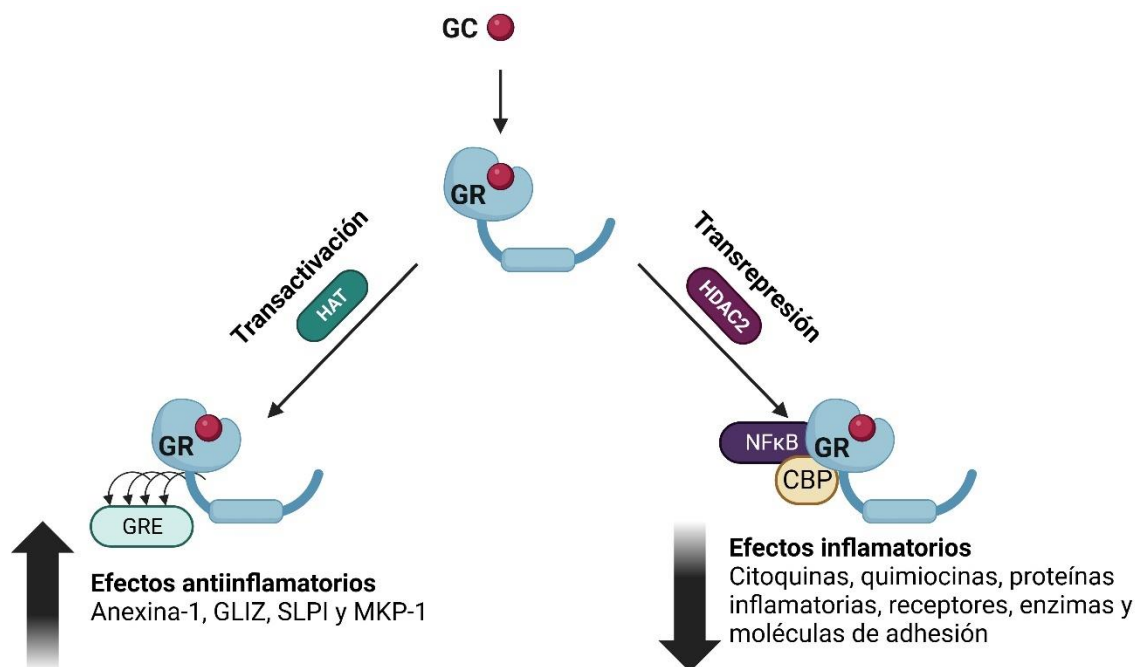


Figura 19. Representación esquemática de los efectos transcripcionales de los glucocorticoides. Los glucocorticoides (GC), tras unirse a su receptor, forman un complejo (GC-GR) que puede desencadenar dos mecanismos: transactivación; la cual se activa por la acetilación de histona acetiltransferasa (HAT) o bien por transrepresión, por la desacetilación por histona desacetilasa 2 (HDAC). Imagen de elaboración propia (Biorender®).

A nivel molecular, debido a su naturaleza lipófila, los glucocorticoides difunden a través de la membrana celular y se unen a su receptor en el citoplasma. Una vez activado el receptor, éste se transloca al núcleo celular, donde provoca efectos en la transcripción génica, aumentando la expresión de genes antiinflamatorios (transactivación) o disminuyendo la expresión de transcritos inflamatorios (transrepresión) (Figura 19) [177].

Dentro del núcleo celular, los glucocorticoides ejercen su acción de diferentes maneras, ya sea dependiendo o no de su unión al ADN. El receptor de glucocorticoides homodimerizado se une a los elementos de respuesta a los corticoides en la región promotora de genes específicos, lo que resulta en la activación de la transcripción génica. Esto lleva a la regulación de genes como IL-10, IL-12 y la proteína quinasa fosfatasa-1 (PKP-1) [174].

El otro mecanismo de acción de los glucocorticoides es independiente de la unión con el ADN, implica la unión del receptor de glucocorticoides con factores de transcripción como

NF κ B, AP-1 y STAT1 (transductor de señal y activador de la transcripción 1) que controlan la expresión de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF α ; quimiocinas como CCL1, CCL5, CCL11, CXCL8; enzimas inflamatorias como COX2 y NOS2 y moléculas de adhesión como VCAM-1 (molécula de adhesión vascular 1) e ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) [178].

1.9.2 Fármacos antiinflamatorios no esteroideos

Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) desempeñan un papel fundamental en el tratamiento sintomático del dolor de espalda. Estos compuestos son ampliamente reconocidos por sus propiedades antiinflamatorias o analgésicas, ya que actúan bloqueando las acciones de COX1 y COX2, impidiendo de tal manera que se produzcan mediadores inflamatorios [179]. Cabe destacar que la COX1 es la forma constitutiva que participa en funciones fisiológicas normales del organismo, mientras que la COX2 es la forma inducible, predominante en sitios inflamatorios.

Hasta la fecha, no se ha logrado una comprensión completa del impacto de estos medicamentos en la evolución de la degeneración en el disco intervertebral y en la homeostasis de la matriz [179].

1.9.3 Nutracéuticos como tratamiento antiinflamatorio

Un compuesto nutracéutico puede definirse como un suplemento dietético que se presenta en una matriz no alimentaria, es decir, en forma farmacéutica, y contiene una sustancia natural bioactiva concentrada. Esta sustancia se encuentra normalmente en los alimentos y, cuando se consume en dosis superiores a las que se encuentran en dichos alimentos, presume proporcionar beneficios para la salud que son mayores que los que podría ofrecer el alimento por sí solo. En términos generales, los nutracéuticos son sustancias naturales que a menudo se encuentran en alimentos (a menudo llamados alimentos "funcionales") y que pueden participar incluso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades [180].

La ingesta de complementos alimenticios, como la glucosamina y el condroitín sulfato, ha sido descrita como una medida farmacológica para combatir el dolor articular en pacientes con artrosis, siendo una opción más segura que los AINEs, especialmente en pacientes geriátricos

[181]. En particular, el condroitín sulfato ha sido reconocido por su capacidad para inhibir la respuesta inflamatoria y catabólica en la articulación [182].

En algunos informes de casos clínicos se ha planteado que la glucosamina y el condroitín sulfato podrían tener un impacto positivo en la degeneración sintomática de los discos intervertebrales, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad [183]. El suplemento alimentario de otras sustancias naturales, como el ácido graso omega-3, ha demostrado tener efecto protector contra la degeneración de disco intervertebral en ratas [184].

Asimismo, numerosos estudios han resaltado las ventajas de la dieta mediterránea en el tratamiento de algunas enfermedades [185]. Esta dieta, reconocida por su principal componente lipídico, el aceite de oliva virgen extra (AOVE), ha sido extensamente documentada por sus efectos beneficiosos en la reducción de enfermedades inflamatorias [186], aterosclerosis [187], cáncer [188] y enfermedades neurodegenerativas [189].

Diversos componentes fenólicos hallados en el aceite de oliva han sido meticulosamente estudiados para indagar en su potencial farmacológico [190]. Dentro del AOVE, una fracción no saponificable alberga estos compuestos fenólicos y el tocoferol. Estos elementos ejercen como antioxidantes hidrofílicos y son exclusivos del aceite virgen debido a su pérdida durante el proceso de refinamiento [191].

Es relevante mencionar que varios estudios han mostrado que seguir una dieta mediterránea se relaciona con una disminución del riesgo de diversos tipos de cáncer y tasas de mortalidad por cáncer más bajas [9,10]. En el estudio PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea), se determinó que, tras 4,8 años de seguimiento, los pacientes que seguían una dieta mediterránea enriquecida con aceite de oliva virgen extra tuvieron una disminución en la incidencia de los eventos cardiovasculares de forma significativa [185]. Todo ello pone de manifiesto que un régimen alimentario alto en grasas insaturadas, como es la Dieta Mediterránea, podría ser una herramienta para la promoción de la salud [185].

En cuanto a las dolencias reumáticas, la dieta mediterránea ha sido descrita por reducir el dolor asociado a la enfermedad en pacientes con artritis reumatoide [192]. Además podemos destacar que ciertos componentes del aceite de oliva, como son los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y los polifenoles, han demostrado ciertos efectos en la mejora de

la degeneración de disco intervertebral y tratamiento del dolor asociado en modelos experimentales animales [184,193].

Entre los alimentos funcionales no estudiados interesantes en la DDI, quisimos centrarnos en el oleocanthal, compuesto fenólico derivado del aceite de oliva virgen extra. Este compuesto ya ha demostrado poseer características antiinflamatorias y cualidades farmacéuticas en cartílago articular que describiremos a continuación.

1.9.4 Oleocanthal

El oleocanthal (OC) fue documentado en 1993 por primera vez [194], siendo sólo una década más tarde cuando el compuesto, conocido entonces como (-)-decarboxylmethyl ligstroside aglycone (Figura 20), fue descrito como el responsable de la característica irritante del aceite de oliva. Debido a esta propiedad fue bautizado en ese momento como oleocanthal, de oleo (aceite), canth (de picor) y al (de aldehído) [195]. La sensación de picor generada por este compuesto evocaba la misma sensación que provocaba el ibuprofeno en forma líquida. Por lo tanto, se llevó a cabo una investigación para explorar sus propiedades antiinflamatorias, confirmando que esta molécula, en efecto, poseía esta característica. Esto condujo a una redefinición de la molécula como una sustancia natural antiinflamatoria no esteroidea [196,197].

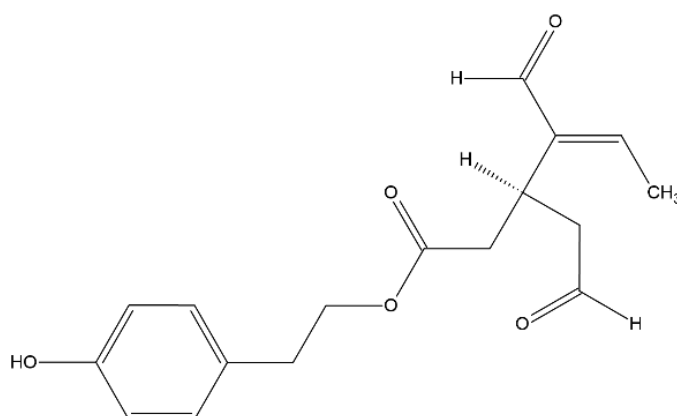


Figura 20. Estructura química del oleocanthal.

Nombre IUPAC: 2-(4-Hydroxyphenyl) ethyl (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl) hex-4-enoate. Imagen de elaboración propia.

La capacidad del oleocanthal para generar picor se limita solamente a la región orofaríngea, lo cual indica que en ella se encuentra situado un receptor sensorial específico, el llamado canal de cationes de potencial de receptor transitorio, subfamilia A, miembro 1 (TRPA1) [198]. Se

ha observado que este receptor está relacionado con procesos de inflamación crónica, lo que sugiere que las propiedades antiinflamatorias del oleocantal podrían ser el resultado de su interacción con este receptor. Es por ello que el grado de picor del aceite de oliva se relaciona con un mayor contenido de oleocantal, lo que, a su vez, se traduce en mayores beneficios.

1.9.4.1 Actividad antiinflamatoria del oleocantal

El primer indicio sobre la actividad antiinflamatoria del OC fue documentado por Beauchamp *et al.* comparando esta sustancia con el ibuprofeno [196]. El oleocantal ha sido definido como un AINE de origen natural por su efecto inhibitorio de las enzimas COX1 y COX2 (Figura 21) [196,197,199]. Cabe destacar, que, a igualdad de dosis, esta sustancia natural presentaba mayor eficacia que el ibuprofeno en la inhibición de dichas enzimas [196]. Estos efectos farmacológicos del OC, han sido descritos ser dosis-dependiente [195]. Además, se ha visto que el oleocantal es capaz de inhibir la 5-lipooxigenasa, inhibiendo la síntesis de leucotrienos [200].

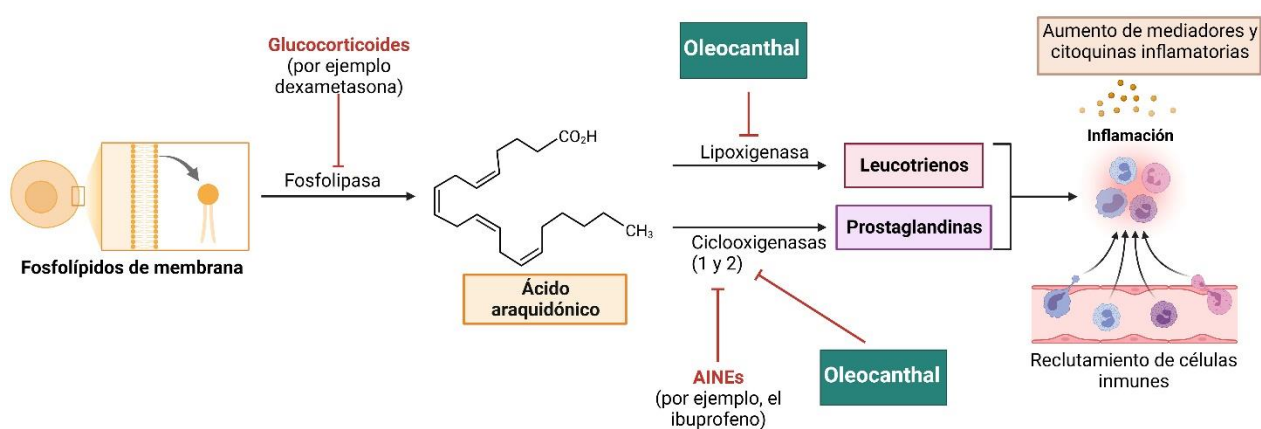


Figura 21. Representación esquemática de la actividad antiinflamatoria del oleocantal (OC).
Imagen de elaboración propia (Biorender®)

Diversos grupos de investigación han analizado cómo el OC y sus variantes impactan en la generación de óxido nítrico (NO) bajo la influencia del lipopolisacárido bacteriano (LPS) en células de cartílago. Este radical libre actúa como intermediario en la respuesta inflamatoria asociada a varias enfermedades degenerativas inflamatorias como la artrosis y artritis reumatoide [201]. Se constató que tanto el OC como su derivado 231 reducían la producción de nitritos y la expresión de la proteína iNOS, relacionada con la síntesis de NO, en condrocitos estimulados con LPS [197].

1.9.4.2 Actividad anti-cancerígena del oleocanthal

El consumo de aceite de oliva virgen extra ha sido ampliamente relacionado con la disminución en el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer [202–205]. La habilidad del OC de disminuir la inflamación crónica, una de las características fisiopatológicas del cáncer en estado temprano, lo convierte en una posible herramienta terapéutica para combatir dicha enfermedad.

El oleocanthal es capaz de inhibir la proliferación, invasión y migración celular de manera selectiva en células cancerígenas, ya que no posee actividad citotóxica en células no-cancerígenas [206]. El OC demuestra propiedades anticancerígenas a través de diversas vías. La vía de señalización HGF/c-Met (factor de crecimiento de hepatocitos/receptor del factor de crecimiento de hepatocitos c-Met), comúnmente reactivada en la progresión del cáncer, desempeña un papel crucial en la tumorigénesis, el crecimiento invasivo y la expansión metastásica. El OC se destaca como un potente inhibidor de esta vía, suprimiendo eficazmente la señalización de c-Met y afectando a la invasión, migración y proliferación celular tanto en cáncer de mama como de próstata. Además, el OC influye en moléculas posteriores en la vía de c-Met, como AKT, MAPK (quinasas activadas por mitógenos), STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) y mTOR (diana de rapamicina en mamíferos), mostrando efectos antiproliferativos. Más allá del cáncer de mama, se investigó la eficacia del OC en melanomas, carcinomas hepatocelulares y cánceres colorrectales, lo que subraya su potencial como agente anticancerígeno versátil [207,208]. Otra diana de inhibición del OC, es la proteína Hsp-90, crucial en la preservación de proteínas asociadas al desarrollo de tumores, siendo descrito este proceso inhibitorio en la línea U937.48 (línea celular de leucemia-linfoma de macrófagos humanos) [209]. También se ha demostrado el potencial de esta molécula para inhibir la proliferación de células de mieloma múltiple a través de la activación de mecanismos apoptóticos y la inhibición de las vías de señalización ERK-1/2 y AKT [210].

1.9.4.3 Rol del oleocanthal en enfermedades neurodegenerativas

El potencial terapéutico del OC como antiinflamatorio, lo convierte también en un compuesto prometedor para el tratamiento de enfermedades asociadas a inflamación a nivel neuronal, como el Alzheimer. Se han realizado estudios que exploran el efecto del OC en un modelo animal de Alzheimer utilizando ratones TgSwDI, demostrando su capacidad para reducir la activación de los astrocitos y los niveles de IL-1 β [211]. Este estudio, uno de los pocos que ofrece datos *in vivo* con este compuesto en relación a la neurodegeneración, reveló

que el OC puede disminuir la carga de placas amiloides y los vasos en el hipocampo. Esta disminución se correlaciona con un aumento en el aclaramiento cerebral a través de la barrera hematoencefálica, junto con un incremento de las proteínas glicoproteína P y la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteína LDL (LRP1) , y una activación de la vía de aclaramiento mediante la apolipoproteína E (ApoE) [211]. Es importante destacar que también se ha descrito que el aceite de oliva con un alto porcentaje de OC ha mostrado resultados similares en un modelo de Alzheimer en ratones 5xFAD [212].

Además, investigaciones recientes han descubierto que el OC también puede tener un impacto beneficioso al interferir con las rutas de agregación y eliminación de péptidos y proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas. El OC ejerce su efecto al inhibir la formación de fibrillas en la proteína tau mediante una reacción de entrecruzamiento covalente con los grupos ϵ -amino presentes en los residuos de lisina del fragmento de tau K18 [213]. Además, el OC se une de forma covalente a la proteína tau-441, induciendo cambios conformacionales que impiden la agregación de proteínas [214].

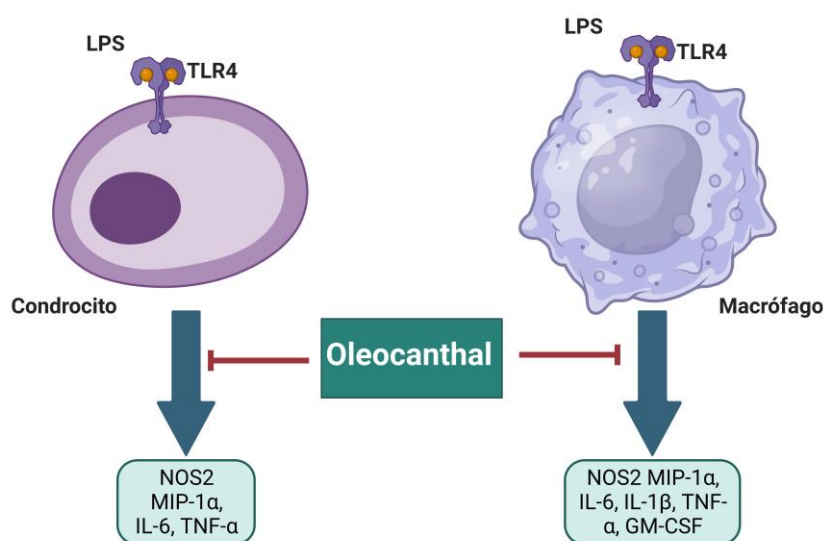
Cabe destacar que, el OC también interviene en la agregación de la proteína A β al modificar su estructura y su reactividad inmunológica, al tiempo que reduce la unión sináptica y su efecto sinaptotóxico. Además, se ha reportado que el OC estimula el flujo de salida y la eliminación de A β al regular de manera positiva las proteínas responsables del transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE), como la glicoproteína P y la LRP1 [215,216].

Adicionalmente, el OC disminuye la inflamación inducida por A β , restaura la expresión de proteínas de apoyo neurológico en los astrocitos que son negativamente reguladas por A β , como el transportador de glutamina GLT1 y el transportador de glucosa GLUT1, y previene la regulación negativa de las proteínas sinápticas en las neuronas SH-SY5Y-APP inducida por A β , incluyendo SNAP-25 y PSD-95 [217].

1.9.4.4 Oleocanthal como tratamiento en enfermedades reumáticas.

El OC se ha estudiado como un posible tratamiento para enfermedades reumáticas, como la artrosis y la artritis reumatoide. Se ha observado que este compuesto reduce la producción de NO y la expresión de NOS2 en la línea celular condrogénica murina ATDC5 estimulada con LPS [197]. Además, se ha demostrado que los condrocitos estimulados con LPS y pretratados con OC disminuyen la expresión y liberación de otras citoquinas inflamatorias, como la IL-6 y la proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa (MIP-1 α) [210].

Estos efectos se confirmaron, no solo en líneas celulares murinas, sino también en condrocitos primarios humanos obtenidos de pacientes con artrosis. Se observó que el oleocanthal actuaba como inhibidor de la producción de NO y redujo la expresión de citoquinas y mediadores proinflamatorios como NOS2, COX2, IL-6, IL-8, CCL3, LCN2 y TNF α en células estimuladas con LPS. Además, el OC también disminuyó la expresión de MMP13 y ADAMTS5, lo que lo convierte en un posible tratamiento para contrarrestar la degradación de la matriz en el cartílago articular [199].



*Figura 22. Efecto del oleocanthal en macrófagos y condrocitos estimulados con LPS
Imagen de elaboración propia (Biorender®).*

Además del estudio con condrocitos, se evaluaron los efectos del OC en macrófagos, células encargadas de regular la inflamación y la degradación de la matriz en la artrosis [218]. Los resultados obtenidos en la línea celular J774A.1 fueron similares a los hallados en los condrocitos (Figura 22). El oleocanthal indujo una reducción significativa de la producción de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, MIP-1 α , IL-1 β y TNF α , además de disminuir el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) [218].

Esta sustancia, que demostró ser capaz de inhibir mediadores y citoquinas cruciales en el entorno inflamatorio del cartílago, ha emergido como una candidata prometedora para el tratamiento de la artrosis. Por lo tanto, es importante destacar que también podría desempeñar un papel relevante en la investigación del disco intervertebral, un tejido con similitudes fisiopatológicas al cartílago articular.

Hipótesis y Objetivos

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Se ha documentado previamente que los procesos catabólicos en condrocitos humanos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, están regulados por el factor de transcripción ELF3, cuya expresión se ve influenciada por diversos estímulos inflamatorios. Además, se ha demostrado una correlación entre la obesidad y la inflamación, evidenciando la interacción sinérgica entre la adipocina leptina y IL-1 β para potenciar la inducción de ELF3 en los condrocitos. Esta adipocina no solo ha mostrado su capacidad de sinergia con otros factores proinflamatorios en condrocitos, sino que también desempeña un papel catabólico en el cartílago articular por sí sola.

A pesar del conocimiento de la implicación de estos factores en procesos inflamatorios asociados con enfermedades como la artrosis, su papel específico en otras patologías, como la degeneración de disco intervertebral, aún no ha sido caracterizado. Del mismo modo, aún queda por investigar el potencial de nuevas sustancias, como el oleocantal, reconocidas por sus propiedades protectoras contra la inflamación y el catabolismo en el cartílago. Por lo tanto, y debido a la similitud fisiopatológica existente entre el cartílago articular y las células del núcleo pulposo y el anillo fibroso del disco intervertebral, planteamos la hipótesis de que los mecanismos previamente estudiados en el cartílago articular podrían operar de manera análoga en el disco intervertebral, lo que proporcionaría un nuevo marco para la comprensión de la fisiopatología subyacente en la DDI.

El principal objetivo de esta tesis es impulsar el conocimiento de los mecanismos de la degeneración de disco intervertebral, para ofrecer nuevas oportunidades de tratamiento y nuevas terapias. Por ello, los objetivos particulares que hemos perseguido han sido:

1. Estudio metabólico de muestras de disco humano, sano y degenerado. Este objetivo se centra en estudiar los perfiles metabólicos endógenos de muestras de células tomadas de sujetos en estado sano o degenerado, utilizando la Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución-Espectrometría de Masas.
2. Imitar el estado proinflamatorio con IL-1 β y la adipocina leptina, y posterior estudio de su perfil molecular para determinar los cambios.

3. Valorar la expresión del factor de transcripción ELF3 en tejido de disco sano y degenerado y su modulación con diferentes estímulos proinflamatorios o antiinflamatorios.
 - 3.1. Efecto de la IL-1 α , IL-1 β , IFN γ , TNF α y LPS en la expresión del factor de transcripción ELF3.
 - 3.2. Efecto de la leptina en la expresión del factor de transcripción ELF3, sola y en combinación con IL-1 α .
 - 3.3. Efecto de la dexametasona en la expresión del factor de transcripción ELF3 cuando se induce un estímulo inflamatorio.
 - 3.4. Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento del gen ELF3.
 - 3.5. Efecto del oleocanthal como posible tratamiento antiinflamatorio y regulador del factor de transcripción ELF3.

Metodología

3 METODOLOGÍA

3.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE DISCO INTERVERTEBRAL

Las células de los discos intervertebrales humanos (Figura 23) se obtuvieron a partir de extracciones realizadas en pacientes sometidos a intervenciones por patologías asociadas a la degeneración discal, así como de donantes sanos.

Todo este procedimiento se llevó a cabo mediante la obtención de consentimientos informados por parte de los pacientes, en conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki. Esta investigación se enmarca dentro del proyecto PI20/00902 titulado “*Adipokines and E74-like factor 3 (ELF3): a novel loop in the signaling pathways of inflammatory response in the intervertebral disc degeneration*”, el cual ha sido revisado y aprobado por el Comité Ético de Galicia de Investigación Clínica (Código de Registro:2017/279).

Como criterios de inclusión se consideraron pacientes de rangos de edad entre 39 y 71 años que fueron intervenidos por degeneración de disco intervertebral. En el caso de las muestras sanas se obtuvieron de autopsias de ambos sexos con edades entre 19 y 69 años, sin antecedentes de degeneración discal en su historial clínico. Por otro lado, se establecieron criterios de exclusión para pacientes que padecieran hiperglucemia o diabetes tipo II, debido a la posibilidad de generar respuestas diferentes a estímulos inflamatorios, lo que constituiría un factor de confusión en los resultados.

En cuanto al disco sano, se pudieron diferenciar las dos partes que conforman el mismo, anillo fibroso y núcleo pulposo, siendo este último muy escaso. Sin embargo, en caso del disco degenerado, la muestra llega en un estado de degeneración avanzado, no se puede hacer en ningún caso distinción de estos dos tipos de células. Una de las limitaciones de nuestros estudios es la escasez de muestra sana, ya que estas muestras provienen de pacientes que no tenían ninguna enfermedad coadyuvante y generalmente sufrían una muerte debida a un traumatismo o accidente de tráfico. Por dicha razón, solamente experimentos seleccionados se realizaron en disco sano. Las muestras procedían de pacientes del Hospital Clínico de Santiago de Compostela, donde se sitúan las instalaciones del laboratorio NEIRID, lo que permitió el

procesamiento inmediato de las muestras tras su extracción, garantizando una mayor eficiencia en el aislamiento celular.

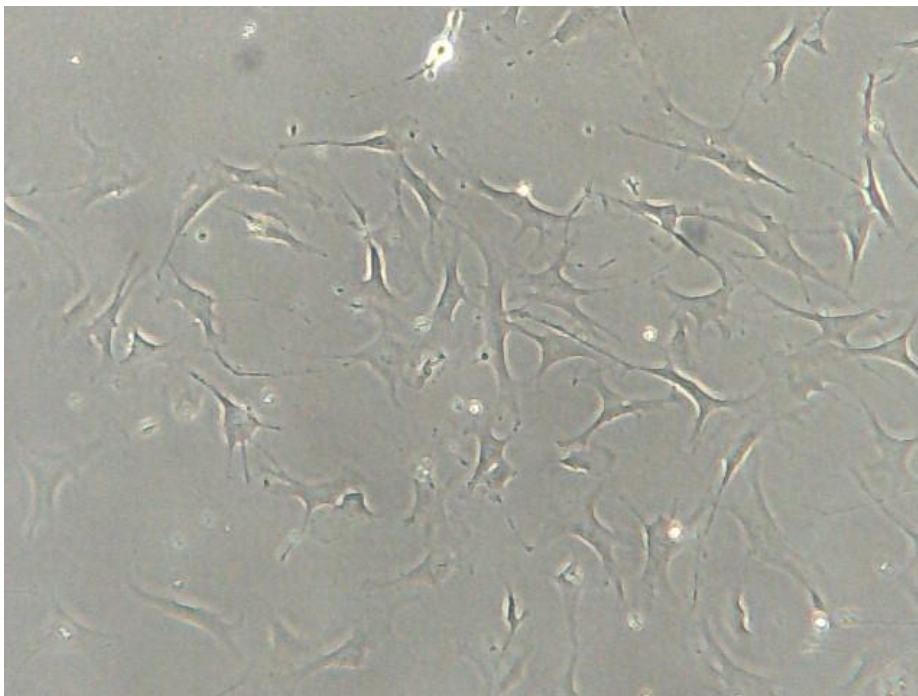


Figura 23. Vista de células de disco degenerado a microscopio óptico 40x. Imagen de archivo propio.

Las muestras llegaban sumergidas en suero salino, se lavaban rigurosamente en una solución de DMEM sin suero con 50 U/ml penicilina y 50 U/ml estreptomicina. Tras lo cual se procedía a trocear el tejido con un bisturí sobre una placa p100, incubándose después con una solución de pronasa [1mg/ml en DMEM/F12 + antibiótico + 10% de suero fetal bovino (FBS)] durante 30 minutos a 37°C en un incubador. Pasado este tiempo, se realizaban varios lavados con PBS 1X. Acto seguido se procedía a la incubación con colagenasa P (1 mg/ml en DMEM/F12 + antibiótico + 10% de FBS) durante 5-6 horas a 37°C en agitación constante.

Tras este proceso, la suspensión se filtraba a través de un filtro de 40 μ m y el eluido que contenía las células del disco intervertebral se centrifugaba durante 10 minutos a 200g. El pellet resultante, compuesto por las células, se sembraba en una placa hasta alcanzar la confluencia deseada. Todas estas etapas se llevaban a cabo bajo condiciones de esterilidad, dentro de una campana de cultivos.

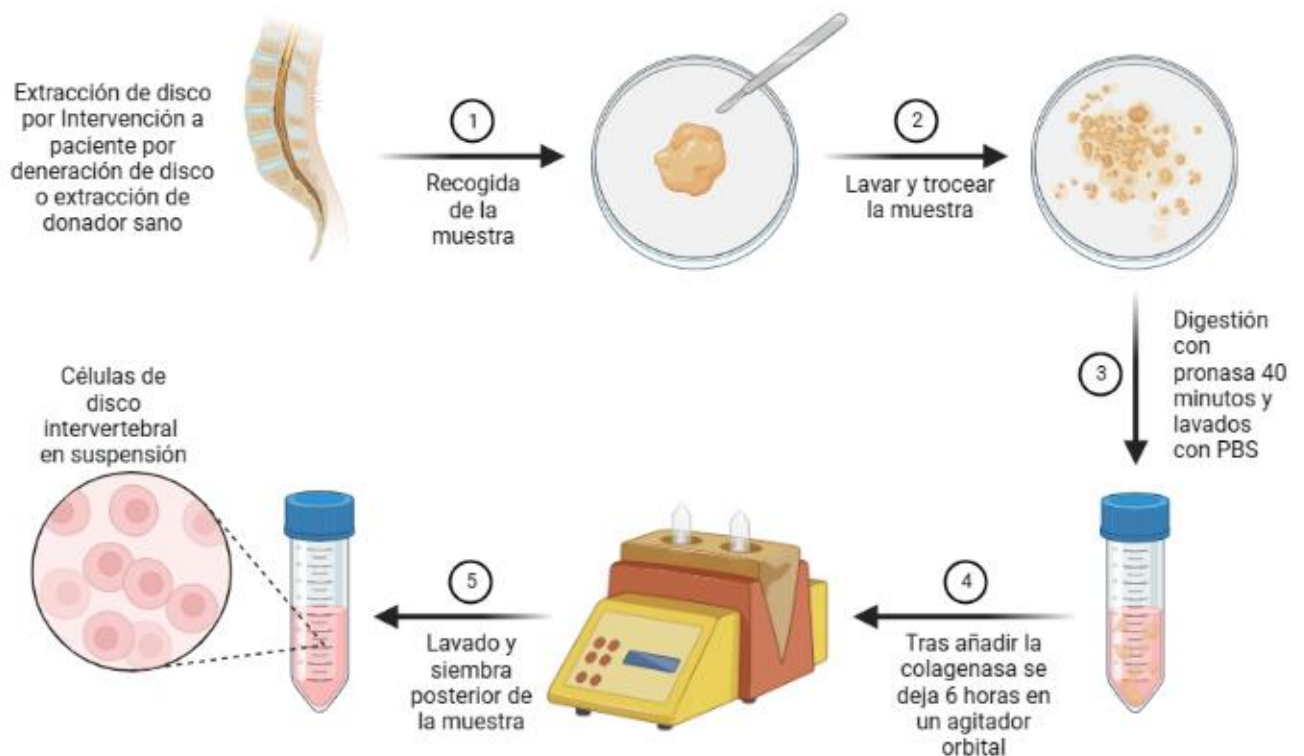


Figura 24. Esquema representativo del protocolo de procesamiento de una muestra de disco intervertebral. Imagen de elaboración propia en Biorender®.

Para el mantenimiento celular adecuado, se procedía al cambio de medio de cultivo de las células cada dos días. Para determinar el número de células en los experimentos, se contaban mediante el uso de Azul Tripán en una cámara de Neubauer.

En el proceso de pasaje celular, se retiraba el medio de cultivo y se agregaba 1 ml de tripsina/0.5% EDTA por pocillo, tras realizar un lavado previo con PBS 1X. Después de añadir la tripsina, se permitía que actuara durante 5 minutos en el incubador a una temperatura de 37°C para asegurar el desprendimiento total de las células en la placa. Luego, se procedía a la resuspensión en medio completo. Tras centrifugar y retirar la tripsina utilizada, las células se volvían a resuspender para el sembrado en los experimentos. Se llevaban a cabo un máximo de 3 pases celulares para evitar la dediferenciación celular.

3.2 EXTRACCIÓN DE ARN MENSAJERO

Para la extracción del ARN mensajero se emplearon NZYol (NZYTech, Lisboa, Portugal) y el kit E.Z.N.A de ARN total (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA). Inicialmente, las células se sembraron y se trataron en placas p6 con una densidad de 2×10^5 células por pocillo. Una vez finalizado el tratamiento, se retiraba el medio de los pocillos y se agregaba NZYol. Posteriormente, se homogeneizaba la mezcla mediante pipeteo y se transfería a tubos tipo Eppendorf. En estos tubos, se añadían 150 μ l de cloroformo, se mezclaban vigorosamente y se dejaban reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Después de esta etapa, se procedía a una centrifugación a 12000 rpm a 4°C durante 20 minutos. La fase superior, que contiene el ARN, se transfería a nuevos tubos Eppendorf, a los cuales se les añadía una cantidad igual de etanol al 70%. Tras una correcta mezcla, esta solución se vertía a columnas de ARN junto con un colector y se centrifugaba a 10000 g durante 1 minuto. El filtrado resultante se desechaba y se añadían 250 μ l de tampón de lavado I. Posteriormente, se centrifugaba bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Luego, se añadían 75 μ l de DNAsa y se dejaban incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se añadían otros 250 μ l de tampón de lavado I y se centrifugaban de nuevo.

Se cambió el tubo colector y se procedió a dos lavados consecutivos con 500 μ l de tampón de lavado II. Finalmente, se centrifugó a 14000 g durante 2 minutos para asegurar la completa eliminación de la solución residual en el filtro de la columna. Después de esta etapa, se trasladaban las columnas a los tubos Eppendorf finales donde se almacenaría el ARN. Se añadieron 25 μ l de agua libre de nucleasas en el centro de la columna, se dejó incubar durante 2 minutos y posteriormente se centrifugó durante 2 minutos a 14000 g.

El ARN resultante se cuantificó en un Nanodrop® y se guardó a -70°C hasta su uso. Para comprobar la calidad del ARN obtenido, se observaron que las ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 fueran superiores a 2 y 1.7 respectivamente.

3.3 RT-qPCR

3.3.1 Reacción de transcripción inversa (RT)

La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el kit "NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit" de NZYTech (Lisboa, Portugal), siguiendo estrictamente las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Las cantidades de ARN total de partida fueron de entre 0.1 y 1 µg. Se diluyeron las cantidades de ARN para normalizar la cantidad de ARN total entre todas las muestras de cada experimento.

Posteriormente, se preparó la mezcla "master mix" del kit, utilizando 10 µL por muestra, junto con el mix enzimático, añadiendo 2 µL por muestra. La primera fase de la transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador durante 10 minutos a 25°C, seguido de 30 minutos a 50°C y finalmente 5 minutos a 85°C.).

En la etapa final, se agregó la ARNasa y se procedió a la segunda fase de la transcripción inversa, manteniendo la reacción durante 20 minutos a 37°C (realizada también en termociclador). El ADNc resultante se conservó a -20°C hasta su utilización posterior.

3.3.2 qPCR

Se llevaron a cabo PCRs cuantitativas a tiempo real realizadas en AriaMx Real-time PCR System (Agilent Technologies, Reference código G8830A) utilizando el protocolo estándar: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Además, se llevó a cabo un análisis de la curva de disociación posterior con 1 ciclo a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 30 segundos y 95°C durante 30 segundos. Se llevó a cabo esta curva de disociación para evaluar la especificidad de la amplificación y detectar la formación de productos no específicos o dímeros de cebadores. Con ello, evaluamos la especificidad y pureza de los productos amplificados.

El sistema AriaMx Real-time PCR System, nos permite hacer un análisis cuantitativo relativo a un control, al que se asigna el valor de 1. Todos los resultados obtenidos fueron comparados con un control sin tratamiento de manera que los diferentes tratamientos son expresados de forma relativa a este valor del calibrador.

En cada muestra, se analizaron los genes de interés y un gen normalizador, principalmente gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que se mantiene constante con los tratamientos. El gen normalizador se utilizó como control de carga para asegurar que las diferencias observadas se deben a los efectos de los tratamientos.

El sistema de cuantificación que utiliza nuestro programa es conocido como $\Delta\Delta Ct$, siendo Ct el ciclo a partir del cual la amplificación empieza a ser estadísticamente significativa. Ya que el Ct es inversamente proporcional al ADNc y sabiendo que en cada ciclo de PCR se duplican las copias, la expresión del gen viene dada por la fórmula:

$$\text{Expresión génica} = 2^{-Ct}$$

Ya que, como hemos dicho, las expresiones génicas se tienen que normalizar con un gen que permanece inmutable a los tratamientos, se divide la expresión del gen problema entre el gen normalizador, obteniendo lo siguiente:

$$\text{Expresión génica} = \frac{2^{-Ct(\text{gen interés})}}{2^{-Ct(\text{gen normalizador})}} = 2^{-[Ct(\text{gen int}) - Ct(\text{gen norm})]} = 2^{-\Delta Ct}$$

Después de normalizar cada gen respectivamente con su control de carga, se realizan los cálculos de cuantificación relativa con la muestra control.

Se determina el número de veces que aumenta o disminuye una condición o tratamiento con respecto al control. Para ello, se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{2^{-\Delta Ct(\text{gen tratamiento})}}{2^{-\Delta Ct(\text{control})}} = 2^{-[\Delta Ct(\text{gen trat}) - \Delta Ct(\text{control})]} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

También como control de calidad de la PCR se añade un pocillo a la placa con la mezcla del cebador sin ningún tipo de muestra, que nos indicará la posible contaminación en el caso que el cebador amplifique si no se le añade ADNc.

Master mix utilizada: SYBR green qPCR Master Mix de Qiagen

Tabla 1. Cebadores utilizados (marca Qiagen):

Catálogo	Descripción	Símbolo	Número de secuencia
PPH09786B	E74-like factor 3	ELF3	NM_004433.4
PPH00121B	Metaloproteinasa de matriz 13	MMP13	NM_002427
PPH00446E	Lipocalina 2	LCN2	NM_005564.3
PPH00150E	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	NM_002046.3
PPH01136F	Sintasa de prostaglandina-endoperóxido 2 (sintasa de prostaglandina G/H y ciclooxigenasa)	COX2	NM_000963
PPH00560C	Interleuquina 6	IL-6	NM_000600
PPH00173E	Óxido nítrico sintasa 2	NOS2	NM_000625
PPH00152E	Metaloproteinasa de matriz 9	MMP9	NM_004994
PPH72244A	Interleuquina 1 beta	IL-1β	NM_000576
PPH00568A	Interleuquina 8	CXCL8	NM_000584
PPH00341F	Factor de necrosis tumoral α	TNFα	NM_000594
PPH02482B	Progranulina	GRN	NM_002087
PPH16287B	Nicotinamida fosforribosiltransferasa	NAMPT	NM_005746
PPH19934A	Nucleobindina 2	NUCB2	
PPH08354A	Miembro 2 de la familia E de serpinas	SERPINE2	NM_006216
PPH02377A	Respondedor del receptor de ácido retinoico 2	RARRES2	NM_002889
PPH14333A	Grelina	GHRL	NM_016362
PPH17251E	Péptido antimicrobiano expresado en el hígado-2	LEAP2	NM_052971
PPH00623E	Molécula de adhesión de células vasculares 1	VCAM1	NM_001078
PPH01018C	Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	HPRT	NM_000194
PPH00235F	Metaloproteinasa de matriz 3	MMP3	NM_002422
PPH00028B	Receptor de leptina	LepR	NM_002303
PPH00581F	Leptina	LEP	NM_000230

3.4 TRANSFORMACIÓN Y TRANSFECCIÓN.

3.4.1 Bacterias competentes

Para llevar a cabo la transfección, se adquirieron las ProClone™ Competent Cells, derivadas de E.coli (células DH5α), para la transformación de vectores de expresión.

Se utilizó un medio de cultivo LB (compuesto por triptona, extracto de levadura, NaCl y agar) con ampicilina. Las bacterias se sembraron en placas utilizando el método de estría cruzada y se incubaron durante toda la noche a 37°C

A partir de las colonias obtenidas, se seleccionó una y se inoculó en 5 ml de medio LB líquido (triptona, extracto de levadura, NaCl y NaOH) y se realizó la incubación de la misma durante toda la noche en agitador orbital.

Posteriormente se transfirieron 0.5 ml de ese precultivo a 50 ml de LB líquido y se incubó a 37°C en agitación hasta que la densidad óptica a 590 nm se encontró entre 0.4 y 0.6. Hecho esto, se centrifugó el cultivo bacteriano, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet bacteriano en un buffer que contiene: 10% PEG, 5% DMSO, 10 mM MgCl₂ y 10 mM MgSO₄. A continuación se añadieron 625 µl de glicerol al 50% estéril, se hicieron alícuotas de 100 µl y se guardaron en el congelador a -80°C.

3.4.2 Transformación

El protocolo de transformación se llevó a cabo mediante shock térmico, la alícuota de bacterias se dejó en hielo durante 10-15 minutos y se le añade ADN plasmídico ELF3 y se mezcló suavemente para después incubarlo de nuevo durante 30 minutos. Tras este tiempo de espera se realizó el choque térmico a 42°C durante 45 segundos y después 2 minutos en hielo, añadiendo 150µL de LB a las bacterias competentes. Tras este proceso se incubaron 1 hora a 37°C en continua agitación. Este procedimiento de choque térmico es fundamental para facilitar la entrada del ADN plasmídico en las bacterias y promover la transformación exitosa.

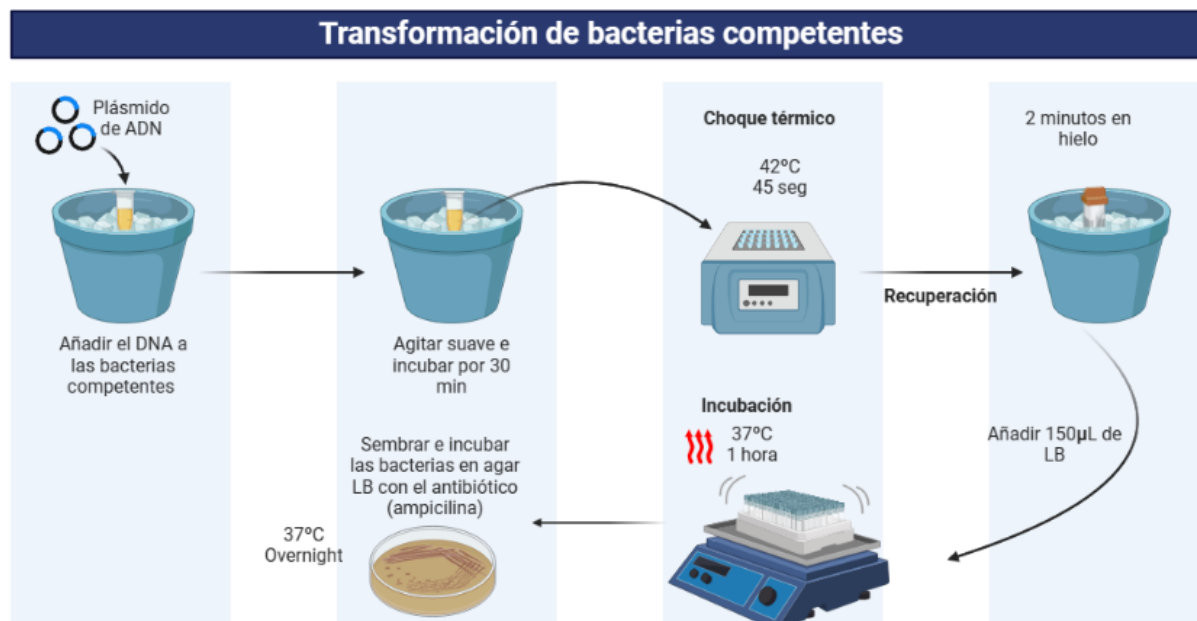


Figura 25. Representación gráfica del protocolo de transformación de bacterias competentes. Elaboración propia (Biorender®).

3.4.3 Transfección para sobreexpresión de ELF3

Las transfecciones se llevaron a cabo utilizando los plásmidos obtenidos de las midipreparaciones. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad de 2×10^5 células por pocillo, alcanzando las mismas una confluencia de entre el 75-90%. Antes de la transfección, el medio de cultivo fue reemplazado por Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific).

Se preparó una mezcla de transfección combinando medio Opti-MEM I, 100 ng de ADN plasmídico (pELF3: vector de expresión de ELF3 o pCI: vector vacío) y TransFectin™ Lipid Reagent (BioRad) en la proporción recomendada por el fabricante. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la formación de complejos.

Posteriormente, la mezcla de transfección se añadió gota a gota a las células, las cuales se incubaron a 37°C durante 24 horas para permitir una eficiente transfección. Después de 24 horas de transfección, el medio de transfección se reemplazó por DMEM y α MEM (6:4) suplementado con un 20% de FBS.

Luego, a las 48 horas posteriores a la transfección, las células se estimularon con IL-1 α a una concentración de 0.1 ng/mL durante 24 horas, seguido por la extracción de proteínas y

El plásmido utilizado para la sobreexpresión proteica fue ELF3, cedido por la Dra. Goldring del Hospital for Special Surgery de Nueva York. Se comprobó mediante análisis de la expresión de ARN mensajero, que dichas transfecciones fueron satisfactorias.

3.4.4 Silenciamiento del gen ELF3

Se realizó el silenciamiento del gen ELF3 mediante el uso del kit TriFECTa® RNAi. Para ello se procedió a la siembra de una densidad de células de 2×10^5 células por pocillo (en p6), tras 24 horas se procedió a la transfección del siRNA del gen ELF3 del kit TriFECTa® RNAi (Integrated DNA Technologies) junto con el reactivo siLentFect (BioRad), lípido idóneo para la transfección de ARN de interferencia. La transfección se llevó a cabo en medio Opti-MEM™, sin antibiótico.

La concentración utilizada para el silenciamiento fue de 20nM, añadiendo el siRNA a un tubo con 125μL de medio Opti-MEM™, por otro lado, preparando el reactivo siLentFect en otros 125μL de Opti-MEM™, una vez preparados a las concentraciones adecuadas, se mezclaron ambas preparaciones, dejándolas incubar durante 15 minutos. Este tratamiento se añadió a las células, dejándolo actuar durante 4 horas, tras las cuales se les retiró el medio cambiándolo por su medio habitual, y se les dejó durante 48 horas su recuperación y correcto silenciamiento. Pasado este tiempo se llevó a cabo el tratamiento con IL-1α.

3.5 VIABILIDAD CELULAR

Con el fin de evaluar el potencial citotóxico de las distintas sustancias naturales utilizadas en esta tesis, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico de 4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Este ensayo nos permite estudiar la actividad metabólica de las células vivas dentro del cultivo celular, debido a que la metabolización del MTT depende de la actividad redox celular y siendo por tanto un marcador de su estado metabólico. Al mismo tiempo, se utiliza como medida indirecta de viabilidad o proliferación de las células.

Específicamente, se evaluó el potencial citotóxico del oleocanthal en un rango de dosis de 1 a 5 μM. Este ensayo está basado en la oxidoreductasa mitocondrial NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) que tiene la capacidad de reducir las sales de tetrazolium en

cristales insolubles que tornan en color púrpura, este color, es medido en un rango de 598nm mediante la ayuda de un espectrofotómetro [219].

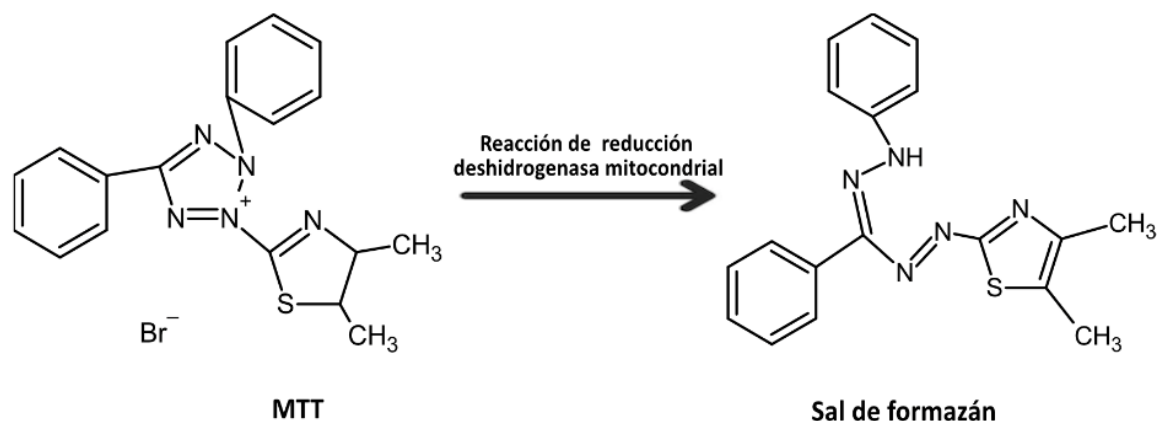


Figura 26. Reducción enzimática de 4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) a sal de formazán [220].

Imagen de elaboración propia.

El compuesto resultante de la reacción, la sal de formazán, resulta ser proporcional al número de mitocondrias funcionales en las células vivas.

Para llevar a cabo este ensayo, se sembraron 8000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se permitió su adhesión durante un día. Se realizó una serodeprivación de las células durante 4 horas previas al tratamiento. Luego, se expusieron las células a diferentes concentraciones de oleocanthal con un pretratamiento de 4 horas. Tras este pretratamiento, se procedió a tratarlas con LPS o IL-1 α a una concentración de 100 ng/ml o 0.1ng/ml respectivamente durante 24 horas a 37°C.

Previo a la finalización del tratamiento se añade el MTT (4 horas antes) a una concentración de 0.5mg/ml. Pasadas 4 horas, y coincidiendo con las 24 horas del tratamiento con el LPS/IL-1 α , se añade un agente solubilizante (SDS 10% in HCl 0.01M), que se encarga de disolver la sal de formazán. La absorbancia se midió 24 horas después de añadir el agente solubilizante en un lector de ELISA a una longitud de onda de 550nm (Titertek Multiscan; Labsystems, Helsinki, Finland).

La viabilidad fue medida comparando el control de las células sin tratar, utilizando la siguiente fórmula:



$$\text{Viabilidad celular}(\%) = \frac{\text{Absorbancia del tratamiento}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

3.6 ENSAYOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Para la técnica de inmunohistoquímica, las muestras se incubaron en portaobjetos a temperatura ambiente. Se inició con un bloqueo utilizando una solución de recuperación de epítomos inducida por calor a pH alto (97°C) durante 20 minutos. Luego, se aplicó el anticuerpo primario, Anti-ESE-1 (ab97310) (Abcam), diluido a 1:100, durante 30 minutos, eliminando el exceso de solución tamponada posteriormente. Después de un lavado adecuado con solución tamponada, se aplicó el polímero marcado con HRP durante 20 minutos, utilizando el sistema EnVision® + Dual Link System HRP (polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano picante y anticuerpos aislados de cabra anti-mouse y anti-rabbit) (Dako Agilent, K4065).

A continuación, se aplicó la solución de sustrato cromógeno, cubriendo la muestra adecuadamente con DAB+ (1 mL de solución tampón de sustrato que contiene peróxido de hidrógeno y 20 µL de 3,3'- solución cromógena de tetraclorhidrato de diaminobencidina) durante 10 minutos. Finalmente, se realizó la contratinción con hematoxilina (Hematoxilina EnVision FLEX) durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron las muestras con agua destilada y se procedió a la observación bajo el microscopio.

3.7 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA

Después de completar el tratamiento correspondiente, se descartó el medio de las células y se procedió a realizar un lavado con PBS frío, el cual también fue descartado. Luego, se añadieron 50 µL de un tampón de lisis compuesto por 10 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 30 mM de sodio pirofosfato, 50 mM de fluoruro de sodio, 1 mM de sodio ortovanadato, 0.5% de Triton X-100, 1 mM de PMSF y 0.5M de EDTA. Además, se incorporó un cóctel inhibidor de proteasas (AEBSF, Aprotinina, Bestatina, E64, Leupeptina, Pepstatina A) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Con la ayuda de un raspador despegamos todas las trazas de células junto con el tampón de lisis para obtener las proteínas, este tampón de lisis de cada pocillo se pasó a tubos tipo Eppendorf, los cuales fueron sometidos a una vigorosa agitación en vortex cada 5 minutos durante un total de 20-25 minutos. Después de esta incubación se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet fue descartado, y el sobrenadante, que contenía las proteínas, se almacenó a -40°C para su uso posterior.

3.7.1 Cuantificación de la proteína

Para llevar a cabo la cuantificación de las proteínas extraídas se utilizó el método Bradford, (DC protein assay, Biorad), con albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar.

Se generó una curva estándar utilizando diferentes concentraciones conocidas de BSA para establecer la relación entre la absorbancia y la concentración (Figura 27).

Recta patrón para cuantificación de proteínas

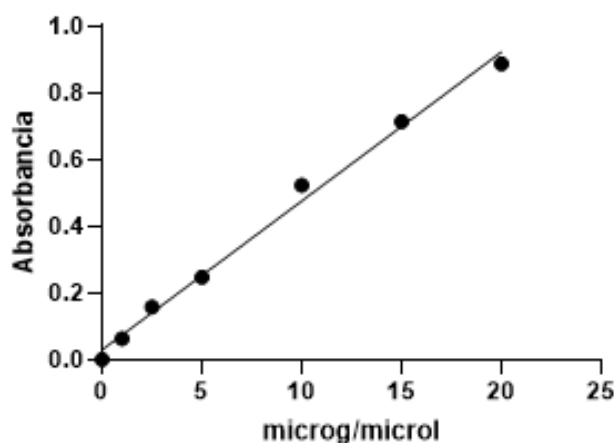


Figura 27. Ejemplo de recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford.

Las muestras se prepararon mediante una dilución de 1:5 de reactivo de Bradford con agua destilada (800 μL de agua destilada, 198 μL de reactivo de Bradford y 2 μL de muestra). Después de la adecuada preparación y agitación, se transfirieron las muestras a cubetas y se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro.

3.8 WESTERN BLOT

Después de la extracción de proteínas, se procedió a la preparación de las muestras para el ensayo de Western Blot. Se ajustó la cantidad de proteína a utilizar por muestra en un rango de 20 a 40 μg y se mezcló con la cantidad adecuada de buffer de carga (75% de proteína y 25% de buffer de carga). Posteriormente, las muestras fueron calentadas a 100 $^{\circ}\text{C}$ en un termobloque durante 5 minutos.

Para la electroforesis en geles de acrilamida, se prepararon dos tipos de geles: el gel concentrador (stacking) y el gel separador (resolving). El gel concentrador, con un pH más ácido, permite el rápido movimiento de las proteínas hacia el siguiente gel, mientras que el gel

separador discrimina las proteínas según su peso molecular. En general, se utilizaron geles al 10% de acrilamida.

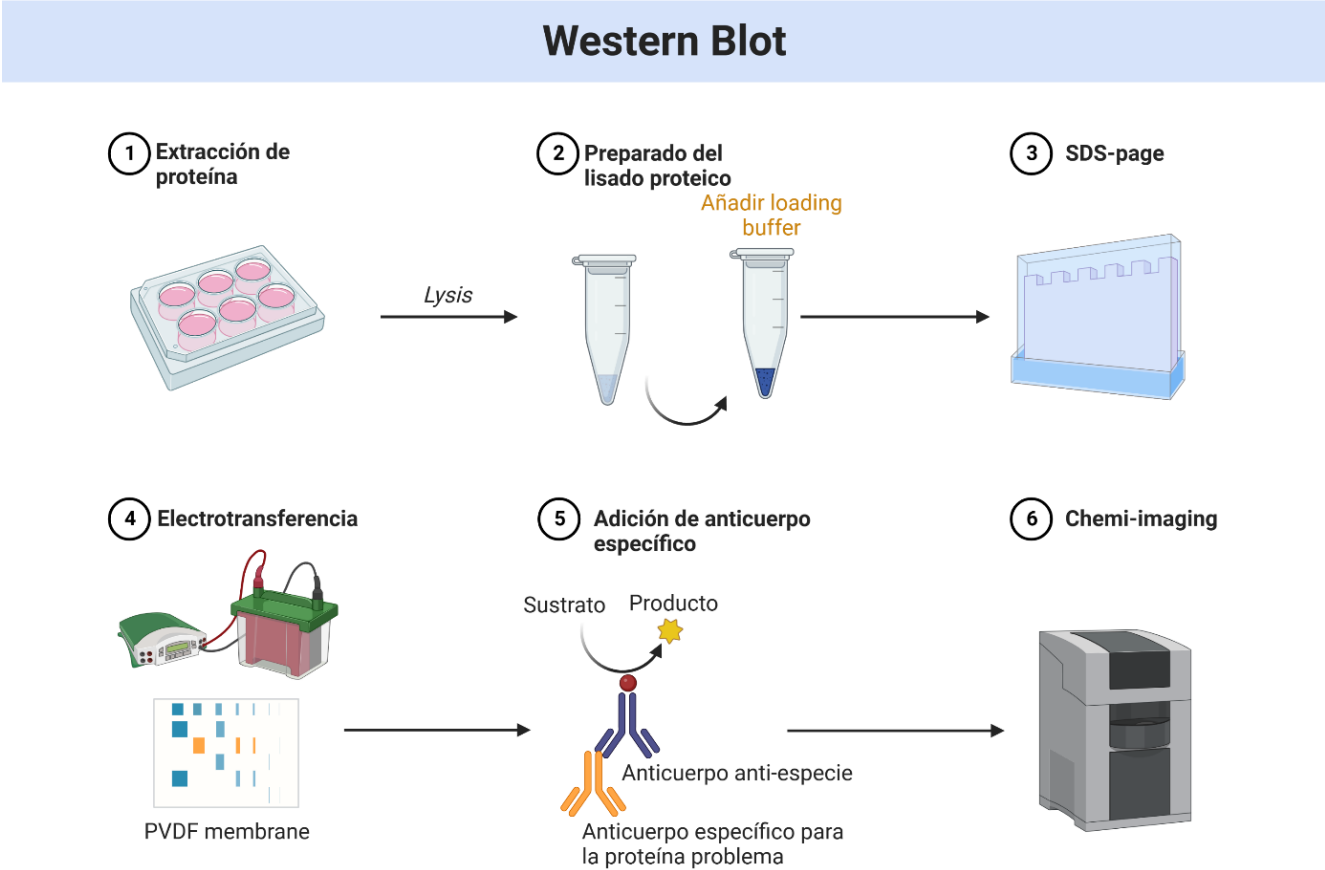


Figura 28. Esquema del protocolo de Western Blot.

Se representa el proceso de elaboración del Western Blot. 1. Tras haber realizado el tratamiento se procede al lisado de las proteínas 2. Se prepara el lisado proteico con el buffer de carga 3. Se preparan los geles SDS-page. 4. Se procede a la electrotransferencia en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). 5. Se añaden los anticuerpos (primario toda la noche y secundario 1 hora) 6. Tras los lavados después del anticuerpo secundario se procede a la lectura.

Soluciones para preparar geles electroforesis de SDS:

Gel separador	10% (25-100 kDa)	
10ml por gel	x1	x2
H ₂ O	4 ml	7.9 ml
Acrilamida mix 30%	3.3 ml	6.7 ml
Tris HCl 1.5M pH8.8	2.5 ml	5 ml
SDS 10%	100 µl	200 µl
APS 10%	100 µl	200 µl
TEMED	4 µl	8 µl
Volumen total (ml)	10	20

Gel concentrador	(5%)	
4ml por gel	x1	x2
H ₂ O	2.7 ml	5.5 ml
Acrilamida mix 30%	670 µl	1.3 ml
Tris HCl 1 M pH6.8	500 µl	1 ml
SDS 10%	40 µl	80 µl
APS 10%	40 µl	80 µl
TEMED	4 µl	8 µl

Cuando se tienen preparados los geles en la cubeta de Western Blot, se hacen correr las proteínas a través del gel hasta que se separan adecuadamente, acto seguido se pasa a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante el método de transferencia. La membrana de PVDF se activa previamente con metanol, durante 30 segundos, más tarde se hace un lavado a la misma con agua durante 5 minutos y se deja con tampón de transferencia (100ml TGS 10x, 200ml metanol y 700ml de agua destilada) hasta su uso.

Se realizó transferencia semiseca en el aparato Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio Rad), poniendo papel de filtro grueso, la membrana de PVDF, el gel con las proteínas (descartando el gel concentrador) y colocando encima más papel de filtro grueso, todo ello convenientemente hidratado en tampón de transferencia. Y se procede a la transferencia de 1 hora con un amperaje fijo de 250mA (350mA en el caso de dos geles).

Una vez transferidas las proteínas a las membranas se procedió a bloquear las mismas con tampón de bloqueo hecho con leche al 5% (skim milk powder VWR chemicals) en una solución de Tris Buffer Saline-Tween 20 (TBS-T al 1%) por una hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios (Tabla 2) se resuspendieron en una solución de TBS-T al 1% de BSA utilizando la ratio de uso recomendado por el fabricante (generalmente una dilución 1:1000, en tampón de bloqueo), incubando la membrana durante toda la noche a 4°C.

Tras la incubación de la membrana, se lavó la misma con TBS-T: 4 lavados durante 10 minutos cada uno a temperatura ambiente y en un agitador. Tras ello se le añade a la membrana el anticuerpo secundario correspondiente (dependerá de la naturaleza del anticuerpo primario) a una concentración de 1:2000 en BSA al 1% en TBS-T, dejándolo incubar durante una hora a temperatura ambiente y agitación.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se vuelve a lavar 4 veces la membrana con TBS-T durante 10 minutos cada lavado. Tras estos lavados, la membrana está lista para ser revelada, este proceso se realizó con Immobilon® (Millipore) como agente revelador, con una mezcla del mismo 1:1 de los reactivos que lo conforman, y se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron obtenidas con el sistema ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc.), y la densitometría posterior se realizó con el software Image Lab 6.0.1 Software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA). Una vez revelada la membrana, se retiró el anticuerpo, liberando nuevamente las proteínas en la membrana para posteriores anticuerpos problema. Como proteína control de carga utilizamos el anticuerpo de GAPDH, que nos permite confirmar las diferencias de expresión en la proteína de interés en función de los tratamientos normalizando la cantidad cargada en el gel de las mismas.

Como proceso de deshibridación de los anticuerpos (stripping) se utilizó un tampón con SDS 10%, Tris-HCl 2M pH 6.8; β -mercaptoetanol y agua. Para su uso se añadió el mismo a la membrana y se dejó por 30 minutos en un baño a 55°C. Tras ello, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con TBS-T, realizando nuevamente un bloqueo con leche al 5% durante 1 hora.

En el caso que la membrana se quiera guardar, se seca apropiadamente con papel de filtro y se almacena. Si fuese necesario su uso se debe hidratar adecuadamente como realizábamos con la membrana de PVDF (metanol 30 segundos, agua 5 minutos y tampón de transferencia).

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo primario	Peso molecular (kDa)	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo secundario correspondiente
GAPDH	37	Sigma Aldrich	1:1000	Conejo
MMP13	60	Cell Signaling	1:1000	Conejo
NOS2	130	Cell Signaling	1:1000	Conejo
COX2	74	Cell Signaling	1:1000	Conejo
ELF3	42	GeneTex	1:1000	Conejo
IL-6	25	Cell Signaling	1:1000	Conejo
Fosfo-P65	65	Cell Signaling	1:1000	Conejo
P65total	65	Cell Signaling	1:1000	Conejo

3.9 ANÁLISIS METABÓLICO DE LAS CÉLULAS DE DISCO INTERVERTEBRAL

El análisis metabólico fue llevado a cabo por OWL Metabolomics (Bizkaia, España). Las muestras seleccionadas se fraccionaron en grupos con cualidades fisicoquímicas comparables, utilizando las combinaciones correctas de solventes orgánicos, como se describió anteriormente [221], para la extracción de los metabolitos. Se utilizaron cuatro plataformas basadas en cromatografía líquida de alta resolución asociada a espectrometría de masas (UHPLC-MS) para realizar perfiles de: ácidos grasos, ácidos biliares, esteroides y lisoglicerofosfolípidos (plataforma 1); glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esteroides lípidos y esfingolípidos (plataforma 2); aminoácidos (plataforma 3); perfilado de metabolitos polares, incluido el metabolismo central del carbono (plataforma 4). La calidad general del procedimiento de análisis se supervisó utilizando extractos repetidos de las muestras de control de calidad, a saber, muestras de calibración, validación, blanco y blanco de idoneidad del sistema [222].

El procesamiento de datos se realizó con TargetLynx para MassLynx 4.1 (Waters Corp.) [223]. La corrección de respuesta dentro del lote y entre lotes fue realizada siguiendo el procedimiento descrito por Martínez-Arranz *et al.* [224].

3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en esta tesis están expresados como las medias \pm el error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos diferentes. La selección de las muestras se llevó a cabo de manera aleatoria, con una estratificación específica en grupos de interés, tales como NP sano, AF sano y AF degenerado. Se utilizó el paquete de software estadístico R v.3.1.1 (R Development Core Team, 2011, AUT) para el análisis de datos metabolómicos, mientras que GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA) fue utilizado para el resto de análisis.

Las comparaciones entre grupos experimentales se llevaron a cabo utilizando la prueba de la t de Student para muestras independientes (distribución normal, bidireccional). Este test fue utilizado cuando teníamos que comparar dos grupos entre sí. Por otro lado, se utilizó también el análisis de varianza unidireccional (ANOVA), cuando se debía comparar tres o más grupos independientes. En ambos casos se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

3.11 REACTIVOS Y APARATOS

- ◆ ARNi – Integrated DNA Technologies, Iowa, EEUU.
- ◆ Acrilamida - Bio-Rad laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, California, EEUU.
- ◆ Anticuerpo anti-rabbit - GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido.
- ◆ Anticuerpo anti-GAPDH - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Aparato de transferencia semiseca TRANSBLOT®– Bio-Rad laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, California, EEUU.
- ◆ β -Mercaptoetanol - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- ◆ ChemiDoc MP ImagingSystem (Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- ◆ Colagenasa P - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Dexametasona - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Glicina - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Graphpad prism: programa de análisis estadístico – GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU.
- ◆ IL-1 β (humana) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ IL-1 α (humana) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Image Lab – Programa de densitometría para Western Blot, Bio-Rad laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, California, EEUU.
- ◆ LPS - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Revelador Immobilion western detection Kit – Millipore, MA, EEUU.
- ◆ Kit de extracción de ARN y proteína – Kit E.Z.N.A ARN total (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA)
- ◆ Kit de extracción de ADN plasmídico (midiprep) - Nzytech; Portugal.
- ◆ Kits de RT – Nzytech, Portugal
- ◆ Lector de ELISA Multiscan EX – Thermo Labsystems, East Forge Parkway, Franklin, MA, EEUU.
- ◆ Leptina (humana) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Marcador de peso molecular de proteínas - Precision Plus Protein Dual, Bio-Rad laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, California, EEUU.
- ◆ Medio DMEM α (Dulbecco's modified eagle's medium) - Gibco, EEUU.

- ◆ Medio MEM α (medio mínimo esencial modificado α) - Gibco, EEUU.
- ◆ MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ NZYol, MB18501 (trizol) - Nzytech; Portugal.
- ◆ PBS – Tabletas sin calcio ni magnesio – MP Biomedicals, LLC, Illkirch, France.
- ◆ Penicilina/Estreptomicina - Lonza, Verviers, Belgica.
- ◆ Primers (cebadores) - SABiosciences Corporation (QIAGEN Company), MD, EEUU.
- ◆ Pronasa - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Concentrado del Reactivo de Tinción para Ensayo de Proteínas Bio-Rad, Bio-Rad laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, California, EEUU.
- ◆ PVDF (polyvinylidene difluoride) transfer membrane - Millipore, MA, EEUU.
- ◆ SDS - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Seroalbúmina bovina (BSA) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ siLentFect - Bio-Rad laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, California, EEUU.
- ◆ Sistema de electroforesis de geles de acrilamida - Bio-Rad laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, California, EEUU.
- ◆ Sistema de PCR en tiempo real (Agilent AriaMX thermal cycler, Agilent Technologies, Reference code. G8830A), Stevens Creek Boulevard, Santa Clara, CA, EEUU.
- ◆ Software estadístico R v.3.1.1 (R Development Core Team, 2011, AUT)
- ◆ Suero Fetal Bovino (FBS) - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ TransFectin™ Lipid Reagent, Bio-Rad laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, California, EEUU.
- ◆ Tris Base - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ TriFECTa® RNAi (Integrated DNA Technologies) de Bio-Rad laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, California, EEUU.
- ◆ Tripsina/EDTA 0.5% - Lonza, Verviers, Belgica.
- ◆ Triton X100 - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
- ◆ Tween 20 - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.

Resultados

CAPÍTULO I: Caracterización del disco intervertebral*

*Los resultados de este capítulo ya han sido publicados en: “*Metabolomic signature and molecular profile of normal and degenerated human intervertebral disc cells*” - Vera Francisco^{a,b}; Djedjiga Ait Eldjoudi^b; **María González-Rodríguez^b**; Clara Ruiz-Fernández^b; Alfonso Cordero-Barreal^b; Patrice Marques^c; Maria Jesus Sanz^{c,d}; José T. Real^{a,d,e}; Francisca Lago^f; Jesús Pino^{b,*}; Yousof Farrag^b; Oreste Gualillo^b.

^a Institute of Health Research INCLIVA and Endocrinology and Nutrition Service, University Clinic Hospital of Valencia, Calle Menéndez y Pelayo 4, 46010 Valencia, Spain

^b SERGAS (Servizo Galego de Saude) and IDIS (Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago), NEIRID Lab (Neuroendocrine Interactions in Rheumatology and Inflammatory Diseases), Research Laboratory 9, Santiago University Clinical Hospital, Tr. da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain

^c University Clinic Hospital of Valencia and Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Odontology, Institute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, Calle Menéndez y Pelayo, nº 4, 46010 Valencia, Spain

^d CIBERDEM - Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders, ISCIII, Av. Monforte de Lemos, 3-5, 28029 Madrid, Spain

^e Department of Medicine, Faculty of Medicine and Odontology, University of Valencia, Av. de Blasco Ibáñez, nº 15, 46010 Valencia, Spain

^f SERGAS (Servizo Galego de Saude) and IDIS (Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago), Molecular and Cellular Cardiology Lab, Research Laboratory 7, Santiago University Clinical Hospital, Tr. da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain

Francisco, V., Ait Eldjoudi, D., González-Rodríguez, M., Ruiz-Fernández, C., Cordero-Barreal, A., Marques, P., Sanz, M. J., Real, J. T., Lago, F., Pino, J., Farrag, Y., & Gualillo, O. (2023). *Metabolomic signature and molecular profile of normal and degenerated human intervertebral disc cells*. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*, 23(10), 1549–1562. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2023.06.005>
The Spine Journal: ISSN impreso: 1529-9430 / ISSN online: 1878-1632 © 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

4.1 CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DEL DISCO INTERVERTEBRAL

4.1.1 Perfil metabolómico hallado en el disco intervertebral

Con el fin de elaborar un perfil metabolómico de disco sano y degenerado y poner en conocimiento las diferencias entre ellos, se llevó a cabo un estudio utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución asociada a espectrometría de masas (UHPLC-MS).

La UHPLC-MS se realizó en células de pacientes sanos y con degeneración de disco intervertebral (grupos experimentales). El análisis metabólico de las muestras se llevó a cabo considerando 4 clases de metabolitos:

- 1) Ácidos grasos, ácidos biliares, esteroides, lisoglicerofosfolípidos.
- 2) Glicerolípidos, glicerofosfolípidos, lípidos esteroides y esfingolípidos.
- 3) Aminoácidos
- 4) Perfil de metabolitos polares, incluyendo los del metabolismo central del carbono.

De cada perfil metabolómico obtuvimos una medida con tendencia lineal, los resultados que estaban fuera del 30% de esta medida lineal fueron descartados. La normalización de los datos se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Martínez-Arranz *et al.* [224].

4.1.1.1 Análisis multivariante

Se llevó a cabo un análisis multivariante con el fin de visualizar, de forma sencilla, las agrupaciones de metabolitos en los diferentes grupos experimentales. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) en el que se observó cierta asociación de las muestras según el grupo experimental y el género (en el caso de las muestras degeneradas) (Figura 29). Con el fin de corroborar estos hallazgos, se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA). En este modelo, se consiguió una clara agrupación de muestras según el grupo experimental (Figura 30).

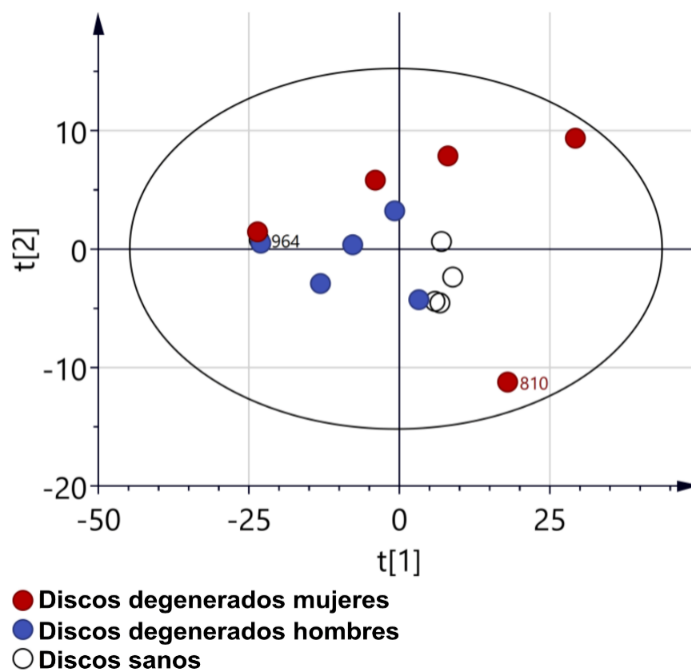


Figura 29. Gráfico de dispersión de puntos del modelo PCA de muestras de células en los diferentes grupos experimentales.

Se representan en color rojo las pacientes mujeres con DDI (n=5), en azul los pacientes hombres con DDI (n=5) y en blanco los sujetos sanos(n=5).

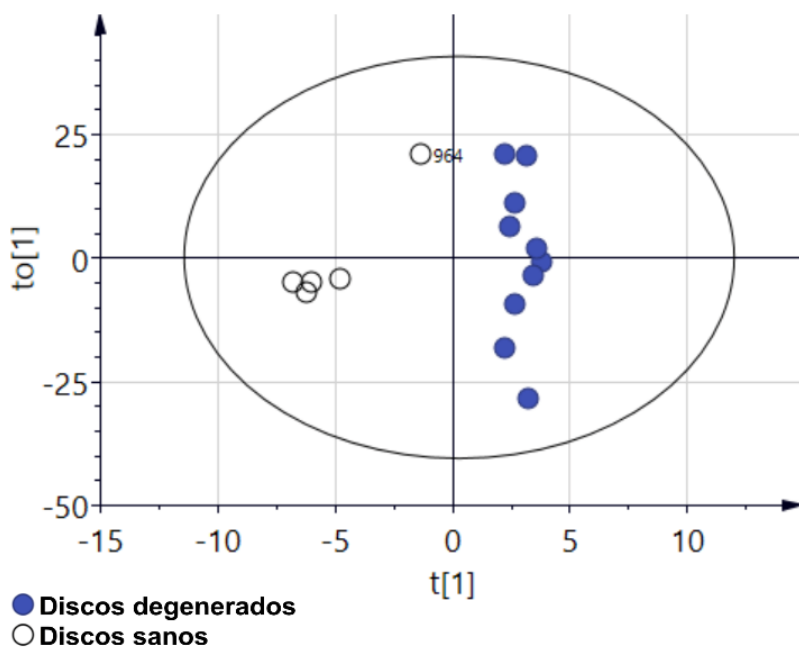


Figura 30. Gráfico de dispersión de puntos del modelo OPLS-DA de muestras celulares de disco intervertebral sano (blanco) y degenerado (azul).

Se representan en color azul los pacientes con DDI (n=10) y en blanco los sujetos sanos (n=5).

Como muestra la Figura 31, los metabolitos que se encuentran lejos del origen del gráfico tienen un impacto más fuerte en el modelo. Además, las variables correlacionadas positivamente están agrupadas juntas, mientras que las variables correlacionadas negativamente están posicionadas en los lados opuestos del origen del gráfico. En ambos casos, los metabolitos responsables de las diferencias entre los grupos de muestras fueron principalmente los ácidos biliares (BA) y ceramidas (Cer), los cuales parecían estar aumentados en las células obtenidas de discos degenerados. En la Figura 31 están representados los diferentes metabolitos estudiados en este análisis. La distribución de los metabolitos del resto de las clases depende del metabolito, aunque la mayoría de ellos parecían estar disminuidos en las células obtenidas de discos degenerados.

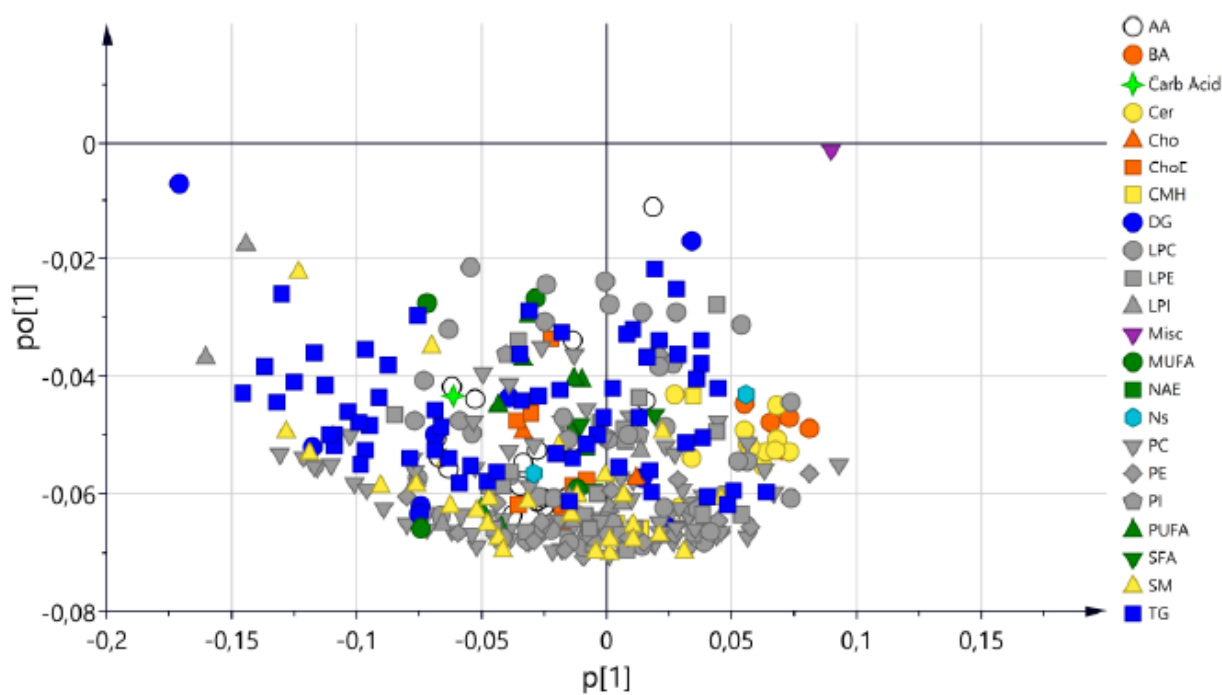


Figura 31. Diagrama de dispersión de cargas del modelo OPLS-DA de muestras de disco intervertebral.

Diagnóstico del modelo ($A=4$; $R2X=0,771$; $R2Y=0,900$; $Q2X=0,230$). AA: aminoácidos; BA: ácidos biliares; Carb Acid: ácidos carboxílicos; Cer: Ceramidas; Cho: colesterol; ChoE: ésteres de colesterol; CMH: Monohexosilceramidas; DG: Diglicéridos; LPC: Lisofosfatidilcolinas; LPE: Lisofosfatidiletanolaminas; LPI: Lisofosfatidilinositoles; Misc: miscelánea; MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados; NAE: N-acil etanolaminas; Ns: nucleósidos; PC: fosfatidilcolinas; PE: Fosfatidiletanolaminas; PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados; SFA: Ácidos grasos saturados; SM: Esfingomielinas; TG: triglicéridos.

4.1.1.2 Análisis univariante

Sobre estas muestras, se llevó a cabo un análisis de datos univariante, calculando el porcentaje de cambios con un test t de Student p-value.

Una vez que determinamos diferencias entre los distintos grupos experimentales, quisimos estudiar más en detalle la composición de ese metaboloma. En total se identificaron 357 metabolitos, de los cuales ocho de los metabolitos disminuían significativamente en los discos intervertebrales degenerados con respecto a los sanos (Figura 33) (Tabla 3). Nuestros datos también presentan una tendencia a la disminución de ácidos grasos (FA), triglicéridos (TG), ésteres de colesterilo (Cho), glicerofosfolípidos [especialmente diacilglicerofosfocolinas (DAPC) y liposofatidilinositoles (LPI)] y esfingomielinas (SM) en el disco degenerado en comparación con el disco sano (Tabla 3). Por el contrario, los discos degenerados tienen niveles ligeramente aumentados, aunque no significativos de triglicéridos (TG) con cadenas de acilo más cortas, ácidos biliares (BA), y ceramidas (Cer), monohexosilceramidas (CMH) y carbohidratos (CHO) en comparación con discos sanos (Figura 32).

Cabe destacar que cuando comparamos por sexo, el perfil metabólico difiere significativamente. Por un lado, observamos que los hombres tienen una gran cantidad de metabolitos reprimidos en comparación con el tejido sano. Sin embargo, las mujeres poseen una tendencia general al alza en casi todos los metabolitos mostrados, lo cual nos sugiere que el sexo puede ser un factor que influye en el metaboloma global durante la degeneración de disco intervertebral (Figura 32).

No todas estas comparaciones arrojaban resultados estadísticamente significativos, por lo cual, se decidió hacer un análisis más detallado con aquellos que en al menos uno de los grupos tuvieran significatividad (Tabla 3).

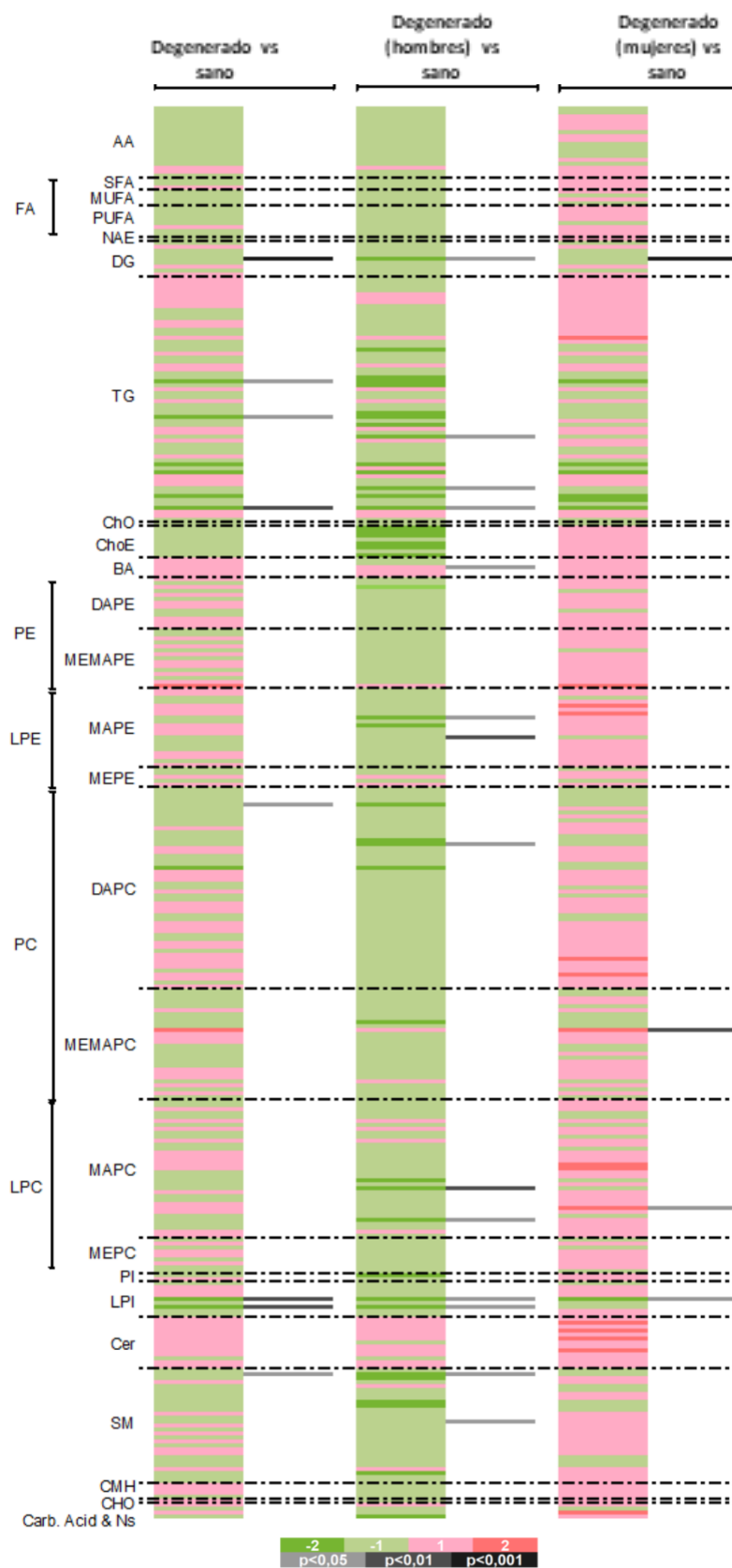
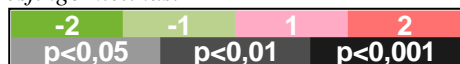


Figura 32 . Representación en mapa de calor (heatmap) de los metabolitos obtenidos por HPLC-MS para las diferentes muestras de disco sanas y degeneradas

Se indican debajo de la figura los códigos de color para el \log_2 (fold-change) y p-valores del test t de student con comparaciones no pareadas. En la gráfica observamos en color verde los metabolitos que están disminuidos en disco degenerado en comparación con los discos sanos. Mientras que el color rojo nos indica un aumento de los metabolitos. A mayor intensidad del color representado, mayor aumento o disminución, respectivamente. Se utilizó un tamaño muestral de 5 pacientes mujeres con DDI, 5 pacientes hombres con DDI y 5 sujetos sanos. AA: Aminoácidos; SFA: Ácidos grasos saturados; FA: Ácidos grasos; MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados; NAE: N-acil etanolaminas; DG: Diglicéridos; TG: Triglicéridos; Cho: colesterol; ChoE: ésteres de colesterol; BA: ácidos biliares; PE: Fosfatidiletanolaminas; DAPE: Diacilglicerolfosfoetanolaminas; MEMAPE: 1-éter, 2-acilglicerolfosfoetanolaminas; LPE: Lisofofosfatidiletanolaminas; MAPE: 1 o 2 monoacilglicerolfosfoetanolaminas; MEPE: 1-monoeterglicerolfosfoetanolaminas; PC: Fosfatidilcolinas; DAPC: Diacilglicerolfosfocolinas; MEMAPC: 1-éter, 2-acilglicerolfosfocolinas; LPC: Lisofofosfatidilcolinas; MAPC: 1 o 2 monoacilglicerolfosfocolinas; MEPC: 1-monoeterglicerolfosfocolinas; PI: Fosfatidilinositoles; LPI: Lisofofosfatidilinositoles; Cer: Ceramidas; SM: Esfingomielinas; CMH: Monohexosilceramidas; CHO: Carbohidratos; Carb acids: ácidos carboxílicos; Ns: Nucleósidos.

Tabla 3. Metabolitos encontrados significativamente alterados en disco degenerado vs sano.

Comparación de los metabolitos significativamente relevantes de disco degenerado frente a disco sano. \log_2 fold-change y p-valores de t de student no pareada se indican con la leyenda de colores. LPE: lisofofosfatidiletanolaminas; PC: fosfatidilcolinas; LPC: lisofofosfatidilcolinas; LPI: lisofofosfatidilinositoles; SM: esfingomielinas.



Clase	Metabolito	Disco degenerado vs disco sano (ambos sexos)	
		$\log_2(fc)$	p valor
Diacilgliceroles	DG (34:2)	-0,99	4,51E-04
Triacilgliceroles	TG (52:4)	-1,30	1,79E-02
	TG (54:5)	-1,06	3,88E-02
	TG (55:3)	-0,57	2,79E-01
	TG (58:4)	-0,89	8,06E-02
	TG (58:10)	-1,50	9,99E-03
Ácidos biliares	Ácido glicodeoxicólico	0,64	9,55E-02
LPE	PE (22:4/0:0)	-0,41	5,29E-01
	PE (0:0/16:1)	-0,62	1,35E-01
PC	PC (14:0/18:2)	-0,99	4,34E-02
	PC (34:3)	-0,89	7,36E-02
	PC(O-20:0/20:4)	1,03	1,57E-01
LPC	PC (0:0/17:1)	-0,68	1,86E-01
	PC (0:0/20:4)	0,69	1,95E-01
	PC (0:0/22:5)	-0,37	2,39E-01
LPI	LPI (18:1)	-1,55	2,23E-03
	LPI (18:2)	-1,12	9,72E-03
SM	SM (31:1)	-0,68	4,74E-02
	SM(d18:1/12:0)	-0,35	3,25E-01

Los metabolitos con mayores diferencias entre grupos, fueron representadas con un gráfico de cajas y bigotes para mayor claridad de los resultados (Figura 33).

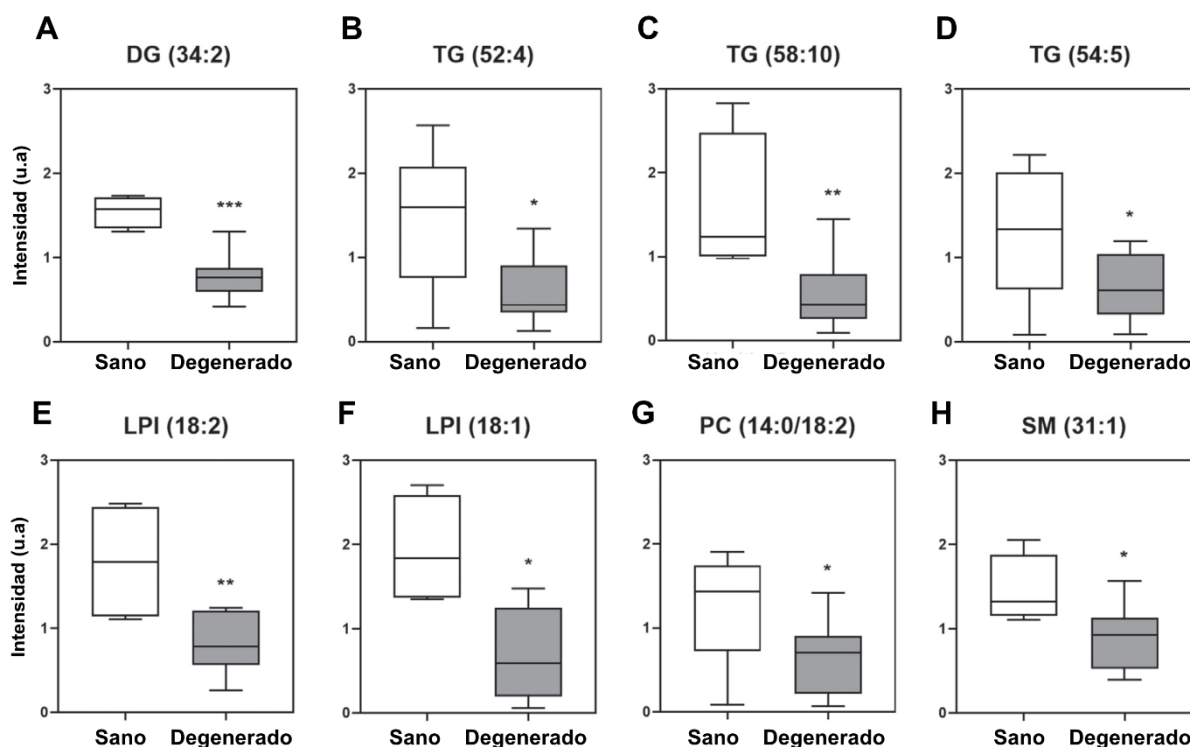


Figura 33. Niveles de los metabolitos indicados en disco intervertebral degenerado (n=10, 5 hombres, 5 mujeres) y en el disco intervertebral sano (n=5).

Unidades relativas de intensidad de los metabolitos indicados. A: diacilglicerol 34:2 [DG (34:2)]; B: Triacilglicerol 52:4 [TG (52:4)]; C: Triacilglicerol 58:10 [TG (58:10)], D: Triacilglicerol 54:5 [TG (54:5)], E: fosfatidilinositol 18:2 [LPI (18:2)]; F: fosfatidilinositol 18:1 [LPI (18:1)]; G: fosfatidilcolina (PC [14:0/18:1]); H: Esfingomielina (SM [31:1]). Observamos los distintos metabolitos disminuidos en disco intervertebral degenerado con respecto al sano. Los valores se representan como media de intensidad relativa \pm IQR (rango intercuartil). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con disco sano.

4.1.2 Perfil comparativo de expresión génica del disco intervertebral en estado basal

Se comparó la expresión génica de células de disco sano (clasificadas en NP y AF) y disco degenerado. Se llevó a cabo el estudio de expresión de ARN mensajero (ARNm) de los siguientes genes: NOS2, COX2, IL-6, IL-8, IL-1 β y TNF α (asociados a inflamación); LCN2, PGRN, NAMPT, NUCB2, SERPINE2 y RARRES2 (adipoquinas); MMP9 y MMP13; grelina y LEAP2 y VCAM-1.

Como se puede observar en la Figura 34 A-F, H-L, M, Ñ, O, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos sano NP, sano AF y degenerado, correspondientes a los genes de NOS2, COX2, IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF α , PGRN, NAMPT, NUCB2, SERPINE2, RARRES2,

GHRL, MMP13, y MMP9. Por el contrario, determinamos una disminución considerable en la expresión de LCN2 (Figura 34 G) y LEAP2 (Figura 34N) en células de disco degenerado en comparación con sano AF, mientras que VCAM-1 (Figura 34P) mostraba un aumento significativo en el disco degenerado con respecto al sano AF. Los dos tipos celulares sanos (AF y NP) no mostraron ningún tipo de diferencias significativas entre ellos.

Para facilitar la visualización de estos resultados se generó un mapa de calor (Figura 35), donde aparte de las diferencias antes descritas, también podemos observar que los genes con mayor expresión son PGRN y SERPINE2, mientras que los genes menos expresados en estos tipos celulares fueron IL-1 β y TNF α .

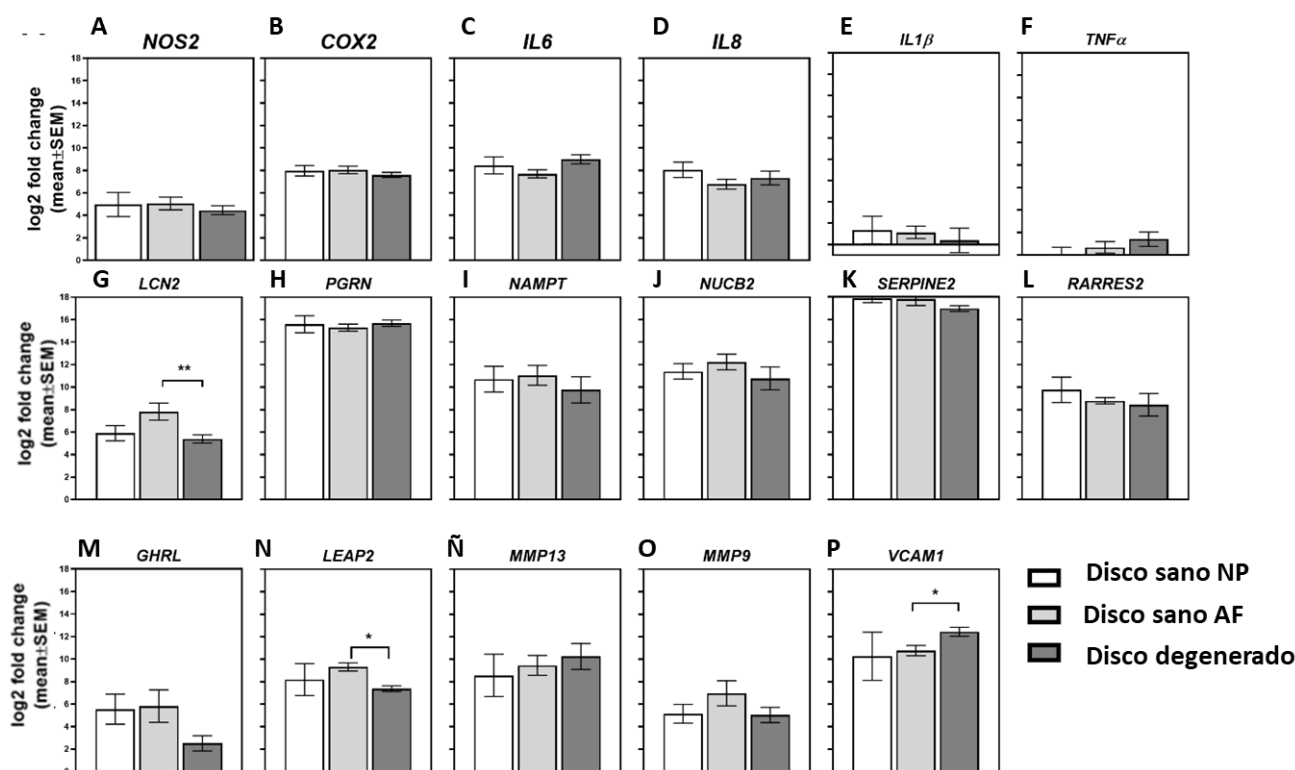


Figura 34. Comparación del perfil de expresión de ARN mensajero en disco sano (NP sano y AF sano) y disco degenerado.

Expresión de ARN mensajero en los grupos indicados de los genes NOS2 (A), COX2 (B), IL-6(C), IL-8 (D), IL-1 β (E), TNF α (F), LCN2(G), PGRN(H), NAMPT(I), NUCB2 (J), SERPINE2 (K), RARRES2(L), GHRL(M), LEAP2 (N), MMP13 (Ñ), MMP9(O) y VCAM-1(P). Los datos se representaron en log2 fold change media \pm SEM de 9 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con disco sano AF.

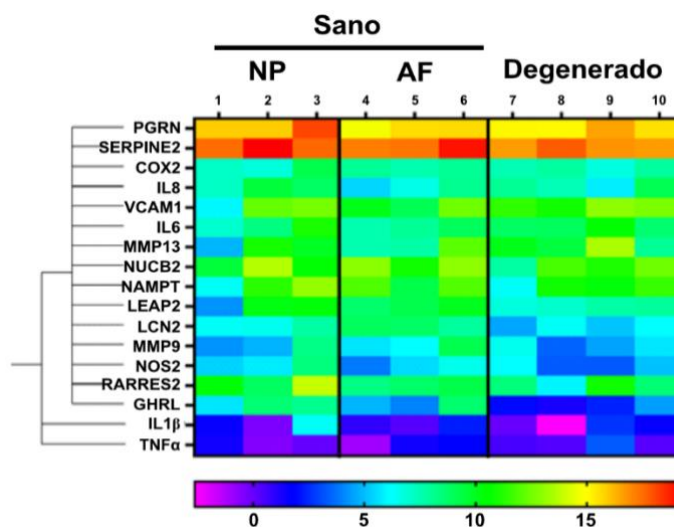


Figura 35. Representación en mapa de calor de la comparación del perfil de expresión de ARN mensajero en disco sano (NP sano y AF sano) y disco degenerado.

Mapa de calor representando log₂ fold change de la expresión de ARN mensajero de las diferentes muestras. Del violeta al rojo se incrementan los valores de log₂ (fold-change).

4.1.3 Perfil comparativo de expresión génica del disco intervertebral con estímulos inflamatorios

Una vez analizadas las diferencias de expresión génica en estado basal, quisimos investigar los efectos de estímulos proinflamatorios como la IL-1β y la leptina en el disco intervertebral. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la IL-1β y la leptina son capaces de actuar de manera conjunta en la inducción de la respuesta inflamatoria en condrocitos [225]. Para comprobar que estos dos factores también producen sinergia en las células de disco intervertebral, tratamos células de disco intervertebral sano (AF y NP) y degenerado, con IL-1β o leptina y su combinación.

Sin embargo, como se observa en la Figura 36 y Figura 37, nuestros resultados indicaron que no había sinergia en la expresión de ARNm en ninguno de los genes estudiados cuando se estimularon las células de disco con la combinación de IL-1β y la leptina. Lo que sugiere que los efectos proinflamatorios descritos para la leptina en el cartílago articular no tienen tanta relevancia en el tejido intervertebral. Por ello, nos centramos en los efectos de la IL-1β, cuya participación en la degeneración de disco está ampliamente desarrollada.

Los niveles de expresión de ARNm de los marcadores inflamatorios NOS2, COX2, IL-6 e IL-8, aumentaron de manera estadísticamente significativa cuando estimulamos las células con IL-1β en todas las condiciones (AF sano, NP sano y AF degenerado). Otras citoquinas como el TNFα, solo arrojaron resultados estadísticamente significativos en células de NP sanas y AF

degeneradas; para VCAM-1 fueron significativos en AF sanas y degeneradas; y en el caso de la expresión de IL-1 β , los cambios solo eran significativos en el caso de células AF degeneradas (Figura 36 y Figura 37).

Además, observamos que la expresión de ciertas adipocinas se regulaba por la estimulación con IL-1 β . Como se puede ver en la Figura 37 G-L, la expresión de LCN2 aumentaba de manera significativa en todos los grupos tratados con esa citoquina proinflamatoria. La expresión de SERPINE2 se indujo de manera significativa en células de NP sanas y AF degeneradas, mientras que RARRES2 sólo en AF sanas. Finalmente, sólo encontramos un incremento significativo de NAMPT en células degeneradas. En el caso de PGRN, NUCB2 GHRL/LEAP no hay aumentos tras el tratamiento con IL-1 β (Figura 36 y Figura 37).

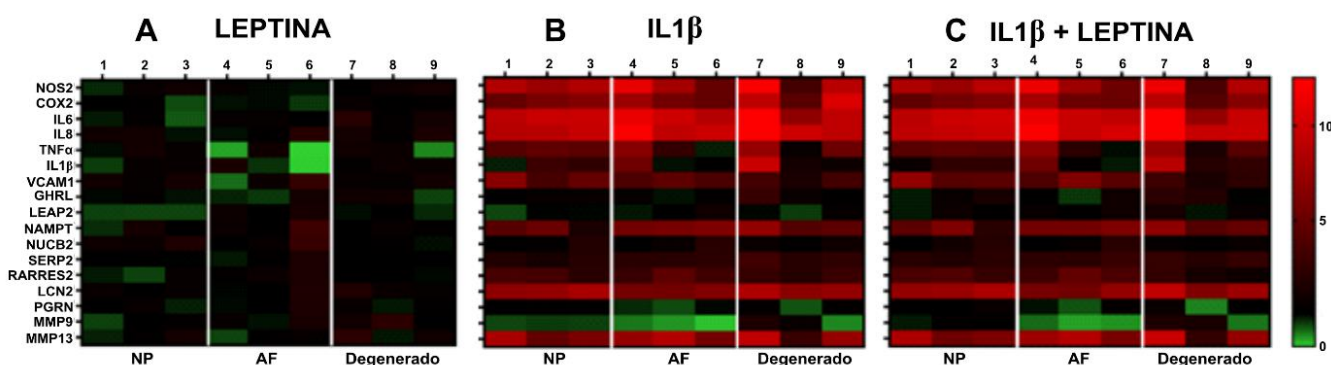


Figura 36. Mapa de calor de los diferentes perfiles de expresión génica de núcleo pulposo, anillo fibroso en células de disco sano y células de disco degenerado estimuladas con IL-1 β y leptina.

Representación en log₂ fold change de los niveles de ARN mensajero de las muestras indicadas tratadas con 800nM de leptina y 0.05 ng/mL IL-1 β , solas o en combinación durante 48 horas. Los colores del mapa van de verde a rojo con valores crecientes de log₂ fold-change.

En cuanto a los genes relacionados con la degeneración de matriz, destacamos una inducción significativa de la MMP13 en respuesta a la estimulación de IL-1 β (Figura 37N), mientras que los niveles de MMP9 no mostraron diferencias significativas (Figura 37M).

Posteriormente, evaluamos la expresión proteica de NOS2, COX2, IL-6 (Figura 38), y del mismo modo que ocurría con la expresión de ARNm, la IL-1 β es capaz de aumentar de manera significativa la expresión de proteína de dichos factores proinflamatorios. También confirmamos la falta de sinergismo entre la IL-1 β y la leptina.

En conjunto, nuestros hallazgos indican que las células del disco intervertebral, tanto en condición sana como degenerada, responden de manera similar a la estimulación con IL-1 β y leptina.

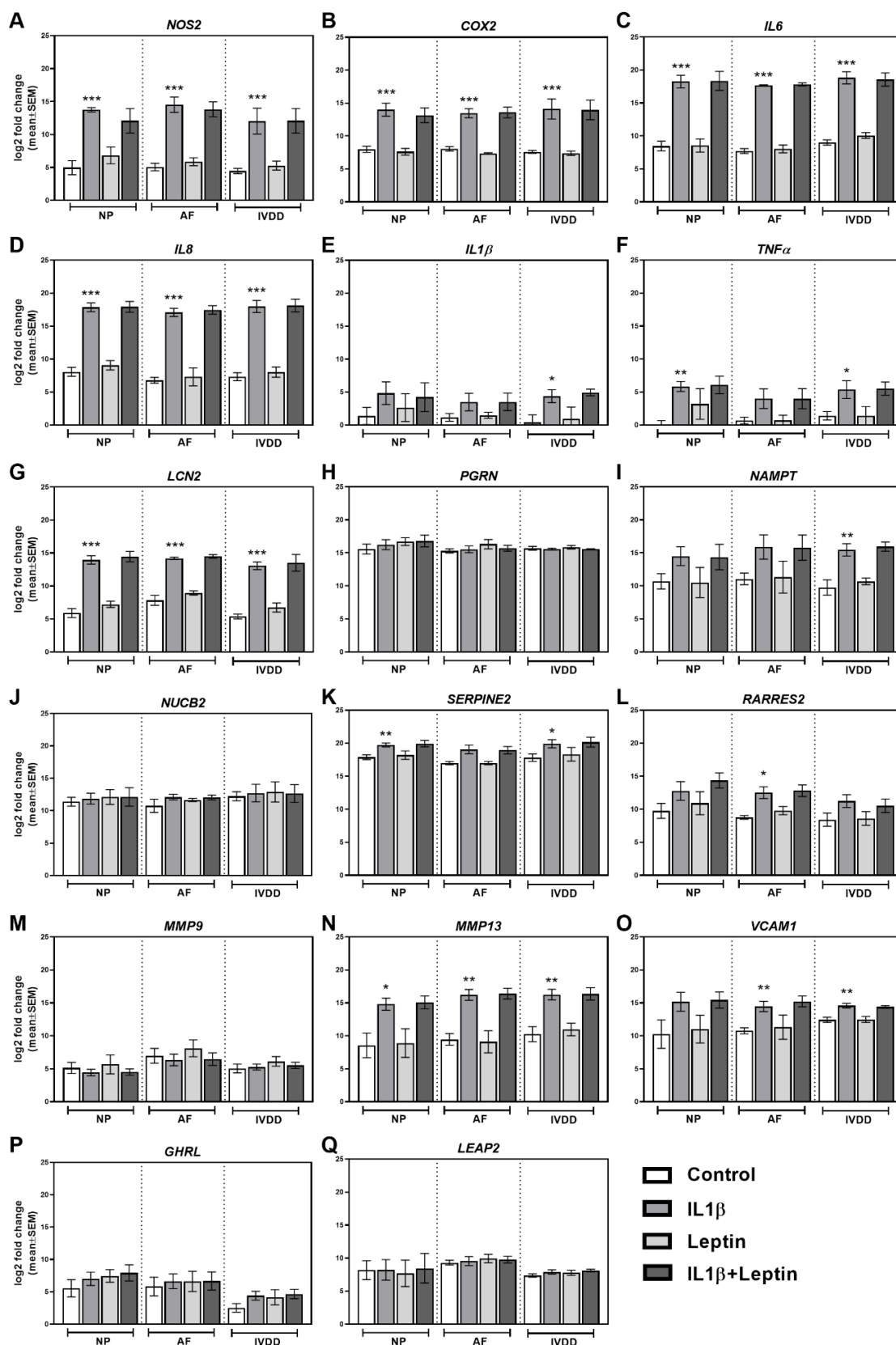


Figura 37. Niveles de expresión de ARNm en el núcleo pulposo y anillo fibroso de células de disco sano y células de disco degenerado en respuesta a tratamientos con IL-1β y leptina.

Determinación mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de los genes indicados en células de NP sano y AF sano y degenerado tratadas con leptina 800nM y IL-1 β 0.05 ng/ml solas o en combinación 48 horas. Los datos se representaron en log2 fold change media \pm SEM de 9 experimentos independientes. * p <0,05, ** p 0,01, *** p 0,001 en comparación con el control.

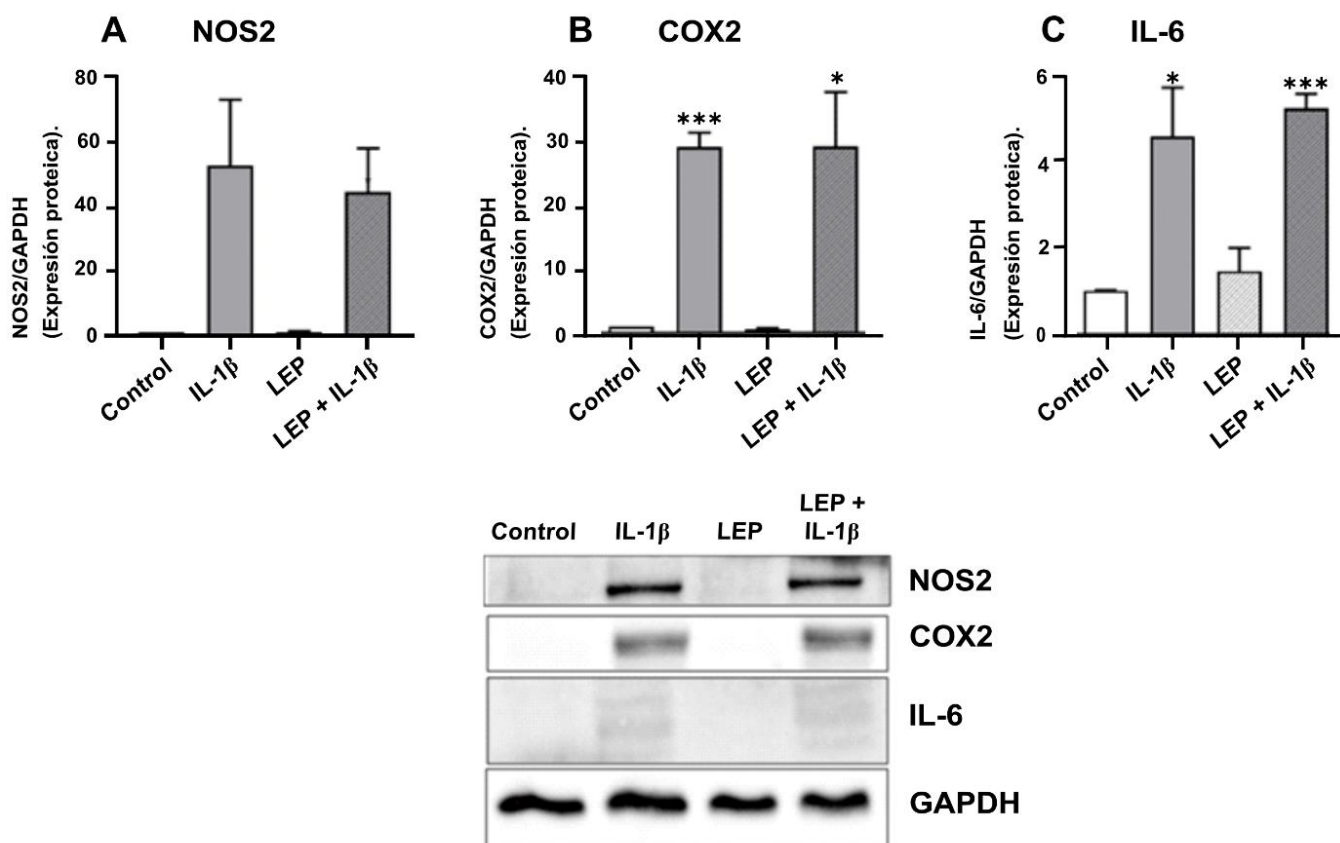


Figura 38. Niveles de expresión de proteína en anillo fibroso de células de disco degenerado estimuladas con IL-1 β y leptina.

A-C. Cuantificación de la densitometría de la expresión de proteína de NOS2, COX2, e IL-6 en células de AF degeneradas tratadas con 800nM de leptina y 0.05 ng/ml IL-1 β sola o en combinación por 48 h. GAPDH fue el control de carga. D. Imagen representativa de Western Blot incubado con anticuerpos anti-NOS2, COX2, IL-6 y GAPDH. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. * p <0,05, ** p 0,01, *** p 0,001 en comparación con el control.

CAPÍTULO II:

Estudio del factor ELF3 en disco intervertebral

4.2 CAPÍTULO II: ESTUDIO DEL FACTOR ELF3 EN DISCO INTERVERTEBRAL

4.2.1 Niveles de expresión de ELF3 en disco intervertebral

4.2.1.1 La expresión de ELF3 depende del estado patológico del tejido

Como se observa en la Figura 39, el análisis inmunohistoquímico demuestra la expresión de ELF3 tanto en el AF como en el NP procedentes de tejido sano y degenerado. La localización es predominantemente perinuclear, aunque también citoplasmática. Es digno de mención, que la tinción para ELF3 presenta mayor intensidad en el disco intervertebral degenerado.

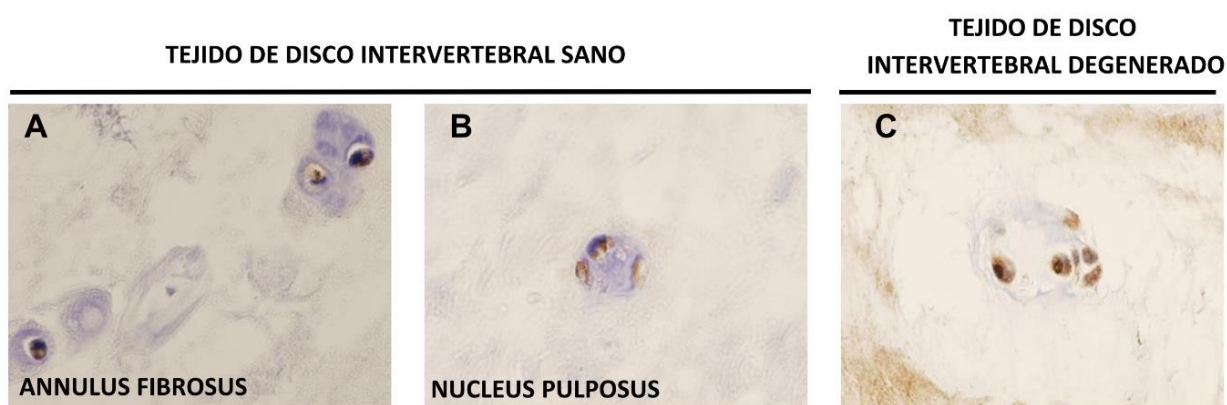


Figura 39. Localización de ELF3 en tejido de disco intervertebral sano y degenerado.

Imágenes representativas de preparaciones para inmunohistoquímica de tejido de disco intervertebral sano (A: Anillo fibroso, B: Núcleo pulposo) y degenerado (C) y tinción para el anticuerpo anti-ELF3. Imágenes tomadas al microscopio óptico 60x.

Este dato, se confirmó mediante el análisis de ARNm y proteína de ELF3. Como muestra la Figura 40, tanto los niveles de ARNm como de proteína de este factor de transcripción se encuentran aumentados de manera significativa en el disco intervertebral degenerado en comparación con el tejido sano.

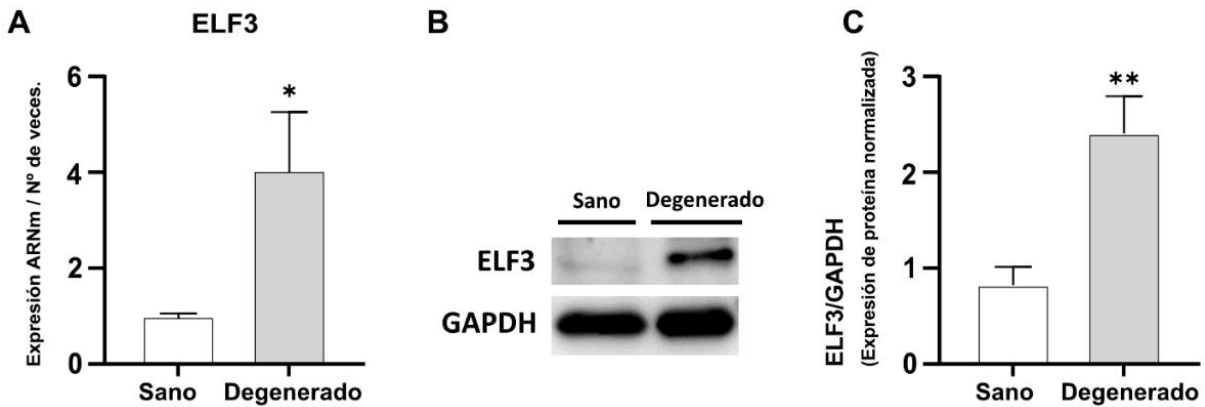


Figura 40. La expresión de ELF3 está aumentada en células de disco intervertebral degenerado. A. Nivel de expresión de ARNm de ELF3 en los tejidos indicados. B, C. Imagen representativa de Western Blot mostrando el nivel de expresión de ELF3 y el control de carga GAPDH en los tejidos indicados y el correspondiente análisis densitométrico. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con disco sano AF.

4.2.2 Regulación de los niveles de ELF3 con estímulos inflamatorios

Con el propósito de determinar si la expresión del ARNm de ELF3 era susceptible de modulación en respuesta a ciertos estímulos proinflamatorios, las células de disco intervertebral sano fueron estimuladas con los siguientes agentes proinflamatorios: LPS, IL-1 α , interferón gamma (IFN γ) y TNF α

Como podemos observar en la Figura 41A, la expresión de ARNm de ELF3 se incrementó de manera estadísticamente significativa después de la estimulación con IL-1 α . Aunque la estimulación con LPS no alcanzó significación estadística, mostró una evidente tendencia al aumento que posteriormente se confirmó mediante análisis de Western Blot (Figura 41B-C).

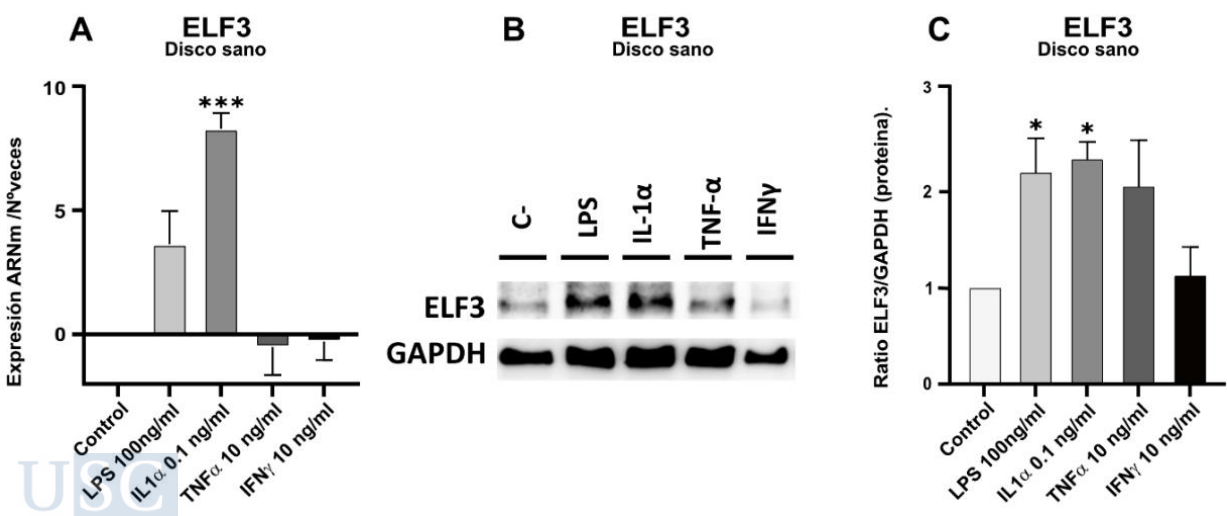


Figura 41. El LPS y la IL-1 α aumentan la expresión de ELF3 en células de disco intervertebral sano.

A. Nivel de expresión de ARNm de *ELF3* en tejido sano con los tratamientos indicados. B, C. Imagen representativa de Western Blot mostrando el nivel de expresión de proteína de *ELF3* y el control de carga *GAPDH* en tejido sano con los tratamientos indicados y el correspondiente análisis densitométrico. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el control.

El análisis de la expresión de ARNm de *ELF3* en disco degenerado arrojó resultados similares a los obtenidos en disco sano (Figura 42A). No obstante, el análisis de Western Blot en disco degenerado no mostró variaciones significativas en la expresión de la proteína de *ELF3*, debido seguramente a la elevada expresión basal del tejido degenerado (Figura 42 B-C).

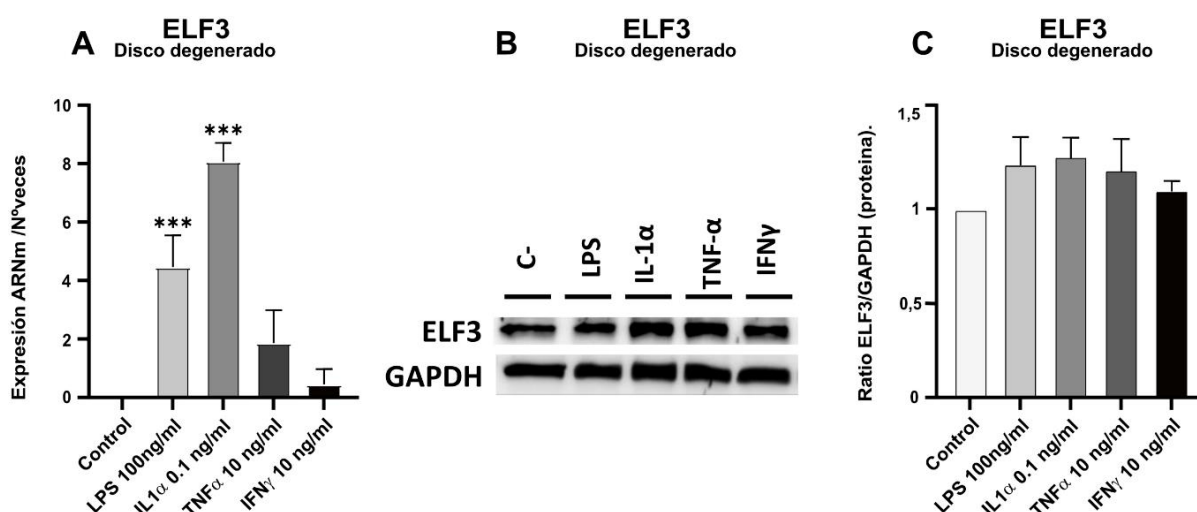


Figura 42. El LPS y la IL-1 α aumentan la expresión del ARNm de *ELF3* en células de disco intervertebral degenerado.

A. Nivel de expresión de ARNm de *ELF3* en tejido degenerado con los tratamientos indicados. B, C. Imagen representativa de Western Blot mostrando el nivel de expresión de proteína de *ELF3* y el control de carga *GAPDH* en tejido degenerado con los tratamientos indicados y el correspondiente análisis densitométrico. Los datos representan la media \pm SEM de 3-9 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el control.

4.2.2.1 Comparación entre el estímulo inflamatorio IL-1 α e IL-1 β en disco degenerado.

Considerando que tanto IL-1 α como IL-1 β actúan uniéndose al mismo receptor de IL-1, se llevaron a cabo experimentos de comprobación de ambos estímulos. Aunque la IL-1 β también fue capaz de inducir la expresión del factor de transcripción de *ELF3* y de otros genes proinflamatorios y procatabólicos como prostaglandina-endoperóxido sintasa 2 (*PTGS2*) y *MMP13*, la respuesta de las células de disco degenerado a la IL-1 α fue sensiblemente mayor y significativa a de la IL-1 β en lo que se refiere a la expresión de ARNm de *ELF3*, *MMP13* y *PTGS2* (Figura 43).

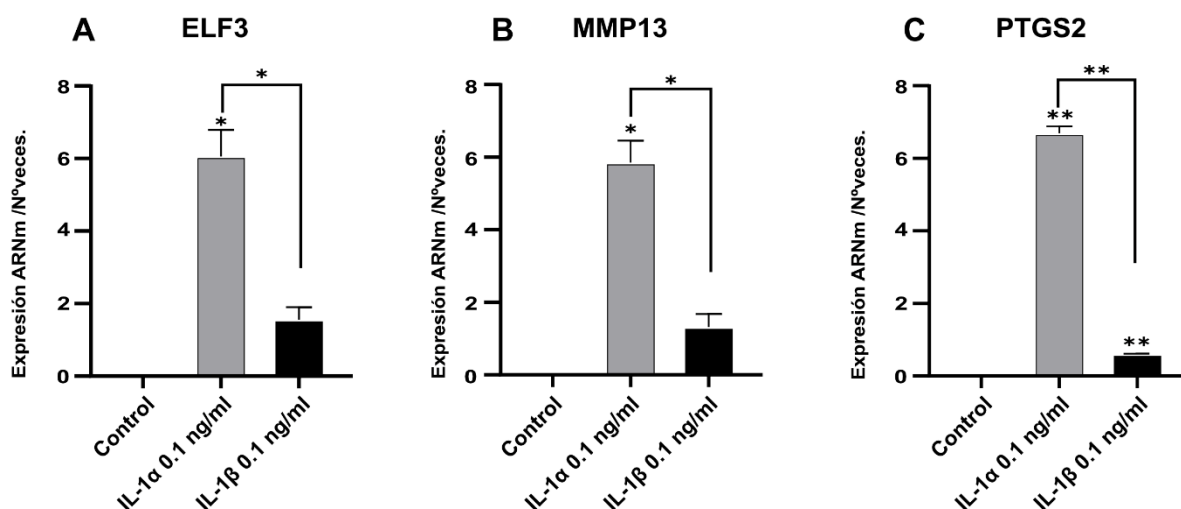


Figura 43. Comparación de la expresión de diversos genes en disco degenerado tras la estimulación con *IL-1α* e *IL-1β*.

A. Nivel de expresión de ARNm de *ELF3* en tejido degenerado después de la estimulación con los tratamientos indicados; B. Nivel de expresión de ARNm de *MMP13* en tejido degenerado después de la estimulación con los tratamientos indicados; C. Nivel de expresión de ARNm de *PTGS2* en tejido degenerado después de la estimulación con los tratamientos indicados. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, en comparación con el control e *IL-1α* en comparación con *IL-1β*.

4.2.2.2 La *IL-1α* regula la expresión de *ELF3* y de otros mediadores en disco degenerado.

Con el fin de definir si el impacto de la respuesta inflamatoria que la *IL-1α* puede generar en las células de disco degenerado era similar al observado para la *IL-1β*, se exploraron diferentes genes relacionados con la inflamación y degradación de matriz, como *ELF3*, *IL-6*, *LCN2*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP13*, *NOS2* y *PTGS2*. Como podemos ver en la Figura 44, todos estos genes se expresaban de manera significativa al estimular las células con *IL-1α*.

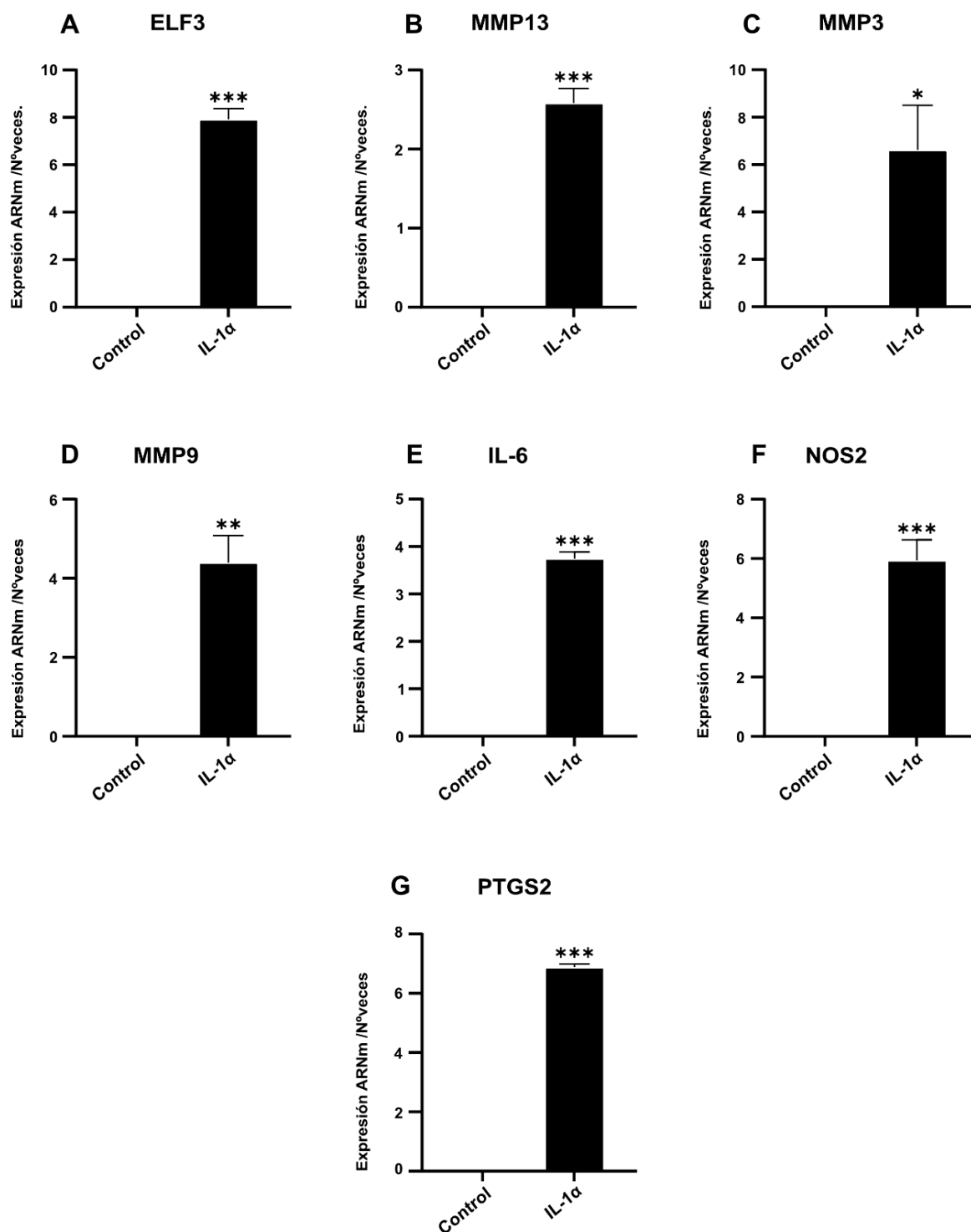


Figura 44. Comprobación de la expresión de genes inflamatorios y catabólicos inducidos por IL-1α en disco intervertebral degenerado.

Nivel de expresión de ARNm en tejido degenerado después del tratamiento con IL-1α 0.1ng/ml de: A: ELF3, B: MMP13, C: MMP3; D: MMP9; E: IL-6; F: NOS2; G: PTGS2. Los datos representan la media ± SEM de 10 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el control.

4.2.2.3 La estimulación con IL-1 α durante 24 horas es idónea para la inducción de ELF3 y otros mediadores proinflamatorios y procatabólicos.

Estudiamos la modulación de la respuesta de células de disco intervertebral degenerado con IL-1 α a diferentes tiempos (3, 6, 12, 24 y 48 horas) para determinar las condiciones óptimas de tratamiento en los sucesivos experimentos. Como podemos ver en la Figura 45, después de 3 horas de tratamiento con IL-1 α la expresión de ARNm de ELF3 alcanza niveles máximos, mientras que otros marcadores de inflamación como son la IL-6 y PTGS2 o marcadores de degradación de matriz como MMP13, muestran una respuesta máxima a 24 horas. Debido a esta razón, todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo fueron a 24 horas.

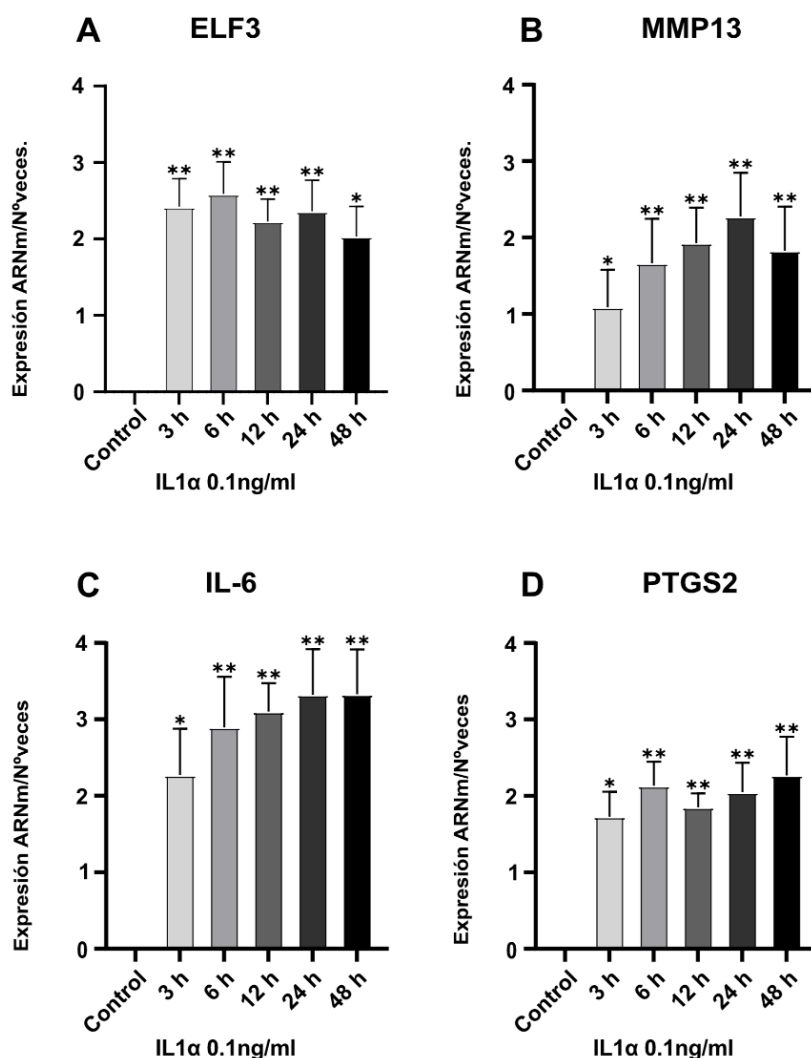


Figura 45. Expresión de diversos genes proinflamatorios en experimentos tiempo respuesta a IL-1 α . Nivel de expresión de ARNm en tejido degenerado después del tratamiento indicado a 3, 6, 12, 24, 48 horas: A: ELF3, B: MMP13, C: IL-6 D: PTGS2. Los datos representan la media \pm SEM de 5 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el control.

4.2.3 Modulación farmacológica con glucocorticoides.

4.2.3.1 Efecto de la dexametasona sobre la expresión de ELF3

Para conocer si podíamos contrarrestar la inducción de ELF3 observada en un ambiente inflamatorio, se realizaron experimentos con un fármaco antiinflamatorio ampliamente utilizado en el tratamiento de la degeneración de columna como es la dexametasona (DX). Además, experimentos previos de nuestro grupo demostraron la habilidad de la DX para interferir en la expresión de ELF3 en cartílago articular. Por lo tanto, estimulamos las células de disco con IL-1 α y DX, solas y en combinación. La expresión de ELF3 inducida por la IL-1 α mostró una disminución significativa cuando se estimuló en presencia de dexametasona, tanto a nivel del ARNm en células de disco sano y degenerado (Figura 46 A-B) como a nivel de expresión proteica (Figura 47) en células de disco degenerado.

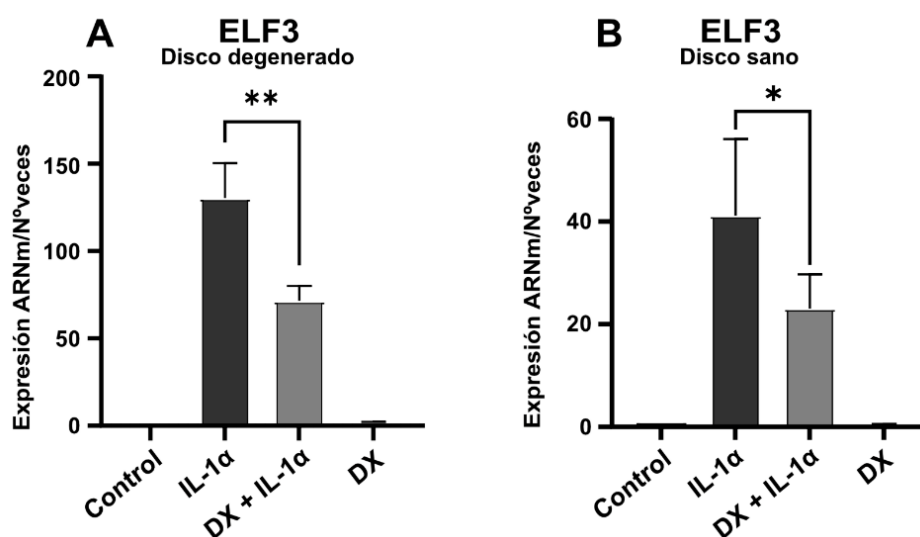


Figura 46. La dexametasona disminuye la expresión de ARNm de ELF3 en células de disco intervertebral degenerado (A) y sano (B) en respuesta a estímulos proinflamatorios.

*Nivel de expresión de ARNm de ELF3 en tejido degenerado (A) y sano (B) después del tratamiento con IL-1 α 0.1n/ml, dexametasona (DX) 1 μ M, y su combinación. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * p <0,05, ** p 0,01, *** p 0,001, IL-1 α en comparación con DX+IL-1 α .*

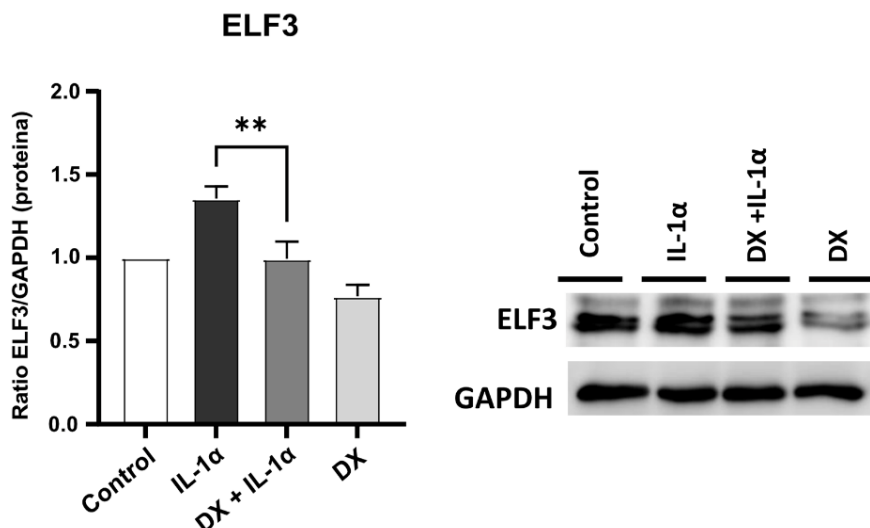


Figura 47. La dexametasona disminuye la expresión proteica de ELF3 en células de disco intervertebral degenerado en respuesta a estímulos proinflamatorios.

Nivel de expresión proteica de ELF3 en tejido degenerado después del tratamiento con IL-1α 0.1n/ml, dexametasona (DX) 1μM, y su combinación. Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes. *p<0,05, **p0,01, ***p0,001, IL-1α en comparación con DX+IL-1α.

Como control de la regulación de la respuesta inflamatoria, se determinó la expresión de la IL-6, y, como esperábamos, la DX en combinación con la IL-1α, disminuyó el efecto inductor de esta última (Figura 48A), así como la expresión de genes de degradación de la matriz como la MMP13 (Figura 48B).

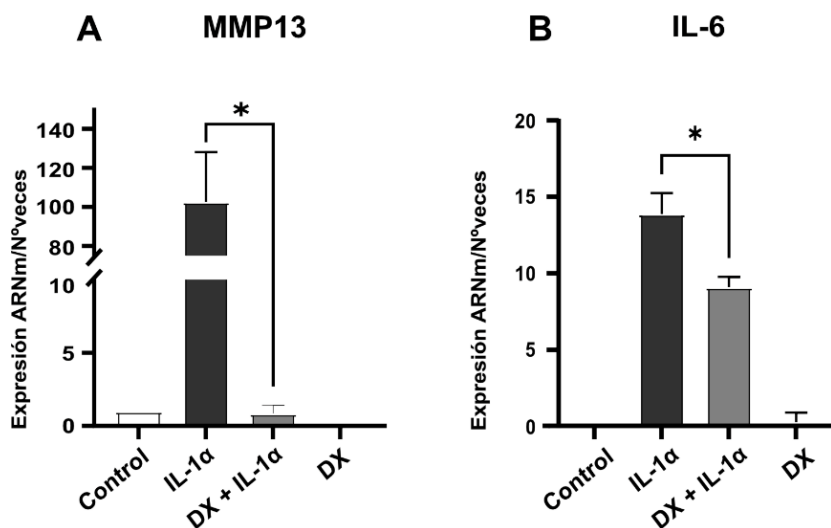


Figura 48. La dexametasona disminuye la expresión de genes inflamatorios y catabólicos en células de disco intervertebral degenerado en respuesta a estímulos proinflamatorios.

Nivel de expresión proteica de MMP13(A) e IL-6(B) en tejido degenerado después del tratamiento con IL-1α 0.1n/ml, dexametasona (DX) 1μM, y su combinación. Los datos representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. *p<0,05, **p0,01, ***p0,001, IL-1α en comparación con DX+IL-1α.



4.2.4 Estudio de la leptina como regulador de la expresión de ELF3

4.2.4.1 Niveles basales de leptina en disco sano y degenerado

Una vez que establecimos que la expresión de ELF3 en disco está regulada por factores proinflamatorios clásicos como la IL-1 α , quisimos indagar si la adipocina proinflamatoria leptina, que está estrechamente relacionada con enfermedades del sistema musculo esquelético como la artrosis, podría también influir en los cambios producidos en este factor de transcripción durante el desarrollo de la degeneración de disco intervertebral.

Inicialmente se determinó si el disco intervertebral sano y degenerado expresaban leptina y su receptor. Como se observa en la Figura 49, los tejidos discales expresaban tanto el ARNm de la leptina como el de su receptor. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en el cartílago articular artrósico, la expresión de la leptina se encuentra reducida en el disco degenerado comparado con el disco sano. No se observan variaciones en la expresión del ARNm del receptor de leptina en las condiciones analizadas.

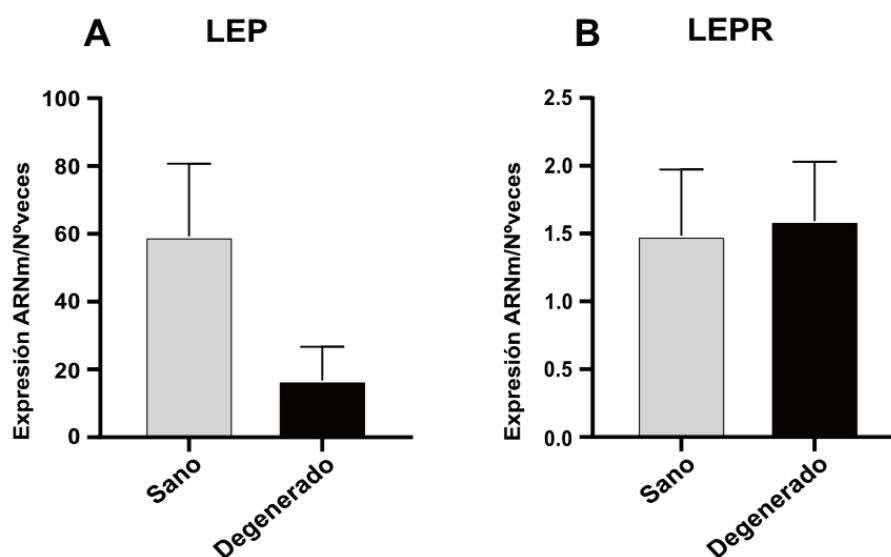


Figura 49. La expresión de leptina se ve disminuida en disco degenerado, y los niveles de su receptor permanecen invariables.

A: Niveles de expresión de ARNm de leptina en células de disco intervertebral sano vs degenerado. B: Niveles de expresión de ARNm del receptor de leptina en células de disco intervertebral sano vs degenerado. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

A continuación, analizamos el impacto de la leptina en la expresión de ELF3. La estimulación de las células del disco degenerado con la combinación de IL-1 α y leptina no produjo cambios significativos en la expresión de ARNm de ELF3 respecto al tratamiento con IL-1 α sola, pero sí una tendencia clara a la disminución de los niveles de proteína de este factor de transcripción (Figura 50 A, C, D). Del mismo modo, las células sanas del AF estimuladas con la combinación de IL-1 α y leptina no mostraron variaciones significativas en la expresión de ELF3 en comparación con el tratamiento individual con IL-1 α (Figura 50 B). El tratamiento solo con leptina no mostró cambios significativos en la expresión de ELF3 en ninguna de las condiciones estudiadas.

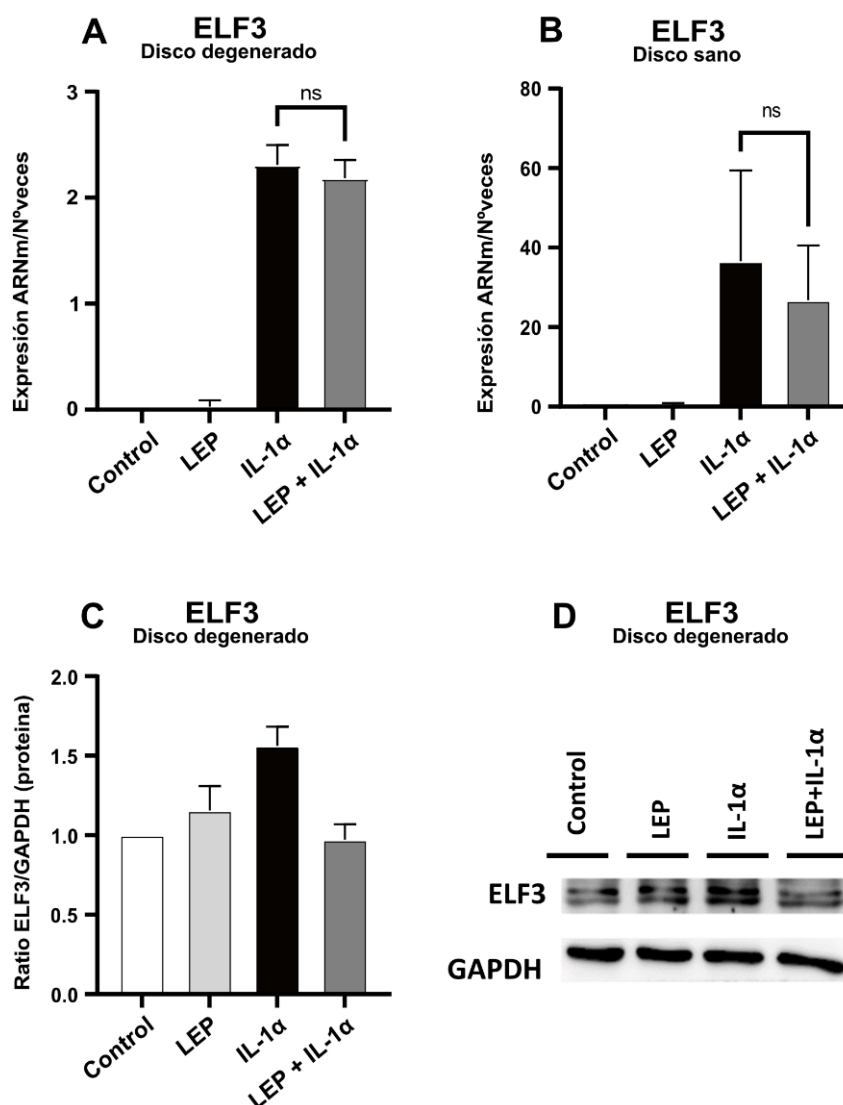


Figura 50. La combinación IL-1 α y leptina no muestran variaciones significativas en la expresión de ELN3. A: Nivel de expresión de ARNm de ELN3 en células degeneradas, B: Nivel de expresión de ARNm de ELN3 en células sanas. C-D: Niveles de expresión proteica de ELN3 en disco degenerado. Comparación entre IL-1 α y leptina+IL-1 α . Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

4.2.5 Sobreexpresión del gen ELF3

4.2.5.1 La sobreexpresión del gen ELF3 aumenta la expresión de genes inflamatorios.

Como hemos comprobado anteriormente, ELF3 está sujeto a regulación por estímulos inflamatorios. Con el objetivo de obtener una comprensión más profunda del papel del gen ELF3 en el disco intervertebral y si aparte de estar ligado al ambiente inflamatorio, es capaz de regular los procesos degenerativos en el disco, realizamos experimentos funcionales de sobreexpresión tanto en células de disco intervertebral sano como degenerado.

Como se observa en la Figura 51A, la transfección de las células de disco sano con el plásmido que contiene el inserto para el gen ELF3 produjo una sobreexpresión de este gen de manera eficiente. Dicha sobreexpresión del gen ELF3 vino acompañada de un aumento significativo de los niveles de factores catabólicos como la MMP13 (Figura 51B) y de mediadores inflamatorios como la IL-6 (Figura 51E), LCN2 (Figura 51G) y PTGS2 (Figura 51H). Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión de MMP3, MMP9 y ADAMTS5 (Figura 51C, D, F).

De igual manera, estudiamos el efecto de la sobreexpresión de ELF3 en las células de disco degenerado. Como muestra la Figura 52A, la transfección y sobreexpresión fue eficiente. De manera análoga a los resultados en disco sano, la sobreexpresión del gen ELF3 aumentó significativamente los niveles de MMP13 (Figura 52B), MMP3 (Figura 52C), IL-6 (Figura 52E) y PTGS2 (Figura 52H). Sin embargo, en este caso no encontramos significatividad en los niveles de expresión de MMP9, ADAMTS5 y LCN2 (Figura 52D, F, G).

Sobreexpresión de ELF3 en disco sano

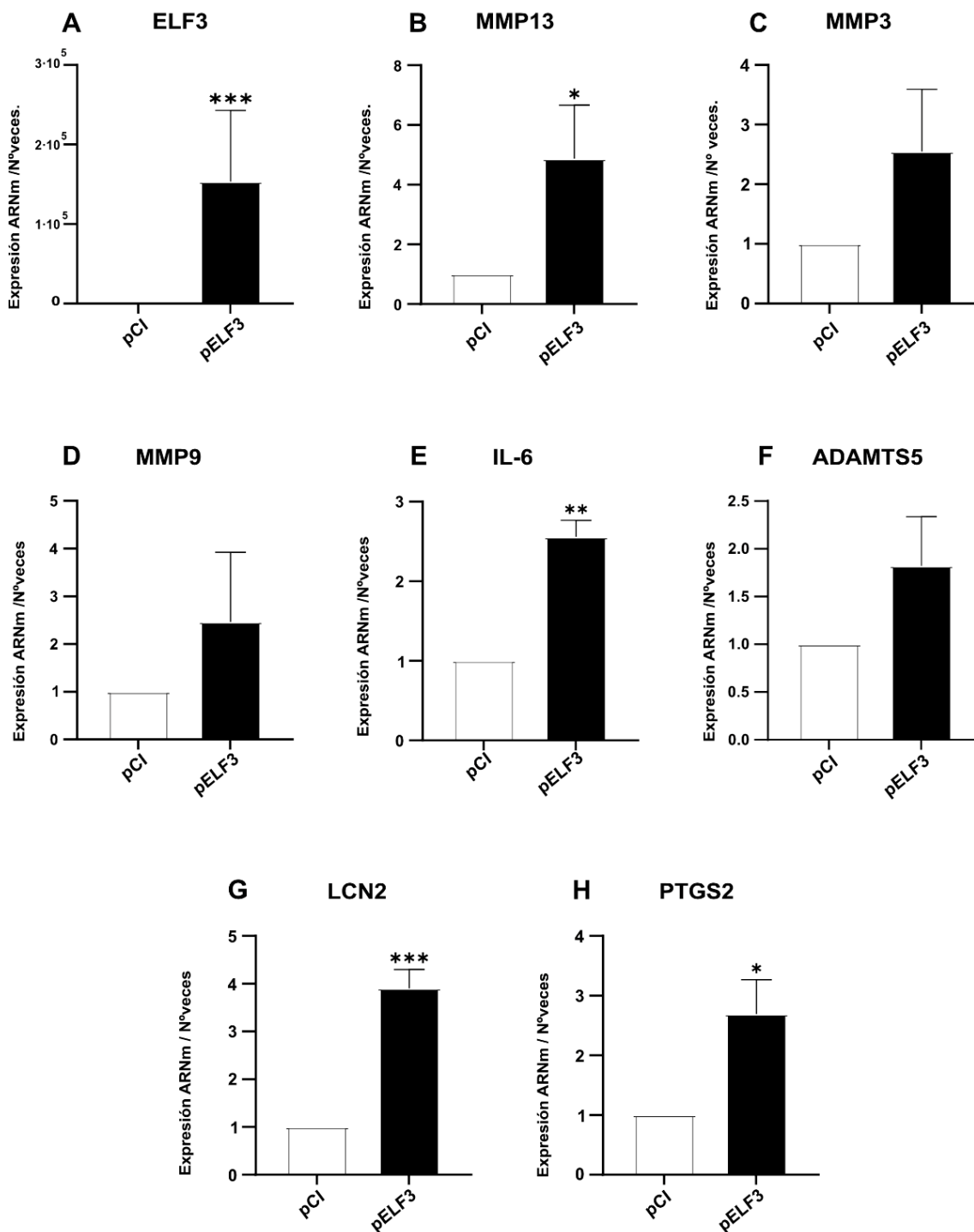


Figura 51. La sobreexpresión del gen *ELF3* en células de AF sanas aumenta la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz.

Niveles de expresión de ARNm en células AF sanas *ELF3* (A), *MMP13*(B), *MMP3* (C), *MMP9* (D), *IL-6* (E), *ADAMTS5* (F), *LCN2* (G), *PTGS2*(H) en células transfectadas con el plásmido vacío (pCI) o el plásmido de sobreexpresión del gen *ELF3* (pELF3). Los datos representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con pCI.

DE COMPOSTELA

Sobreexpresión de ELF3 en disco degenerado

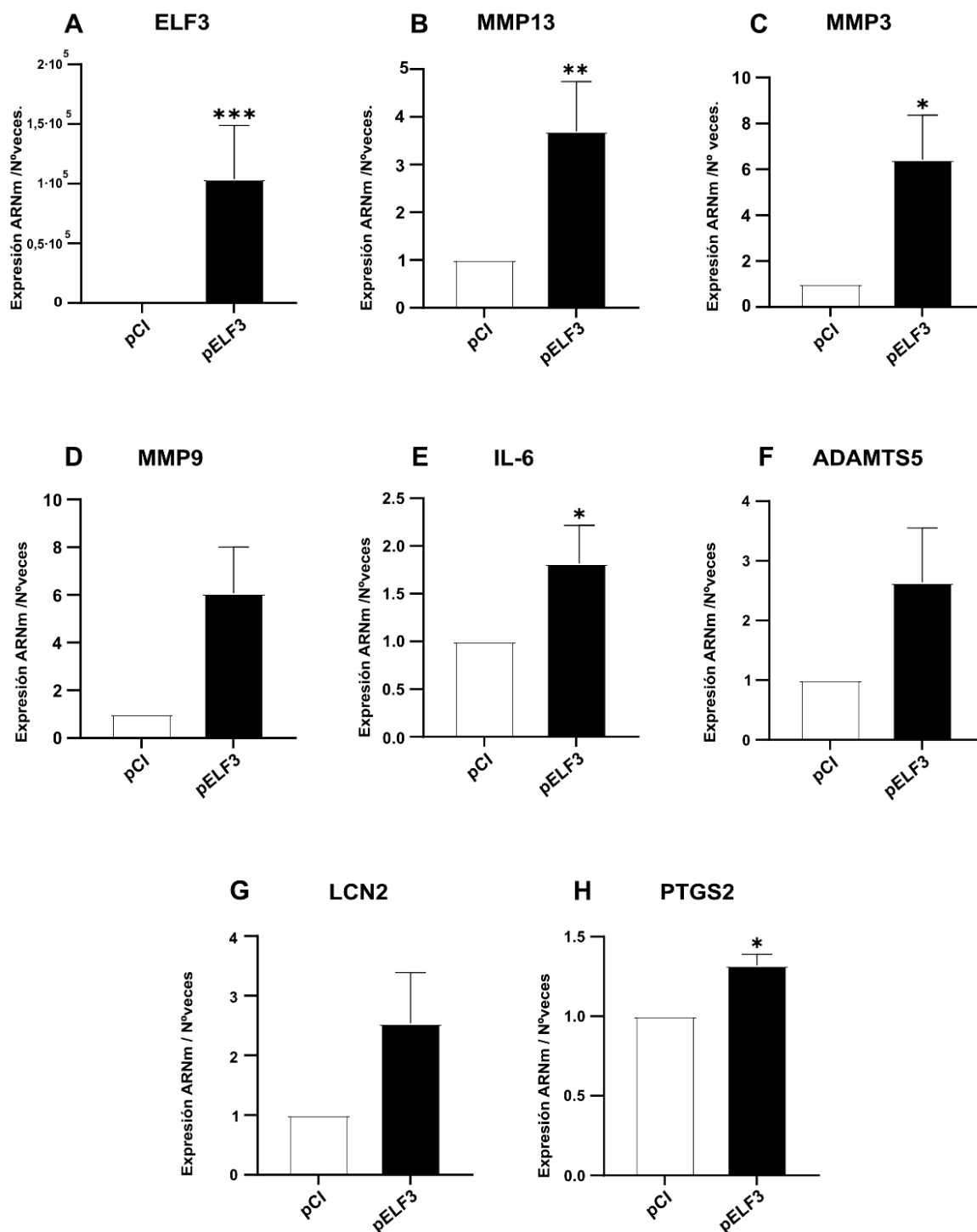


Figura 52. La sobreexpresión del gen ELF3 en células de AF degeneradas aumenta la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz.

Niveles de expresión de ARNm en células AF degeneradas ELF3 (A), MMP13(B), MMP3 (C), MMP9 (D), IL-6 (E), ADAMTS5 (F), LCN2 (G), PTGS2(H) en células transfectadas con el plásmido vacío (pCI) o el plásmido de sobreexpresión del gen ELF3 (pELF3). Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con pCI.

4.2.5.2 La sobreexpresión del gen ELF3 aumenta la expresión de genes inflamatorios en combinación con IL-1 α

Una vez descritos los efectos de la sobreexpresión del gen de ELF3 de manera basal, decidimos añadir a esta condición la estimulación con la IL-1 α . Comprobamos inicialmente la expresión del gen ELF3 (Figura 53A y Figura 54A). De acuerdo con los resultados antes descritos se observó que la expresión de ELF3 estaba ligeramente aumentada en presencia de IL-1 α .

A partir de estos experimentos en disco sano y degenerado, demostramos que la sobreexpresión del gen ELF3 junto con la IL-1 α conduce a un aumento en la expresión de genes relacionados con el catabolismo del disco, tales como la MMP13, así como MMP3 y ADAMTS5 (estos dos últimos significativos solo en disco sano) (Figura 53 B, C y F; Figura 54 B, C y F). Por otro lado, detectamos un incremento en la expresión de IL-6 cuando el gen ELF3 se sobreexpresaba en combinación con la estimulación con IL-1 α (Figura 53 E y Figura 54 E). Asimismo, se pudo apreciar un aumento en la expresión de la adipocina LCN2 cuando el gen ELF3 se sobreexpresaba tanto de manera individual como en combinación con el estímulo inflamatorio (solo en disco sano) (Figura 53 G), así como la tendencia al aumento de PTGS2 (Figura 53 H), en ambas condiciones. No observamos diferencias significativas en la expresión de MMP9 en ninguna de las condiciones analizadas.

Aparte del análisis de ARNm, quisimos corroborar a nivel de proteína algunos de nuestros hallazgos con una selección reducida de los representantes más importantes de la respuesta inflamatoria y catabólica. Para ello analizamos la expresión de MMP13 e IL-6 mediante la técnica de Western Blot en células de disco degenerado. Con estos experimentos obtuvimos un incremento estadísticamente significativo de la expresión de MMP13 después de la sobreexpresión de ELF3 sola y en combinación con IL-1 α (Figura 55A), mientras que los niveles de IL-6 solo aumentaron en células expuestas a la combinación de ambos factores (Figura 55B).

Sobreexpresión de ELF3 en disco sano

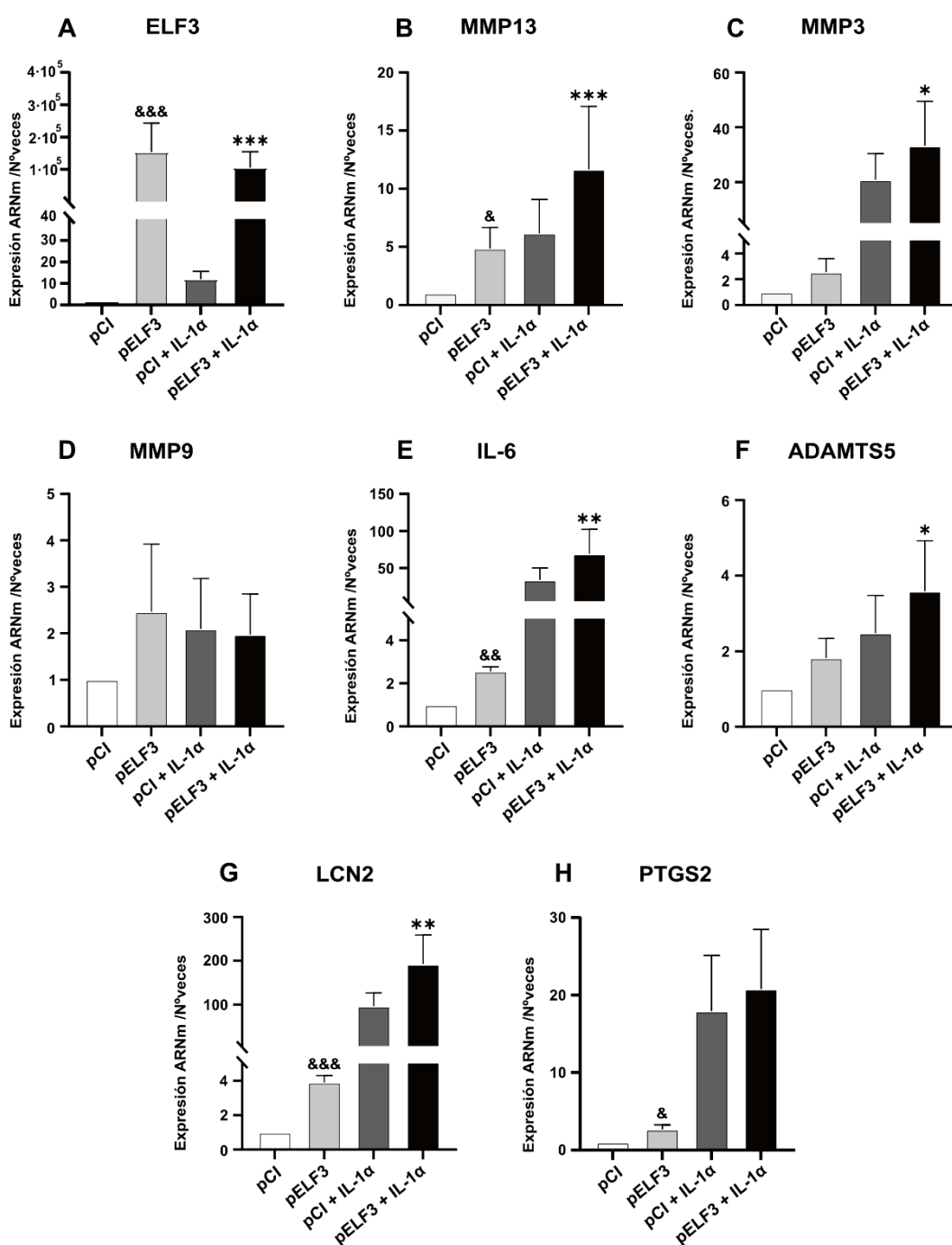


Figura 53. La sobreexpresión del gen *ELF3* en combinación con *IL-1α* 0.1ng/ml en células de AF sanas aumenta la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz.

Niveles de expresión de ARNm en células AF sanas de *ELF3* (A), *MMP13* (B), *MMP3* (C), *MMP9* (D), *IL-6* (E), *ADAMTS5* (F), *LCN2* (G), *PTGS2* (H) en células transfectadas con el plásmido vacío (pCI) o el plásmido de sobreexpresión del gen *ELF3* (pELF3) solo y en combinación con *IL-1α* 0.1ng/ml. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. $^{\&p} < 0,05$, $^{\&\&p} < 0,01$, $^{\&\&\&p} < 0,001$, pELF3 en comparación con pCI y $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$, pELF3+IL-1α en comparación con pCI+IL-1α.

Sobreexpresión de ELF3 en disco degenerado

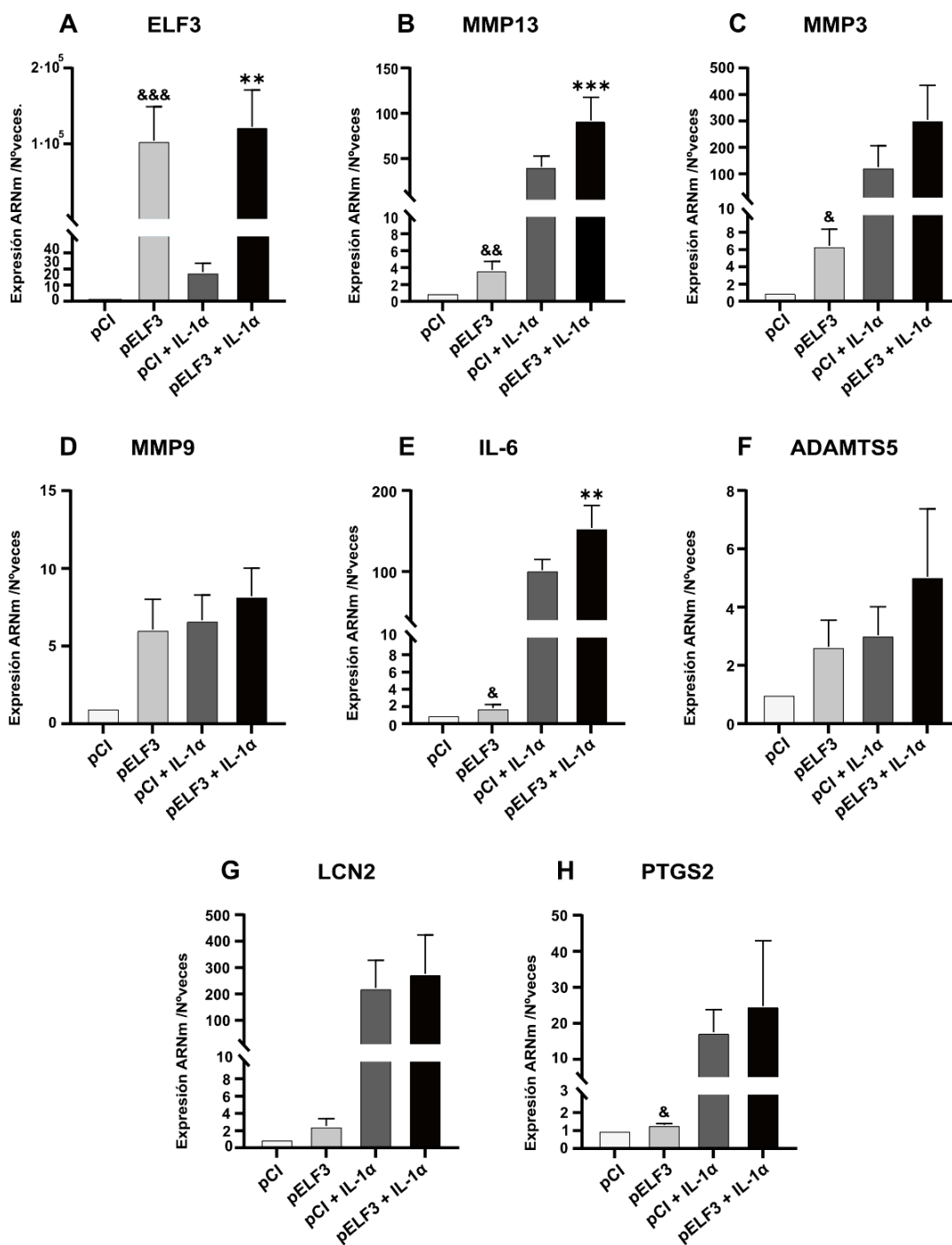


Figura 54. La sobreexpresión del gen *ELF3* en combinación con *IL-1α* 0.1ng/ml en células de AF degeneradas aumenta la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz.

Niveles de expresión de ARNm en células AF degeneradas de *ELF3* (A), *MMP13* (B), *MMP3* (C), *MMP9* (D), *IL-6* (E), *ADAMTS5* (F), *LCN2* (G), *PTGS2* (H) en células transfectadas con el plásmido vacío (pCI) o el plásmido de sobreexpresión del gen *ELF3* (pELF3) solo y en combinación con *IL-1α* 0.1ng/ml. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. &p < 0,05, &&p < 0,01, &&&p < 0,001, pELF3 en comparación con pCI y *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, pELF3+IL-1α en comparación con pCI+IL-1α.

Sobreexpresión de ELF3 en disco degenerado

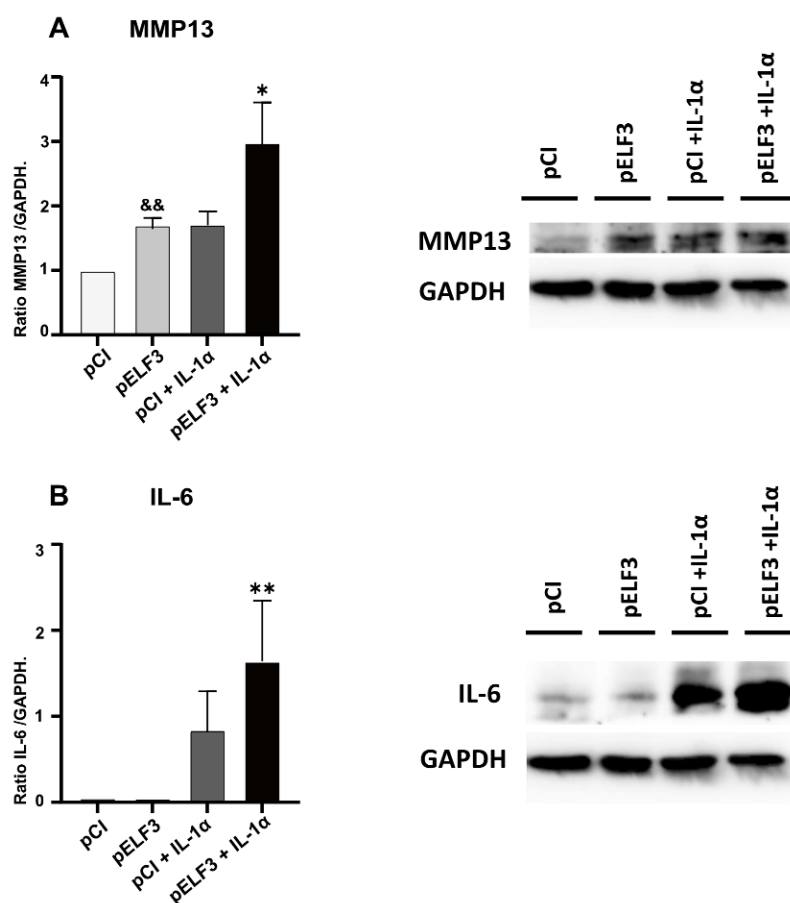


Figura 55. La sobreexpresión del gen ELF3 en combinación con IL-1α en células de AF degeneradas aumenta la expresión proteica de genes inflamatorios y de degeneración de matriz

Niveles de expresión proteicos en células AF degeneradas de MMP13(A) e IL-6 (B) en células transfectadas con el plásmido vacío (pCI) o el plásmido de sobreexpresión del gen ELF3 (pELF3) solo y en combinación con IL-1α 0.1ng/ml. Los datos representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. [&]p<0,05, ^{&&}p0,01, ^{&&&}p0,001, pELF3 en comparación con pCI y ^{*}p<0,05, ^{**}p0,01, ^{***}p0,001, pELF3+IL-1α en comparación con pCI+IL-1α.

4.2.6 Silenciamiento del gen ELF3

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en la sobreexpresión del gen ELF3, se realizaron experimentos de silenciamiento de este mismo gen en disco degenerado (Figura 56), de manera individual y en combinación con el estímulo inflamatorio de IL-1 α . Como podemos observar en la Figura 57B, el silenciamiento de ELF3 produjo una disminución estadísticamente significativa en la expresión de ARNm de MMP13 inducida por la IL-1 α , así como tendencias sin significancia estadística en la expresión de los genes de degradación de matriz como MMP3, MMP9 (Figura 57 C, D) y genes inflamatorios como IL-6 y PTGS2 (Figura 57 E, H) en las mismas condiciones. No observamos diferencias en la expresión de ADAMTS5 en ninguno de los grupos analizados.

Al igual que los experimentos anteriores, quisimos confirmar nuestros datos a nivel de proteína. La disminución de la expresión de MMP13 inducida por IL-1 α en células silenciadas para ELF3 fue corroborada mediante Western Blot (Figura 58A). Del mismo modo, pudimos observar que la tendencia observada en la reducción de los niveles de los transcritos de IL-6 en la condición siELF3 + IL-1 α fue también corroborada a nivel de proteína (Figura 58B).

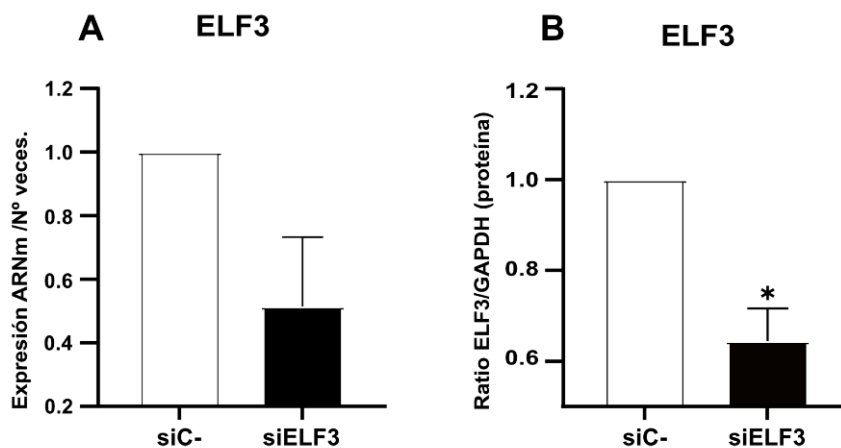


Figura 56. Niveles de expresión de ELF3 en disco degenerado tras el silenciamiento del gen ELF3.

A: Niveles de expresión de ARNm de ELF3, B: Niveles de expresión proteica de ELF3. siC-: Control negativo de silenciamiento. siELF3: células transfectadas con siRNAs específicos para el gen ELF3. Se normalizó con el control de carga GAPDH. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con siC-.

Silenciamiento de ELF3 en disco degenerado

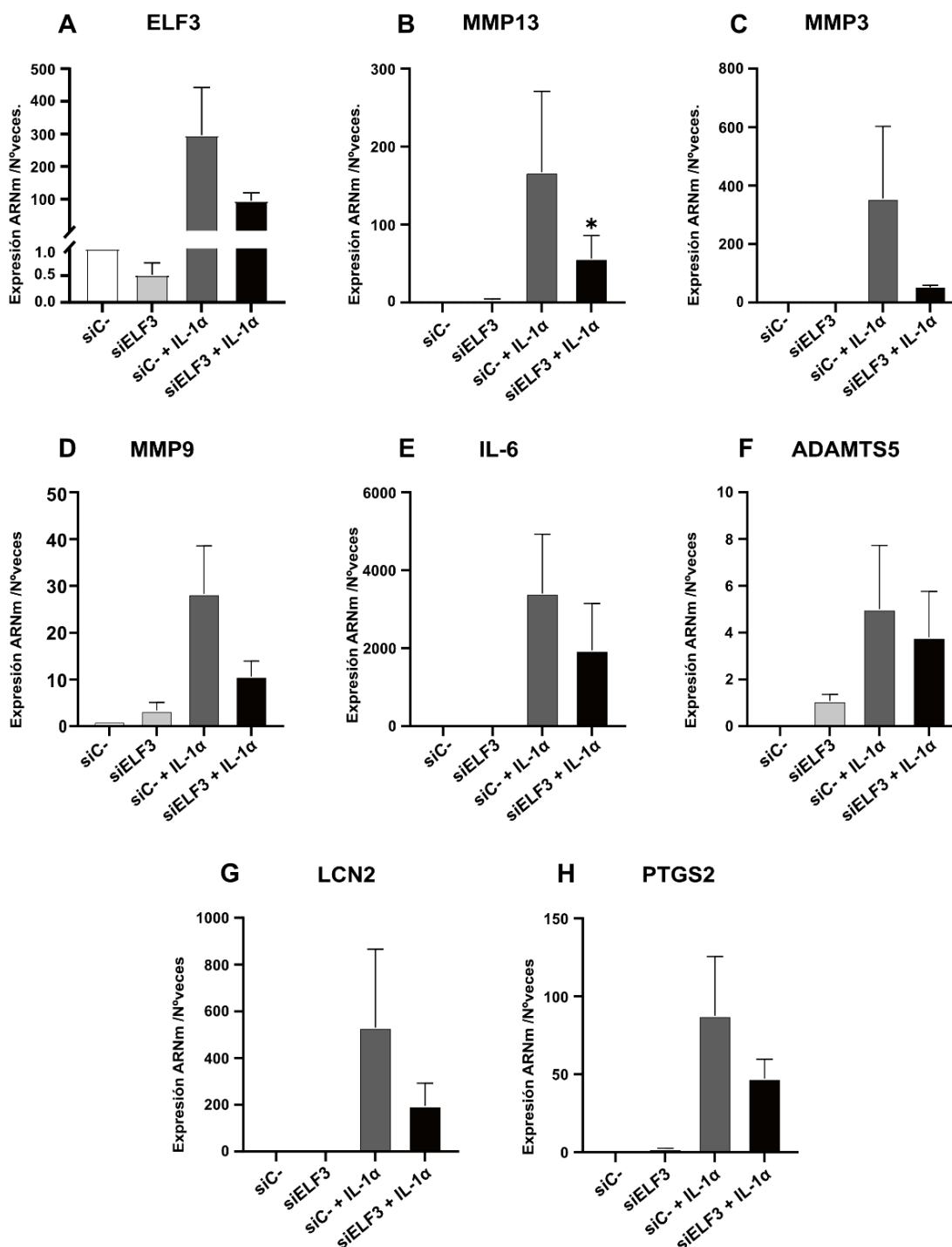


Figura 57. El silenciamiento del gen *ELF3* en células de AF degeneradas disminuye la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz (solo y en combinación con *IL-1α*).

Niveles de expresión de ARNm en células de AF degeneradas de *ELF3* (A), *MMP13* (B), *MMP3* (C), *MMP9* (D), *IL-6* (E), *ADAMTS5* (F), *LCN2* (G), *PTGS2* (H) transfectadas con los siRNAs indicados solos y en combinación con *IL-1α* 0.1ng/ml. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, siELF3 + IL-1α en comparación con siC- + IL-1α.

Silenciamiento de ELF3 en disco degenerado

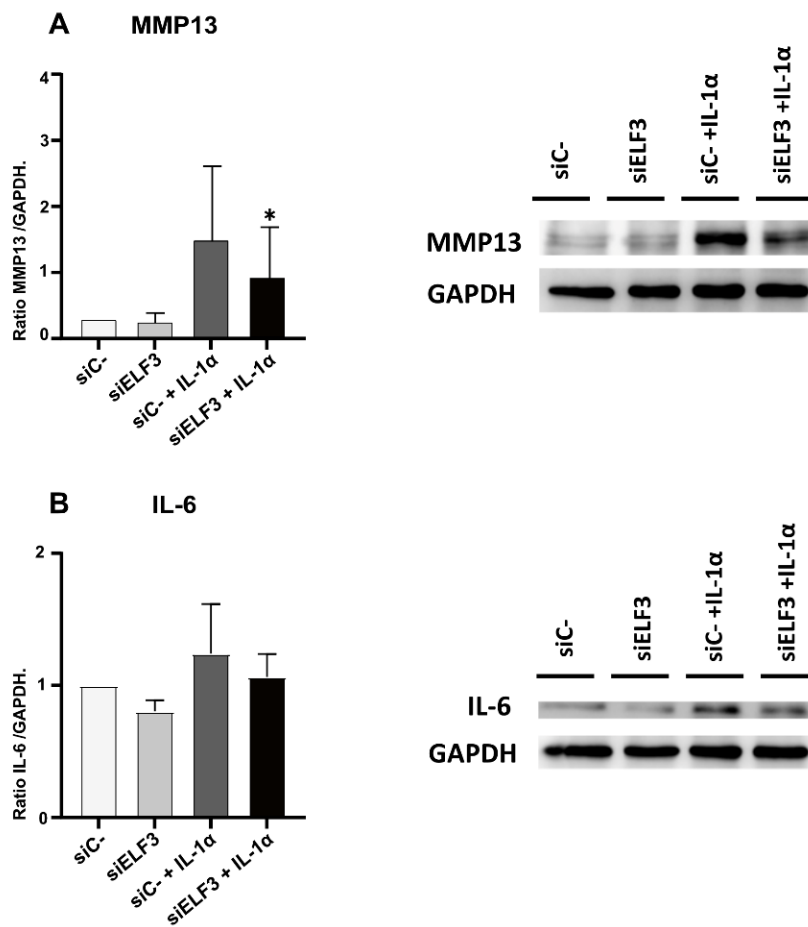


Figura 58. El silenciamiento del gen *ELF3* en células de AF degeneradas disminuye la expresión proteica de genes inflamatorios y de degeneración de matriz (solo y en combinación con *IL-1α*). Niveles de expresión proteicos en células de AF degeneradas de *MMP13* (A) e *IL-6* (B) transfectadas con los siRNAs indicados solos y en combinación con *IL-1α* 0.1ng/ml. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, siELF3 +IL-1α en comparación con siC-+IL-1α.

CAPÍTULO III:
**Estudio de sustancias naturales como posibles
terapias para la degeneración de disco intervertebral**

4.3 CAPÍTULO III: ESTUDIO DE SUSTANCIAS NATURALES COMO POSIBLES TERAPIAS PARA LA DEGENERACIÓN DE DISCO INTERVERTEBRAL

Se utilizaron células primarias de disco intervertebral degenerado para estudiar el efecto de sustancias naturales para el tratamiento de la degeneración de disco. El objetivo de este bloque de experimentos fue determinar si el oleocanthal tenía efectos antiinflamatorios en estas células, y especialmente, si era capaz de regular un factor tan determinante en el catabolismo del disco intervertebral como es ELF3.

4.3.1 Oleocanthal no altera la viabilidad de las células de disco intervertebral degenerado en combinación con LPS.

En primer lugar, se realizaron pruebas de viabilidad celular en respuesta al compuesto, utilizando el ensayo MTT, para identificar la dosis sin efecto citotóxico. Como se puede observar en la Figura 59, el oleocanthal no altera la viabilidad celular de las células de disco en ninguna de las condiciones analizadas.

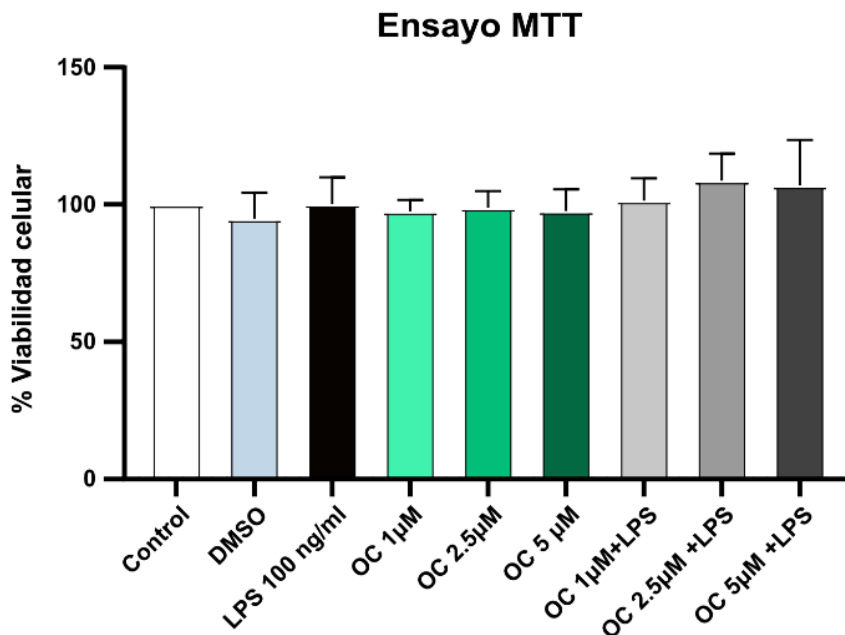


Figura 59. El oleocanthal no afecta a la viabilidad celular en disco degenerado.

Las células de disco fueron pretratadas con 1-5µM de oleocanthal durante 4 horas para después añadir LPS 100 ng/ml. Los resultados representan, en porcentaje con respecto al control, las medias de al menos 3 experimentos independientes con 8 observaciones individuales cada una para cada experimento y tratamiento. La viabilidad fue estudiada utilizando el ensayo MTT siguiendo los pasos descritos en la metodología. Las células fueron tratadas con DMSO a la concentración más alta para ver la influencia de éste como vehículo del oleocanthal.

4.3.2 Oleocanthal reduce la expresión de genes involucrados en la inflamación y el catabolismo de matriz inducida por la estimulación con LPS.

Para estos experimentos se utilizaron las dosis de 1 μ M y 5 μ M, dosis mínima y máxima que demostraron no tener efecto citotóxico en las células primarias de disco intervertebral degenerado (Figura 59). Determinamos que el oleocanthal era capaz de inhibir la expresión de ELF3, MMP3, ADAMTS5, IL-6, NOS2 y PTGS2 inducida por LPS a dosis baja. Del mismo modo, la dosis alta de oleocanthal contrarrestó la inducción de MMP13 y LCN2 ejercida por el LPS, además de los genes antes mencionados (Figura 60). Algunos de estos resultados fueron además confirmados mediante Western Blot, escogimos como representantes del estado proinflamatorio ELF3 y IL-6 (Figura 61A-B).

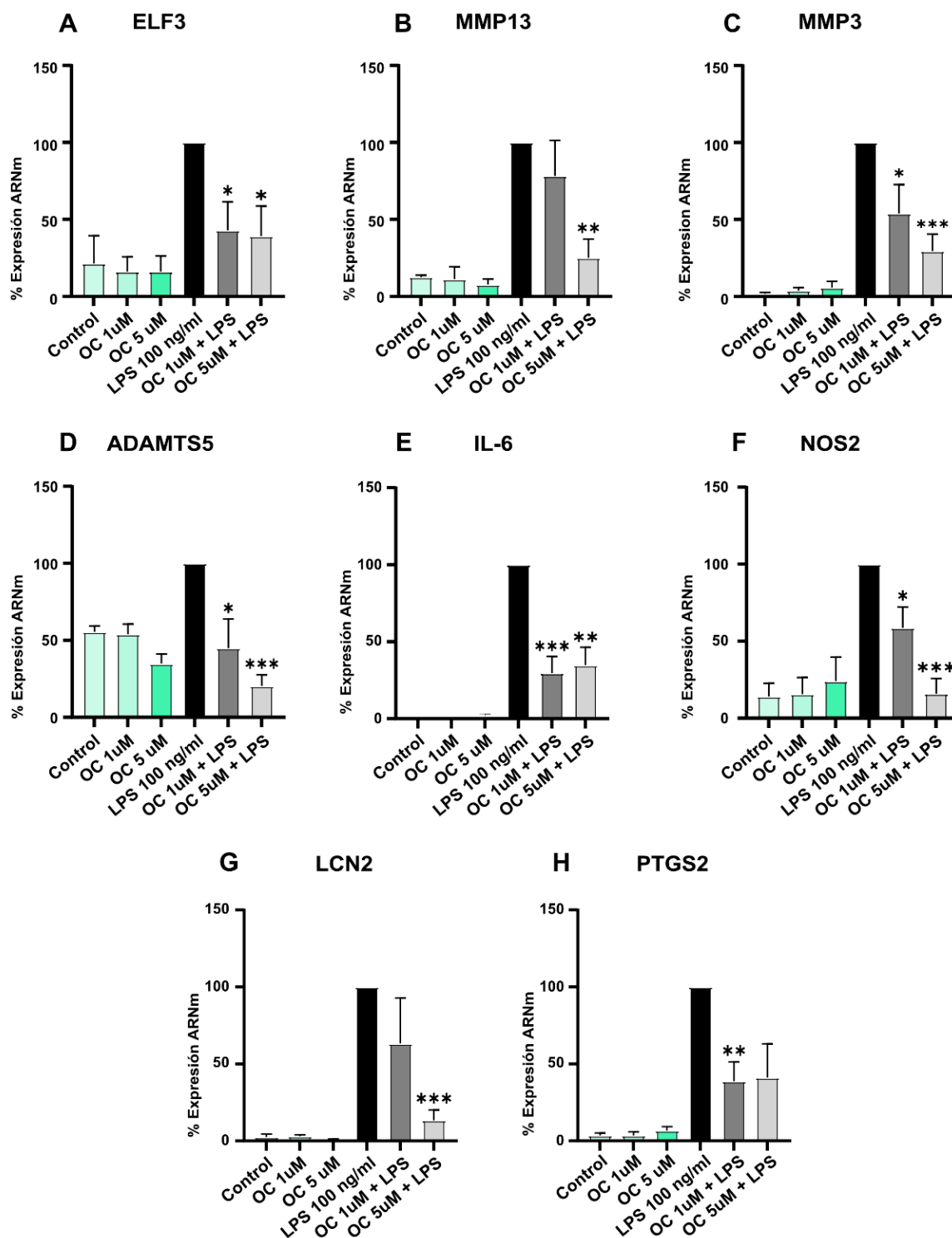


Figura 60. Oleocanthal disminuye la expresión de genes involucrados en la inflamación y el catabolismo de matriz inducida por la estimulación con LPS.

Niveles de expresión de ARNm (expresados en porcentaje) en células AF degeneradas de ELF3 (A), MMP13(B), MMP3 (C), ADAMTS5 (D), IL-6 (E), NOS-2 (F), LCN2 (G), PTGS2 (H) con tratamientos de OC 1 μM, OC 5 μM y LPS 100 ng/ml y sus respectivas combinaciones, habiendo realizado siempre un pretratamiento de 4 horas con OC. Los datos representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con LPS. Comparación de LPS 100ng/ml vs 1 μM de oleocanthal + LPS y LPS 100ng/ml vs 5 μM de oleocanthal + LPS.

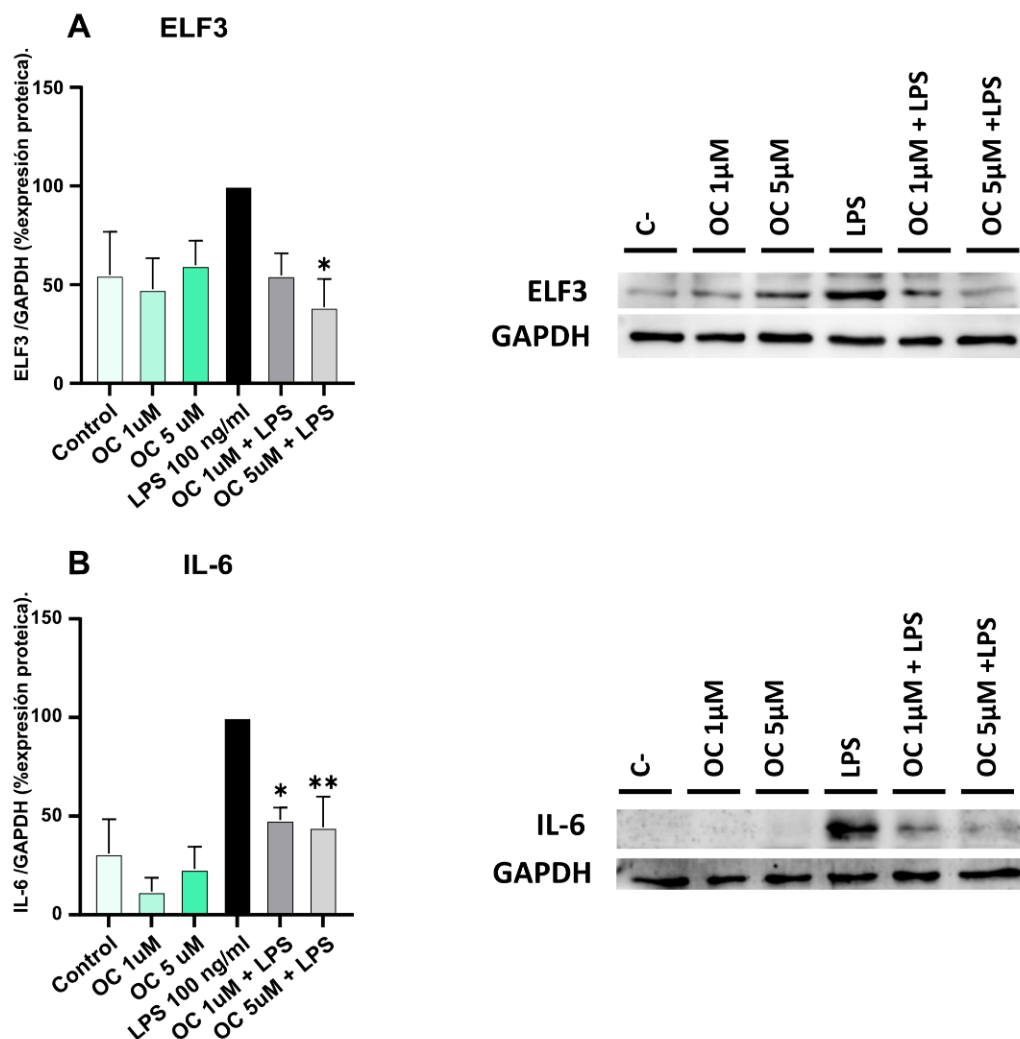


Figura 61. Oleochemical disminuye la expresión proteica de genes involucrados en la inflamación inducidos por la estimulación con LPS.

Niveles de expresión proteicos (expresados en porcentaje) en células AF degeneradas de ELF3 (A) e IL-6 (B) con tratamientos de OC 1µM, OC 5µM y LPS 100 ng/ml y sus respectivas combinaciones, habiendo realizado siempre un pretratamiento de 4 horas con OC. Los datos representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con LPS. Comparación de LPS 100ng/ml vs 1µM de oleochemical+ LPS y LPS 100ng/ml vs 5µM de oleochemical + LPS.

4.3.3 Oleocanthal regula la activación de la vía de NFκB inducida por el LPS

Para obtener un entendimiento más profundo de los mecanismos moleculares subyacentes a la actividad del oleocanthal en las células del disco intervertebral humano, analizamos mediante Western Blot su influencia en la vía de señalización de NFκB. Como se muestra en la Figura 62, el LPS indujo la fosforilación de la subunidad p65 de NFκB. El pretratamiento con OC redujo esta fosforilación, especialmente a una concentración de 5 μM.

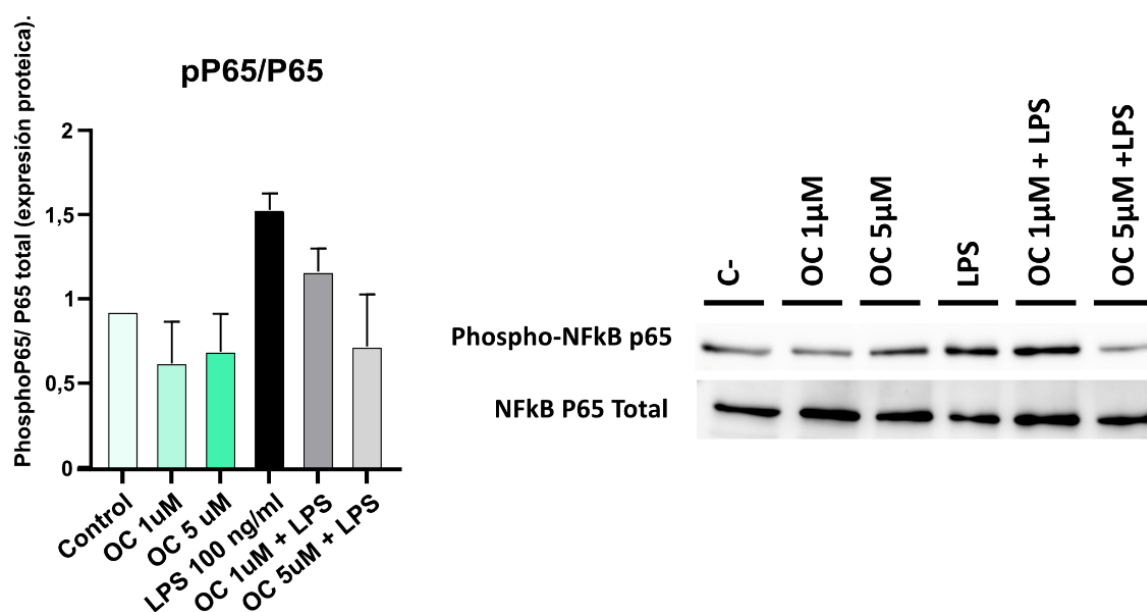


Figura 62. Oleocanthal regula la activación de la vía de NFκB inducida por el LPS.

Niveles de expresión proteica (a 25 minutos) de phospho-P65 y P65 total en disco degenerado con tratamientos de OC 1μM, OC 5μM y LPS 100 ng/ml y sus respectivas combinaciones, habiendo realizado siempre un pretratamiento de 4 horas con OC. Los datos representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. Comparación de LPS 100ng/ml vs 1μM de oleocanthal+ LPS y LPS 100ng/ml vs 5μM de oleocanthal+LPS.

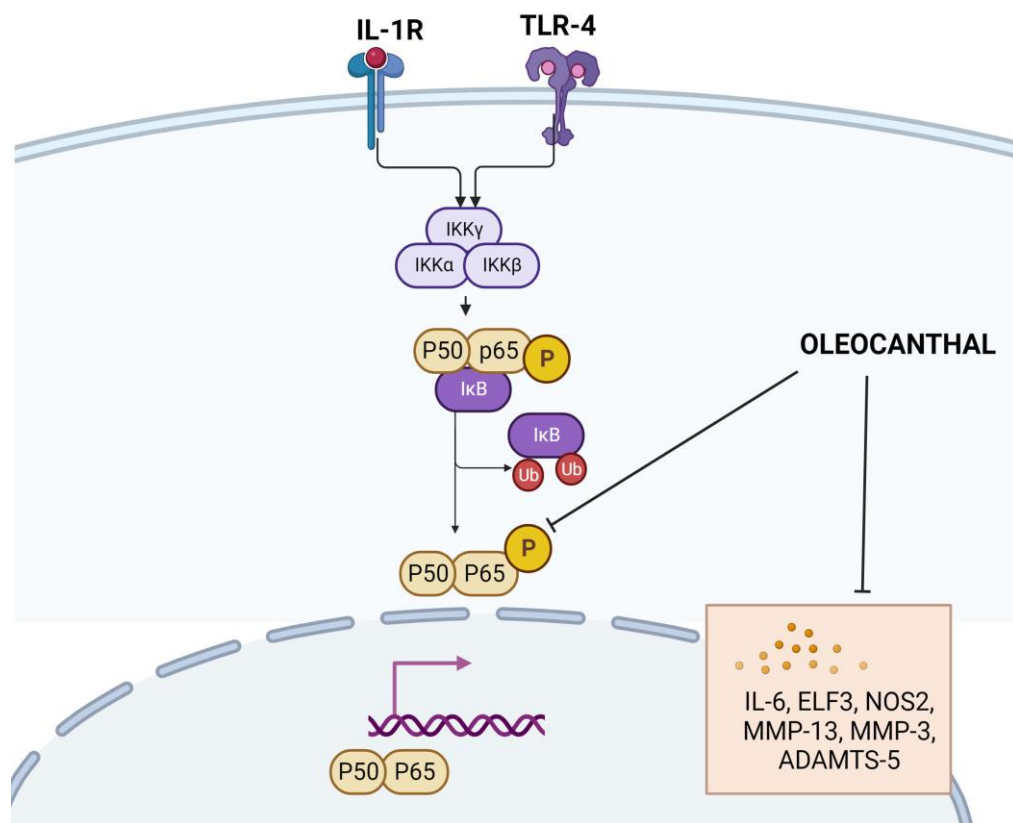


Figura 63. Representación esquemática del efecto del oleocanthal sobre la vía de señalización NFκB. Imagen de elaboración propia BioRender®.

4.3.4 Oleocanthal no altera la viabilidad de las células de disco intervertebral degenerado en combinación con IL-1α.

Tras ver el efecto que el oleocanthal producía en las células estimuladas con lipopolisacárido bacteriano, se decidió comprobar el efecto del oleocanthal en células estimuladas con IL-1α. Como se puede ver en la Figura 64, el oleocanthal (sólo o en combinación con IL-1α) no altera la viabilidad celular a las dosis de 1μM y 5μM.

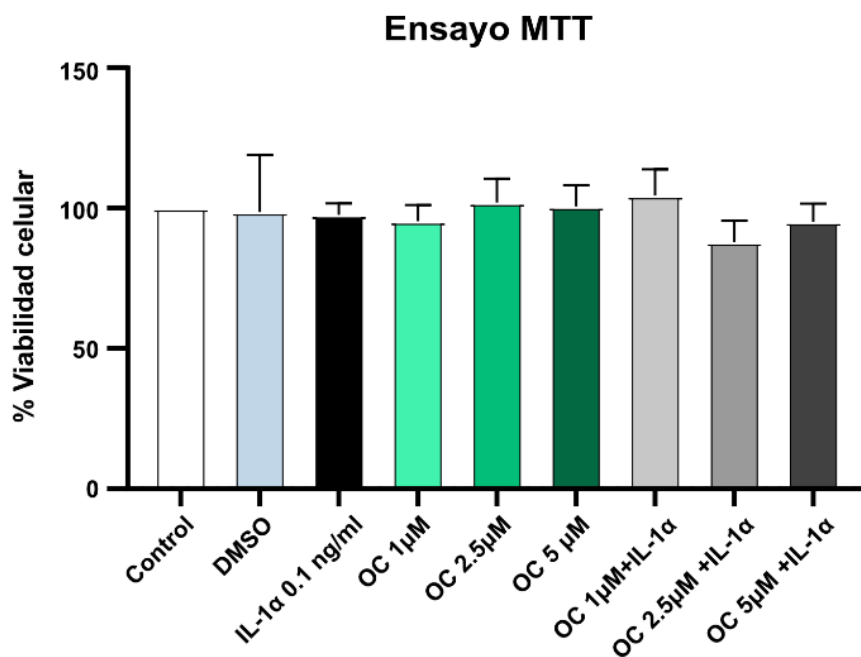


Figura 64. El oleocanthal no afecta a la viabilidad celular en disco degenerado.

Las células de disco fueron pretratadas con 1-5µM de oleocanthal durante 4 horas para después añadir IL-1α 0,1 ng/ml, y sus combinaciones, como podemos ver en la gráfica. Los resultados representan, en porcentaje con respecto al control, las medias de al menos 3 experimentos independientes con 8 observaciones individuales cada una para cada experimento y tratamiento. La viabilidad fue estudiada utilizando el ensayo MTT siguiendo los pasos descritos en la metodología. Las células fueron tratadas con DMSO a la concentración más alta para ver la influencia de éste como vehículo del oleocanthal.

4.3.5 Oleocanthal reduce la expresión de genes involucrados en la inflamación y el catabolismo de matriz inducida por la estimulación con IL-1α.

Como se muestra en la Figura 65, la IL-1α induce la expresión de ARNm de MMP13, MMP3, ADAMTS5, IL-6, ELF3 y NOS2 en las células AF degeneradas después de 24 horas, en comparación con el control no tratado. El pretratamiento durante 4 horas con oleocanthal a 1 µM disminuyó significativamente los niveles de expresión de IL-6, pero no de los otros mediadores. Sin embargo, a la dosis de 5 µM, el oleocanthal logró disminuir los niveles de ELF3, MMP13, MMP3, ADAMTS5, IL-6 y NOS2.

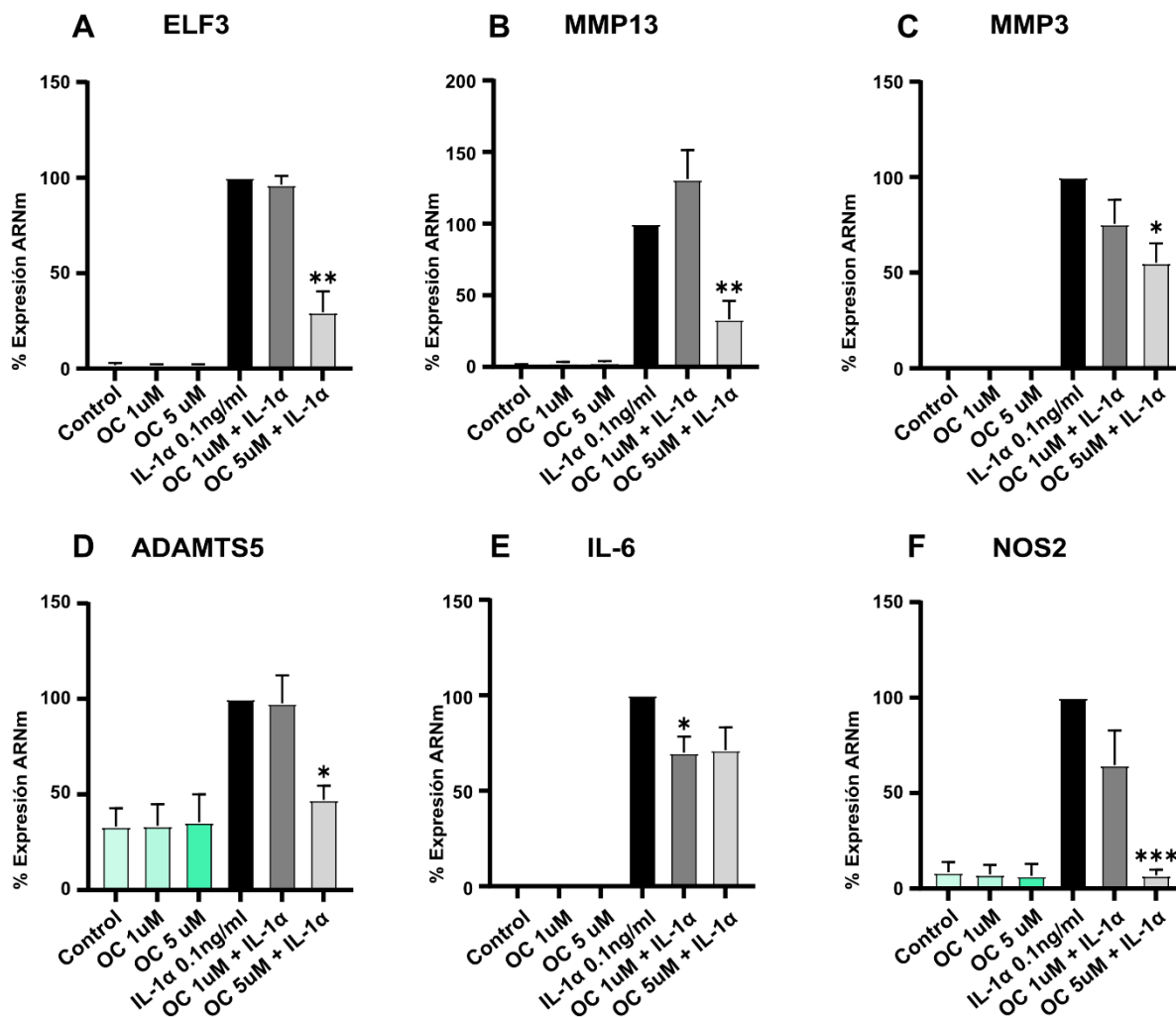


Figura 65. Oleocanthal disminuye la expresión de genes involucrados en la inflamación y el catabolismo de matriz inducida por la estimulación con IL-1α. Niveles de expresión de ARNm (expresados en porcentaje) en células AF degeneradas de ELF3 (A), MMP13 (B), MMP3 (C), ADAMTS5 (D), IL-6 (E), NOS-2 (F) con tratamientos de OC 1µM, OC 5µM y IL-1α ng/ml y sus respectivas combinaciones habiendo realizado siempre un pretratamiento de 4 horas con OC. Los datos representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. *p<0,05, **p0,01, ***p0,001 en comparación con IL-1α. Comparación de IL-1α vs 1µM de oleocanthal+ IL-1α y IL-1α vs 5µM de oleocanthal + IL-1α.

También quisimos corroborar algunos de nuestros hallazgos mediante Western Blot. Como se observa en la Figura 66A, el oleocanthal indujo una disminución de la expresión proteica de la ELF3, así como de IL-6. Siendo los resultados coherentes con los obtenidos anteriormente en la expresión de ARN mensajero.

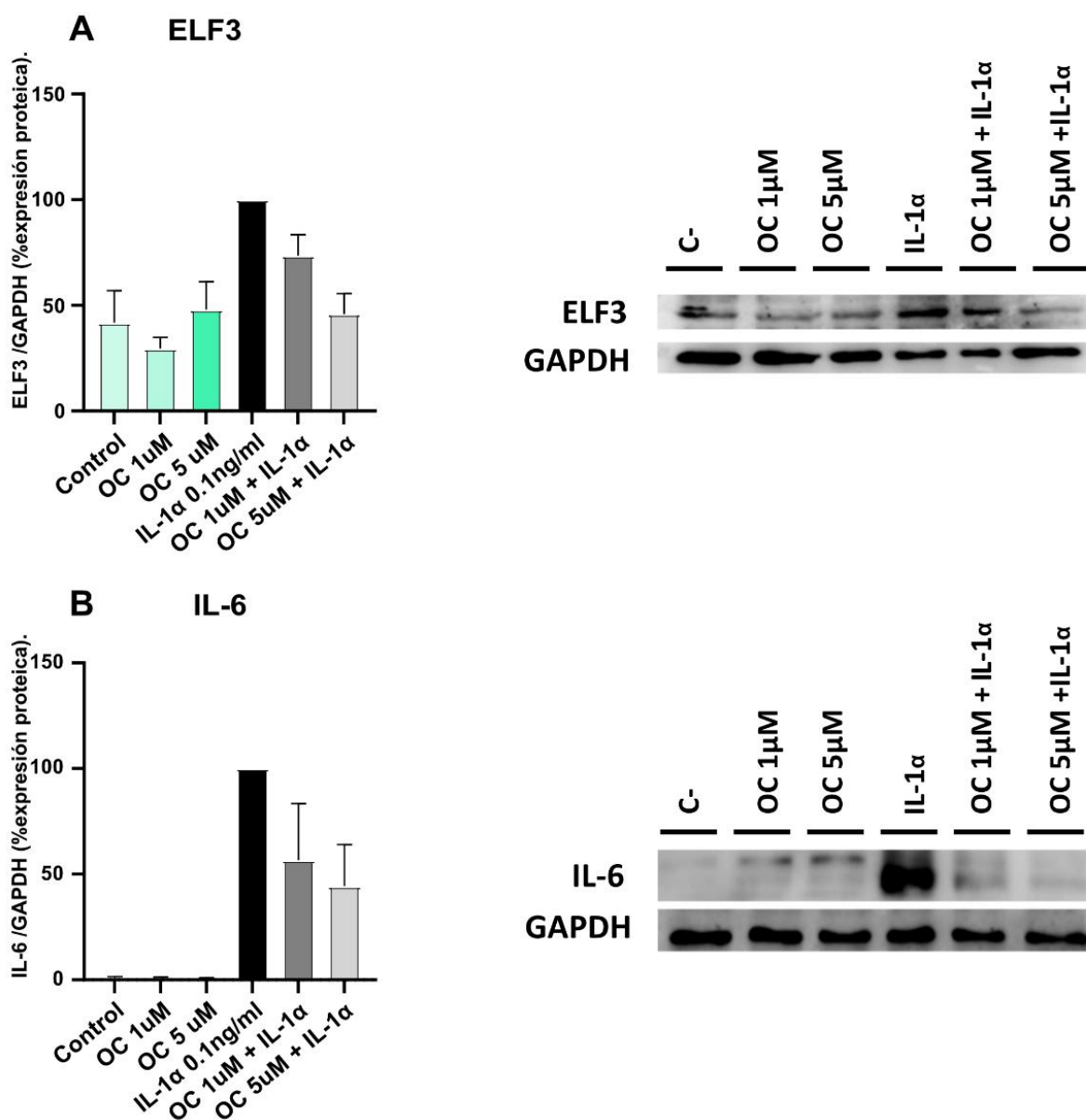


Figura 66. Oleoicanthal disminuye la expresión proteica de genes involucrados en la inflamación inducidos por la estimulación con IL-1α.

Niveles de expresión proteicos (expresados en porcentaje) en células AF degeneradas de ELF3 (A) e IL-6 (B) con tratamientos de OC 1µM, OC 5µM y IL-1α ng/ml y sus respectivas combinaciones habiendo realizado siempre un pretratamiento de 4 horas con OC. Los datos representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. Comparación de IL-1α vs 1µM de oleoicanthal + IL-1α y IL-1α vs 5µM de oleoicanthal + IL-1α.

4.3.6 Oleocanthal regula la activación de la vía de NFκB tras estimulación con IL-1α

De manera similar a los experimentos con el LPS, nos propusimos investigar cómo el oleocanthal afecta a la regulación de la vía de señalización NFκB bajo la influencia de la IL-1α. Para ello, evaluamos la fosforilación de la subunidad p65 de NFκB mediante Western Blot. Como se observa en la Figura 67, la IL-1α induce la fosforilación de p65, pero al realizar el pretratamiento con OC, esta fosforilación disminuye de manera dependiente de la dosis.

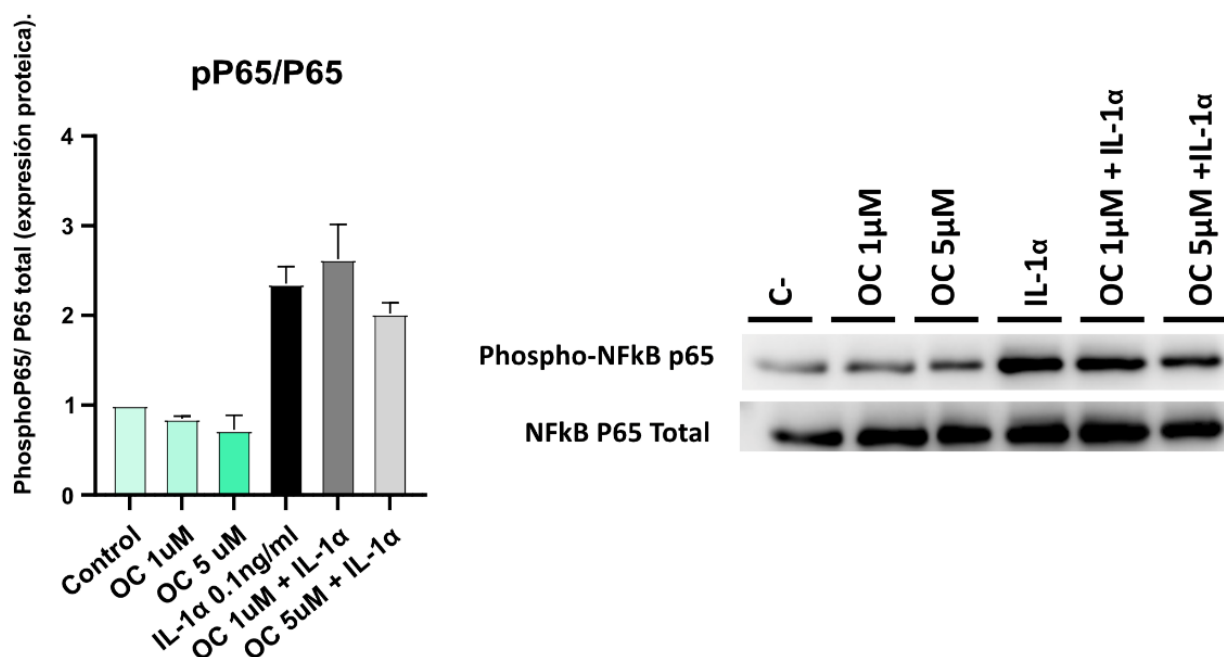


Figura 67. Oleocanthal regula la activación de la vía de NFκB inducida por IL-1α.

Niveles de expresión proteica de phospho-P65 y P65 total en disco degenerado con tratamientos de OC 1μM, OC 5μM y IL-1α ng/ml y sus respectivas combinaciones habiendo realizado siempre un pretratamiento de 4 horas con OC. Los datos representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. Comparación de IL-1α vs 1μM de oleocanthal + IL-1α y IL-1α vs 5μM de oleocanthal+ IL-1α.

Discusión

5 DISCUSIÓN

5.1 DISCUSIÓN: CAPÍTULO I. PERFIL METABOLÓMICO DEL DISCO INTERVERTEBRAL HUMANO

De acuerdo con los datos recopilados en el Estudio de la Carga Global de Enfermedades 2021 ("Global Burden of Disease Study 2021"), se estima que aproximadamente 619 millones de personas en todo el mundo padecen dolor de espalda. La proyección de estos datos indica que habrá un aumento sustancial que en el año 2050 llegaría a alcanzar la cifra de 843 millones de afectados [27]. Dentro de ellos, la mayoría de los casos de dolor lumbar están relacionados con la enfermedad de degeneración de disco intervertebral.

La degeneración de disco intervertebral, es una enfermedad musculoesquelética muy compleja que involucra múltiples factores y se ve caracterizada por alteraciones metabólicas y estructurales en el disco intervertebral. A medida que avanza, se produce un deterioro gradual en la estabilidad mecánica y en la capacidad de amortiguación de la estructura del disco intervertebral. La DDI presenta una etiología multifactorial, hecho que complica nuestra capacidad para comprender su origen y desarrollo, lo que plantea un desafío en cuanto a la identificación de terapias efectivas y biomarcadores fiables.

Actualmente, el diagnóstico de la DDI se sustenta principalmente en el empleo de técnicas de imagen en fases avanzadas de la enfermedad en las que ya se manifiestan síntomas, careciendo de biomarcadores que permitan discernir entre la degeneración silente y la degeneración sintomatológica. Además, el manejo de esta enfermedad se apoya fundamentalmente en enfoques conservadores que incluyen el uso de analgésicos, agentes antiinflamatorios, relajantes musculares, terapia física, reposo, y como última opción, procedimientos quirúrgicos. Por lo que no existe una cura definitiva o terapias específicas para contrarrestar la degeneración discal.

Debido a la necesidad de nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la degeneración de disco intervertebral se hace imprescindible el estudio del perfil biológico del mismo. Con el fin de esclarecer los mecanismos que participan en la fisiopatología y el desarrollo de la enfermedad y comprender mejor los procesos metabólicos que ocurren en esta estructura del sistema músculo-esquelético, la primera parte de esta tesis se basó en el estudio

metabolómico del disco intervertebral. Existen tres razones principales para la realización de esta aproximación metodológica:

- Comprender la salud del disco intervertebral: el metaboloma del disco y en particular la comparación de los metabolomas entre tejidos sanos y degenerados que nos puede proporcionar información valiosa sobre su estado de salud y puede ser útil para la detección temprana de cambios patológicos.
- Asimismo, puede llevar a la identificación de biomarcadores metabólicos que estén asociados con las condiciones degenerativas y utilizarse para el diagnóstico precoz y el seguimiento de enfermedades.
- Finalmente puede ser útil en revelar posibles dianas terapéuticas para el desarrollo de tratamientos destinados a prevenir y/o tratar las enfermedades degenerativas discales.

Hasta el momento, se dispone de un conocimiento limitado sobre el metaboloma en el contexto de la enfermedad de disco intervertebral. El equipo de Shan *et al.* llevó a cabo la determinación de los niveles de metabolitos en el plasma de pacientes con hernia discal intervertebral utilizando cromatografía de gases y espectrometría de masas. Sus hallazgos revelaron que, en los pacientes con hernia discal, se observó un aumento en los niveles en plasma de ácido glutámico, aspártico y glicina en comparación con el grupo control. Sin embargo, se registró una disminución en otros metabolitos, como la glucosa 1-fosfato [226]. Otros estudios, como el que realizó el grupo de Radek *et al.* utilizaron el método de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de alta resolución para la caracterización de los niveles de metabolitos en el tejido de disco intervertebral de pacientes con degeneración. En este contexto, se describieron sobre todo proteoglicanos y glucosaminoglicanos. La degradación de los proteoglicanos se puso de manifiesto debido a las altas concentraciones de aminoácidos (alanina, glicina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina y valina), estando la concentración de las mismas correlacionada con el nivel de degeneración [227]. Se observó que en los grados de degeneración más avanzados (Pfirrmann IV y V), en comparación con otros menos avanzados (Pfirrmann III), las concentraciones de creatinina, glicina, hidroxiprolina, alanina, leucina, valina, acetato, isoleucina, α,β -glucosa y mioinositol, eran más elevadas, mientras que se registraban niveles disminuidos de sulfato de condroitina [227]. La reducción del sulfato de condroitina posiblemente indica una disminución de los glucosaminoglicanos sulfatados en el núcleo pulposo degenerado del disco, mientras que el incremento de la hidroxiprolina podría estar relacionado con una modificación en el contenido y la disposición general del colágeno en el anillo fibroso.

Debido a la escasez de resultados al respecto, se hace imperante el estudio completo del perfil metabólico de las células de núcleo pulposo y anillo fibroso del disco intervertebral. En la primera parte de esta tesis, se caracterizó la metabolómica de las células del disco, tanto en pacientes sanos como con degeneración de disco intervertebral, centrándonos en este caso en la lipidómica celular, no descrita en la literatura hasta este momento.

Como resultado de estos experimentos obtuvimos que los metabolitos más afectados en el disco degenerado fueron los triglicéridos, los diacilglicéridos y los ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados), que principalmente son moléculas cuya función es la reserva energética. Además de esta función, se han descrito otras funciones de los ácidos grasos, siendo capaces también de regular el metabolismo e inflamación [228]. Su carencia en el disco degenerado podría estar relacionada con la falta de recursos energéticos que llegan al tejido a lo largo de la degeneración. Al ser el disco un tejido avascularizado y tras la paulatina degeneración de las placas terminales a través de las cuales se suministran los nutrientes, el disco degenerado deja de tener a su disposición glucosa, oxígeno y otros nutrientes, por lo que predomina la oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias [229,230]. Los ácidos grasos, serían los encargados de otorgar la energía a las células que se degradarían formando acetil-coA y 2-propanol, metabolitos que se han visto aumentados en disco degenerado [231].

Los ácidos grasos desempeñan un papel crucial en la regulación de dos actores importantes en la respuesta inflamatoria: NF κ B y los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPARs) [228]. Se ha postulado un papel relevante para NF κ B en la fisiopatología de la DDI [232,233], ya que la inhibición de esta vía frenaba la enfermedad. Por otro lado, los lisofosfatidilinositoles (LPI), se han identificado como lípidos señalizadores bioactivos debido a su capacidad para inducir una respuesta inflamatoria y de sensibilización al dolor mediante la interacción agonista con el receptor acoplado a proteína G 55 (GPR55) [234]. Estudios recientes han descubierto que la inhibición de este receptor por un antagonista del mismo atenúa la activación de los condrocitos inducida por los productos finales de la glicación avanzada [235]. La disminución de los niveles en disco degenerado tanto de ácidos grasos como LPI, podrían explicar, parcialmente, la similitud entre los niveles de expresión de genes inflamatorios (NOS2, COX2, IL-6, IL-8, IL-1 β y TNF α) encontrados entre discos sanos y degenerados.

Sin embargo, los niveles disminuidos de fosfatidilcolina, podrían estar referidos a un aumento en la respiración mitocondrial del disco degenerado [236]. La respiración mitocondrial ha sido descrita por afectar a la degeneración de disco intervertebral debido a que juega un

papel fundamental en el metabolismo glucolítico, estrés oxidativo, y homeostasis celular en células de disco. Se ha descrito una alteración estructural y funcional en las mitocondrias de células de disco degeneradas [237]. Esta pérdida de función mitocondrial contribuye al desequilibrio en la regulación del estrés oxidativo, senescencia celular prematura y muerte celular, las cuales son características en la DDI [238,239].

En condiciones fisiológicas normales, se puede observar la presencia de esfingomielina y sus derivados (ceramidas y esfingosinas) en el plasma o formando parte de lipoproteínas. No obstante, puede ocurrir una desregulación de los niveles de esfingomielina y sus componentes en el plasma, lo que desencadena un estado fisiopatológico, observaciones ya descritas en enfermedades cardiovasculares, renales y metabólicas [240,241]. Además, la disminución de los niveles de esfingomielinas y el aumento de las ceramidas que observamos podrían estar vinculados a un estado de senescencia, autofagia o incluso a la muerte celular en los discos degenerados. Se conoce que el equilibrio entre ceramidas y esfingomielinas desempeña un papel crítico en el destino de las células [242]. Los esfingolípidos, incluyendo la ceramida y esfingosina-1-fosfato, son lípidos importantes en la regulación de la senescencia celular, siendo la ceramida inductora de la misma, mientras que la esfingosina-1-fosfato es inhibidora [243,244].

Entre los factores que desencadenan cambios en el disco intervertebral están la inducción de la inflamación, la secreción de citoquinas inflamatorias, la apoptosis, la autofagia y los cambios en la morfología celular [245]. Debemos destacar la importancia de la inflamación en el proceso de degeneración de disco intervertebral, factor que contribuye a la patogénesis de la enfermedad. Factores asociados a la inflamación como la IL-6, IL-1 β o el TNF α , han sido ampliamente estudiados y descritos como factores que contribuyen a la enfermedad [246,247]. También la obesidad genera un incremento de la presión mecánica entre los discos intervertebrales y, al mismo tiempo, aumenta los niveles de citoquinas, adipoquinas y promueve el estado inflamatorio celular de bajo grado [85,247]. El tejido adiposo secreta adipoquinas que van a través del flujo sanguíneo y llegan hasta el tejido circundante del disco intervertebral, lo que contribuye a un estado de inflamación paulatino y crónico que afecta al estado del disco intervertebral [122]. Nuestros resultados revelan diferencias en los niveles de lipocalina-2 entre los grupos de anillo fibroso sano y degenerado, mostrando una disminución en estado degenerado. Sin embargo, cuando sometíamos a las células a un estímulo inflamatorio, como la IL-1 β , en todos los casos la expresión de esta adipoquina se veía aumentada. Estos hallazgos sugieren que las adipoquinas podrían ser un blanco terapéutico viable, dado el cambio en sus niveles asociado al estado patológico. Tanto las adipoquinas como

las citoquinas desempeñan un papel crucial en la degeneración discal, aunque aún no se ha definido completamente su función en esta enfermedad. Por lo tanto, esta tesis aborda la descripción de los niveles de algunas de estas moléculas y explora los efectos del tratamiento con leptina en estos tejidos por primera vez.

Es importante señalar que, además del incremento observado en algunas adipoquinas, se ha documentado un aumento en las metaloproteinasas en el disco intervertebral. Ambos factores podrían estar relacionados, ya que existe un estudio en células del anillo fibroso en discos de ratas, donde la estimulación con IL-1 β resultó en un aumento de los niveles de LCN2. Este aumento estuvo acompañado por la inhibición de la autodegradación de la MMP9, lo que desencadenó la degeneración de la matriz [109]. Este hallazgo plantea la reflexión sobre la relevancia del estudio de las adipoquinas en relación con el deterioro de la matriz.

Estudios previos han caracterizado la grelina por su capacidad de inhibir la vía de AKT en las células del núcleo pulposo [113]. En el marco de nuestra investigación, hemos logrado describir que los niveles de grelina, así como los de su antagonista endógeno (LEAP2), se encontraban disminuidos en las células del disco degenerado en comparación con las células en estado de salud. Este hallazgo sugiere una disminución en la función protectora de la grelina en este estado degenerado del disco. Sin embargo, cabe destacar que, a diferencia de lo que se había descrito previamente en las células del núcleo pulposo de conejo, el tratamiento con IL-1 β no provocó un aumento en los niveles de esta adipoquina [248], lo que sugiere diferencias en la regulación de estos factores entre especies.

Nuestros resultados no arrojaron diferencias entre los niveles de progranulina en estado sano con respecto al degenerado. A pesar de ello, se ha demostrado que la progranulina desempeña un papel protector en el disco intervertebral, antagonizando los efectos del TNF [249]. La deficiencia de progranulina conlleva niveles elevados de metaloproteinasas, lo que intensifica la degeneración de la matriz [117]. Estos hechos subrayan la relevancia de investigar a fondo algunas de estas adipoquinas, incluso si no se observan diferencias evidentes en los niveles basales entre discos sanos y degenerados. Es el caso de algunas adipoquinas estudiadas en esta tesis, cuyos niveles entre estado sano y degenerado no cambiaron: SERPINE2, NUCB2, RARRES2 y NAMPT. Estas citoquinas han sido previamente asociadas con un papel fisiopatológico en condrocitos, lo que suscita un genuino interés en su estudio, dada la similitud del perfil fisiopatológico con el tejido del disco intervertebral. Por ejemplo, en condrocitos, SERPINE2 ha sido descrita por su capacidad de inhibir la activación de las MMPs y ADAMTS

a través de la vía de ERK1/2/NF κ B [53]. Nuestros resultados determinaron que los niveles de SERPINE2 aumentaban cuando las células sanas y degeneradas eran estimuladas por IL-1 β , no mostrando sinergia ni aumentos significativos cuando se estimulaban con leptina.

Del mismo modo, en cultivos de adipocitos *in vitro*, se ha observado que la IL-1 β tiene la capacidad de elevar los niveles de quemerina [94]. Nuestros resultados han demostrado que este fenómeno se reproduce tanto en el disco intervertebral sano como en el degenerado. Se ha caracterizado a esta adipoquina por su función degradante de la matriz extracelular en el disco, lo que conduce a la liberación de mediadores inflamatorios dependientes de TLR4 y CMKLR1 [122]. Por otro lado, la visfatina también se ha correlacionado de manera positiva con el proceso de degeneración de disco, ya que participa en la degradación de la matriz bajo la influencia de la IL-1 β [104]. Como muestran nuestros resultados, los niveles de visfatina aumentan cuando se induce un estado inflamatorio con IL-1 β . Por el contrario, en el contexto de discos intervertebrales degenerados, los niveles de NUCB2 no presentaron cambios significativos tras la estimulación de las células con IL-1 β , leptina o su combinación.

Como hemos podido constatar, los niveles de LCN2 y GHRL/LEAP muestran una disminución en el contexto de la degeneración de disco, lo que sugiere de manera concluyente que desempeñan un papel relevante en el desarrollo de esta enfermedad. No obstante, se requiere una mayor información para poder describir de manera completa la función que desempeñan en estas células.

Tanto las adipoquinas generadas por la DDI como aquellas influenciadas por otros factores desempeñan un papel esencial en la fisiopatología de la enfermedad. A pesar de que la investigación ha arrojado luz sobre las interrelaciones entre las adipoquinas y los estados patológicos de la enfermedad, la complejidad de los mecanismos fisiopatológicos dificulta su identificación como contribuciones individuales. La comprensión de todos estos factores se vuelve de suma importancia para el futuro estudio de biomarcadores diagnósticos en las etapas iniciales de la enfermedad y para el desarrollo de terapias eficaces destinadas a la degeneración de disco intervertebral.

5.2 DISCUSIÓN: CAPÍTULO II. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ELF3 EN EL DISCO INTERVERTEBRAL HUMANO.

El segundo bloque experimental abordado en la presente tesis, se enfocó en investigar la expresión del factor de transcripción ELF3 en células y tejidos del disco intervertebral tanto sano como degenerado. ELF3, un miembro perteneciente a la familia de factores de transcripción ETS, que se expresa principalmente en las células epiteliales y desempeña un papel crucial en varios procesos celulares, incluida la diferenciación y la respuesta inflamatoria [250].

Los estudios previos sobre este factor de transcripción ofrecen una evidencia contundente sobre la presencia de una mayor cantidad de ELF3 en el cartílago humano afectado por artrosis en comparación con cartílago sano. Asimismo, ELF3 desempeña un papel significativo en la regulación de la expresión de citoquinas proinflamatorias en OA [153–157]. De hecho, nuestro grupo de investigación describió la interacción entre ELF3 y el factor de transcripción NFκB en la inducción de la expresión de la lipocalina-2, adipoquina proinflamatoria, tanto en condrocitos humanos como murinos [151]. Siendo capaces de revelar también la inducción sinérgica de ELF3 a través de la leptina y la IL-1β en modelos *in vitro* de cartílago artrósico [146].

La DDI comparte numerosas similitudes patológicas con la OA, particularmente en sus etapas avanzadas. Cuando examinamos la patología molecular de la DDI y la OA, notamos una superposición significativa. Esto incluye la expresión de mediadores inflamatorios como COX2, IL-6, IL-8, CCL3, IL-1β, TNFα y LCN2 [166,246,247]. Además, la expresión de factores catabólicos, específicamente MMP3, MMP13 y ADAMTS5, también muestra paralelismos significativos en ambas condiciones [166]. Las células del disco intervertebral con DDI y los condrocitos en el cartílago articular con OA, así como los macrófagos M1 en estas condiciones, mantienen un estado de inflamación de baja intensidad que conduce a la generación de citoquinas proinflamatorias como la IL-1β y el TNF [135,251].

En esta tesis, hemos sido capaces de describir, por primera vez, la presencia de ELF3 en tejidos y células de discos intervertebrales tanto sanos como degenerados. Observamos que su expresión viene incrementada en casos de degeneración de disco intervertebral, corroborando los resultados previamente reportados en el cartílago articular [150,152]. También resaltamos el notable aumento en la expresión del ARNm y la proteína de ELF3 en células de anillo fibroso en estado sano al ser estimuladas con LPS o IL-1α. Como se describió anteriormente, los

estímulos proinflamatorios pueden inducir la expresión de ELF3 en los condrocitos OA, lo que puede contribuir a la degradación y remodelación del cartílago en la OA al impulsar la expresión génica de la colagenasa y alterar el anabolismo de los condrocitos. Del mismo modo, de nuestros resultados podemos destacar que el factor de transcripción ELF3 es inducido por mediadores inflamatorios tanto en tejidos sanos como en tejidos patológicos de disco intervertebral. Por ende, el incremento en la expresión de ELF3 en células del anillo fibroso (AF) estimuladas por LPS, IL-1 α u otros estímulos, sugiere que este factor, activado tanto por la estimulación de TLR4 como por los receptores de citoquinas, podría desempeñar un papel en el desarrollo de la degeneración de disco intervertebral. Estos hallazgos, junto con la observación de que los niveles de proteína ELF3 se mantienen estables en células degeneradas independientemente de estímulos adicionales, sugieren que este factor posiblemente desempeñe un papel clave tanto en la aparición como en el desarrollo de la enfermedad degenerativa del disco intervertebral [146].

Considerando que ELF3 posee una clara modulación de su expresión inducida por agentes proinflamatorios, quisimos comprobar su modulación farmacológica mediante el uso de glucocorticoides clásicos como la dexametasona. El tratamiento con este antiinflamatorio, a células del disco intervertebral estimuladas con IL-1 α , resultó en una marcada disminución en la expresión de ELF3. Estos datos están en línea con los datos publicados anteriormente sobre el papel de ELF3 en la degeneración de cartílago articular [146].

En la literatura, ha sido descrito que ELF3 es capaz de controlar los promotores transcripcionales y la expresión génica de NOS2, COX2 y MMP13 [153]. El factor de transcripción ELF3 desencadena la activación de la enzima MMP13 y al mismo tiempo suprime la transcripción del gen COL2A1 en el tejido cartilaginoso. Este mecanismo ejerce un papel crítico en el proceso de catabolismo del cartílago [252,253]. En investigaciones previas realizadas en nuestro grupo, ya se ha reportado un aumento de la expresión de LCN2 en condrocitos que sobreexpresaban el gen ELF3 y que además eran tratados con IL-1 α en comparación con las células tratadas únicamente con IL-1 α [151]. Por el contrario, cuando el gen ELF3 fue silenciado, se observó una disminución en la expresión de LCN2 [151]. Basándonos en estos descubrimientos previos, nuestro estudio actual aporta una novedosa evidencia que demuestra que la sobreexpresión de ELF3 también induce la expresión de ARNm de factores catabólicos e inflamatorios como MMP13, MMP3, MMP9, ADAMTS5, IL-6, LCN2 y PTGS2 en células de disco intervertebral degenerado y sano. Además, la

sobreexpresión de ELF3 aumentó aún más la ya elevada expresión de ARNm de MMP13, MMP3, MMP9, ADAMTS5, IL-6 y LCN2 en células de disco intervertebral degenerado y sanas estimuladas por IL-1 α . Estos descubrimientos sugieren el posible papel de este factor de transcripción en los procesos inflamatorios y degenerativos asociados con la enfermedad degenerativa del disco intervertebral. De hecho, en la DDI, las MMPs y ADAMTS se destacan como los principales agentes que median la degradación de la matriz extracelular. Se ha descrito que muchas de estas enzimas proteolíticas experimentan un marcado incremento en su expresión tanto en la DDI como en la OA [166,254,255]. En nuestro estudio, indagamos el papel desempeñado por ELF3 en la regulación de la transcripción de diversas enzimas, incluyendo una colagenasa (MMP13), una gelatinasa (MMP9), una estromelina (MMP3) y una agrecanasa (ADAMTS5), encontrando que todas ellas experimentan un aumento de su expresión inducido por ELF3. Estos resultados indican una actividad procatabólica de ELF3 que puede contribuir potencialmente a la remodelación y degradación de la matriz extracelular. Ya se describió con anterioridad que ELF3 activa la transcripción de MMP13 mediante la unión a un sitio ETS conservado en la región promotora proximal de dicho gen [156]. Además, la interacción entre ELF3 y el promotor de MMP13 situado en las proximidades se intensifica cuando los condrocitos se estimulan con IL-1 β . [156].

Otras metaloproteinasas como MMP9, han sido descritas por desempeñar un papel relevante en las células del disco intervertebral [109,256]. Zigouris *et al.* describieron una correlación significativa entre la expresión de MMP9 y los niveles de deterioro histológico en los tejidos del disco intervertebral, lo que sugiere que MMP9 podría estar implicada en los procesos relacionados con la DDI [256]. Además, se ha establecido una asociación con otras MMPs, como la MMP3, y la progresión de la enfermedad degenerativa del disco intervertebral [257]. Los estudios demuestran que la estimulación de las células del núcleo pulposo con IL-1 β induce una regulación al alza en la expresión de MMP3, en concordancia con nuestros hallazgos relacionados con la estimulación de IL-1 α [257].

Existen estudios que plantean la hipótesis de que ADAMTS5 desempeña un papel relevante en la degradación de los componentes de la matriz extracelular en el disco intervertebral, lo que puede debilitar su estabilidad estructural [258]. En un modelo *in vivo* de DDI, mediante punción anular en conejos, se observó que la supresión de ADAMTS5 condujo a una reducción efectiva de la degeneración discal, lo cual plantea que ADAMTS5 pueda ser considerado como una diana terapéutica para tratar la DDI [259]. Además, se ha observado un aumento en la expresión

de ADAMTS5 en los discos intervertebrales con hernia en pacientes humanos, lo que sugiere su implicación en el proceso degenerativo de la DDI. Asimismo, se ha documentado que ADAMTS5 experimenta un aumento en su expresión en las células del disco intervertebral estimuladas por IL-1 β , lo cual concuerda con los resultados presentados en este estudio [258]. Hasta donde sabemos, mostramos por primera vez que la sobreexpresión de ELF3 tiende a aumentar la expresión de ADAMTS5 en células de disco intervertebral sano y degenerado.

Por otro lado, nuestros hallazgos nos permiten resaltar no solo el papel procatabólico de ELF3, sino que también describen el papel proinflamatorio del mismo. Esto se observa en el aumento significativo de factores proinflamatorios como IL-6, LCN2 y PTGS2 en células de AF sano y degenerado cuando se sometían a la sobreexpresión del gen ELF3. Hallazgos recientes demuestran que ELF3 también desempeña un papel significativo en la sinergia entre IL-17 y TNF en fibroblastos sinoviales [260]. En estos fibroblastos ha sido descrito que algunos de los genes regulados por I κ B dependen de ELF3. Debido a esto, la inducción de ELF3 podría ser una vía de activación colaborativa, en la que ELF3 sería capaz de cooperar con AP-1 y NF κ B para prolongar la producción de mediadores inflamatorios.

La obesidad, es uno de los factores con mayor riesgo para la DDI, no solamente por el estrés mecánico que genera, sino también por los niveles elevados de citoquinas y adipoquinas que el tejido adiposo blanco libera. Por esta razón, esta condición agrava el estado inflamatorio celular [85,247]. Previamente, nuestro grupo describió que la leptina, adipoquina con propiedades proinflamatorias, podía interactuar con la IL-1 β para la inducción del gen ELF3 en condrocitos humanos [146]. En nuestros resultados, resultó un hallazgo inesperado no observar esta respuesta sinérgica de la leptina y la interleuquina, ni en células sanas ni degeneradas. Este comportamiento, fue demostrado no sólo para el gen ELF3, sino también en la expresión de varias citoquinas proinflamatorias (como NOS2, COX2 e IL-6) y adipoquinas (como LCN2) [261]. Podemos afirmar que la sinergia entre la leptina y la IL-1 β depende de la presencia del receptor de leptina [146], debido a ello investigamos los niveles de expresión del receptor en células de disco sanas y degeneradas, observando que no había diferencias de expresión en ninguna de las dos condiciones. Sin embargo, destacamos una expresión significativamente mayor en los niveles de expresión de leptina en células sanas de AF con respecto a las degeneradas. Esta disminución de la expresión de leptina en células degeneradas podría deberse a la disfunción celular asociada al proceso degenerativo característico de la DDI. Aunque en nuestro estudio no observamos diferencias en el receptor, cabe destacar que en ratones

silenciados para el gen del receptor de la leptina, se desarrollan alteraciones en la columna vertebral y cambios celulares en las células notocordales, implicando ello su importante rol en la proliferación y diferenciación de las células de disco, lo que nos sugiere su implicación en el disco intervertebral [101], y aún estaría por determinar si los niveles de leptina están relacionados con dicho proceso. Cabe destacar que la presencia de leptina circulante y en el tejido puede afectar a la homeostasis del disco intervertebral, actuando a través del receptor de leptina o bien mediante otras citoquinas que son inducidas por la propia leptina [98,262]. También se ha descrito que la leptina está implicada en la expresión de diferentes metaloproteinasas, como MMP3 y MMP9 [99]. Asimismo, se observó un incremento de MMP7, MMP11 y TNF α en las células de AF, mientras que en las células de NP se registró un aumento en la expresión de agrecanasas, IL-6 y TNF α [99].

Estos hechos son concordantes con lo que ya se había descrito en líquido sinovial de personas con artrosis, mostrando una relación directa entre los niveles de MMP1 y MMP3. En estos casos, la exposición a la leptina por sí sola, así como en combinación con el estímulo inflamatorio IL-1 β , provocó un aumento en los niveles de MMP1, MMP3 y MMP13 [100]. No obstante, nuestro estudio no pudo corroborar la similitud fisiopatológica del cartílago articular y el disco intervertebral en cuanto a la expresión de ELF3, ya que no produjo una sinergia junto con el factor proinflamatorio IL-1 β , pero el conjunto de todos estos nuevos descubrimientos amplía nuestro entendimiento sobre el papel de ELF3 en la DDI, resaltando su contribución en los procesos inflamatorios y degenerativos. En un futuro, podríamos apuntar a ELF3 como una ruta prometedora para intervenciones terapéuticas de la DDI. Futuras investigaciones serán fundamentales para la adquisición de un entendimiento completo de los mecanismos precisos que regulan ELF3.

5.3 DISCUSIÓN: CAPÍTULO III. OLEOCANTHAL

En la actualidad no existen opciones de tratamiento curativo para abordar la degeneración del disco intervertebral. La principal estrategia terapéutica se centra en el empleo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos o corticoides, dirigidos a aliviar los síntomas. A pesar de ello, ninguno de los medicamentos utilizados ha logrado prevenir la progresión de la degeneración discal. La ausencia de fármacos que puedan alterar estos procesos catabólicos en el disco intervertebral subraya la necesidad de hallar nuevas terapias capaces de modificar la evolución de la degeneración y, en su caso, revertir la enfermedad del disco intervertebral.

Una terapia preventiva, alternativa y/o complementaria a estos medicamentos son los denominados "nutracéuticos". En líneas generales, los nutracéuticos son sustancias naturales presentes frecuentemente en alimentos (comúnmente denominados alimentos "funcionales") que, al ser consumidos en dosis específicas, pueden ofrecer beneficios para la salud, incluso en la prevención y/o tratamiento de enfermedad [180].

Existen estudios que muestran la posibilidad de contrarrestar la degeneración sintomática del disco intervertebral, especialmente en fases tempranas de la enfermedad, mediante la ingesta de suplementos alimenticios como la glucosamina y el condroitín sulfato [183]. Además, se ha observado que la inclusión de otras sustancias naturales, como el ácido graso omega-3, en suplementos alimentarios, muestra indicios de tener efectos protectores contra la degeneración de disco intervertebral, según estudios en modelo animal de rata [184].

En este contexto de investigación sobre la salud y la alimentación, es fundamental destacar el papel trascendental que el aceite de oliva virgen extra ha desempeñado en la dieta mediterránea a lo largo de la historia, destacándose por sus notables beneficios para la salud. A lo largo de los siglos, la *Olea europea L.* ha proporcionado una amplia variedad de compuestos fenólicos que han capturado la atención de la comunidad científica por su potencial terapéutico. Numerosos compuestos fenólicos obtenidos del AOVE son considerados componentes nutracéuticos clave en la dieta mediterránea. Estos compuestos exhiben propiedades beneficiosas, incluyendo actividades antiinflamatorias, antioxidantes y antitrombóticas.

Uno de estos compuestos, el oleocanthal, ha emergido en los últimos años como un agente terapéutico prometedor contra diversas enfermedades, demostrando su potencial farmacológico [186–189]. Alrededor del 10% de la composición fenólica del AOVE corresponde al

oleocanthal. Este modesto porcentaje presente en el AOVE ha sido descrito por jugar un papel en procesos inflamatorios, cancerígenos, neurodegenerativos y en enfermedades musculoesqueléticas [186–189]. El uso de compuestos fenólicos administrados a largo plazo ha demostrado tener beneficios sustanciales para la regulación de enfermedades inflamatorias [263].

El último bloque experimental de esta tesis ha sido dirigido al estudio de los posibles efectos farmacológicos del oleocanthal en células de disco intervertebral. Esta molécula de estructura fenólica, extraída del aceite de oliva virgen extra, fue probada por nuestro grupo de investigación en las células de cartílago demostrando un potente efecto antiinflamatorio. Sin embargo, sus efectos no habían sido estudiados previamente en células de disco intervertebral.

Nuestros resultados revelan, por primera vez, la capacidad del oleocanthal para reducir tanto la respuesta inflamatoria como la catabólica en células humanas de disco intervertebral degenerado estimuladas con LPS o IL-1 α . En el ámbito de enfermedades como la artrosis, nuestro grupo de investigación identificó el oleocanthal como un posible tratamiento, demostrando efectos tanto en los condrocitos como en las células del sistema inmunitario innato, como los macrófagos [197,199,218]. Estas investigaciones previas de nuestro grupo confirmaron el efecto antiinflamatorio del oleocanthal en células primarias de cartílago de pacientes con artrosis estimuladas con LPS [199]. Además, se pudo identificar que esta sustancia actúa como inhibidora de la NOS2, una enzima crucial en el proceso inflamatorio. Junto con este hallazgo, se pudo describir cómo el oleocanthal era capaz de reducir otros factores proinflamatorios como COX2, IL-6, IL-8, CCL3, LCN2 y TNF α [199]. Las propiedades anti-catabólicas del oleocanthal también fueron evaluadas por nuestro grupo en células de condrocito humano, describiendo la capacidad del oleocanthal para suprimir la respuesta de IL-1 α con respecto a la expresión de los genes MMP13 y ADAMTS5 [199]. Aparte de sus efectos en condrocitos, se probó su eficacia en la inmunidad innata mediante el estudio de macrófagos J774A.1. Los resultados obtenidos en esta línea celular fueron consistentes con los observados en condrocitos, siendo capaz de disminuir la expresión de mediadores proinflamatorios como IL-6, MIP-1 α , IL-1 β y TNF α , además del factor GM-CSF [218].

Como se ha señalado previamente en esta tesis, es importante destacar que la degeneración del disco intervertebral comparte numerosas similitudes con el proceso degenerativo observado en la artrosis. En ambos casos, la degeneración del disco se caracteriza por la pérdida de espacio

articular, la esclerosis subcondral y la formación de osteofitos, de manera análoga a la progresión observada en la artrosis articular. Existen múltiples estudios que comparan la patología molecular de la degeneración de disco y la artrosis, revelando la presencia de factores inflamatorios característicos como la IL-6, IL-8, CCL3, LCN2 y COX2. Cabe destacar también, que la similitud en la expresión de factores catabólicos, como son MMP3, MMP13 y ADAMTS5 [166]. Además, los estados patológicos tanto del disco intervertebral, como del cartílago articular en la artrosis, vienen caracterizados por la producción celular continuada de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β y TNF α , siendo también los macrófagos M1 responsables de esta producción [135,251], por lo que nuestros datos sugieren que el oleocanthal podría ser efectivo en la regulación de los procesos fisiopatológicos que ocurren en ambas enfermedades.

También es digno de mención que en nuestra investigación no detectamos efectos citotóxicos del oleocanthal en las células de disco intervertebral degenerado, a las concentraciones de 1 a 5 μ M. Este descubrimiento fue concordante con los datos obtenidos en investigaciones anteriores sobre la citotoxicidad en células de condrocitos humanos y en macrófagos humanos y murinos [197,218,264]. Cabe señalar que, nuestros resultados demuestran que el oleocanthal ejerce su efecto independientemente del estímulo inflamatorio, en nuestro caso, LPS e IL-1 α . En el contexto de la enfermedad de DDI y OA, los receptores TLRs sufren un aumento en su expresión y su activación conlleva al aumento de producción de varias citoquinas proinflamatorias [171,265]. En nuestro estudio describimos la capacidad del oleocanthal para suprimir la respuesta inflamatoria de tres factores inflamatorios relevantes (IL-6, NOS2 y ELF3) activados por TLR4, incluso con la dosis más baja de 1 μ M. Por otro lado, demostramos la capacidad del oleocanthal para mitigar la expresión de mediadores catabólicos como MMPs y ADAMTS5, genes que también se expresan tras la estimulación de TLR4. Asimismo, corroboramos la capacidad del oleocanthal para reducir la expresión de dichos genes cuando las células eran estimuladas con IL-1 α , en este caso siendo sólo la concentración más alta (5 μ M) la que mostró una actividad antiinflamatoria y anticatabólica significativa. Podríamos atribuir este resultado a la mayor estimulación inflamatoria causada por la IL-1 α en comparación con el LPS. Cabe destacar que la IL-1 α también ha sido previamente identificada como sobreexpresada en discos intervertebrales degenerados en comparación con los sanos [43].

La activación de ambos receptores, el receptor TLR4 y el receptor 1 de la interleuquina-1 (IL-1R1), desencadena una cadena de señalización intracelular que implica la activación de factores de transcripción clave en las respuestas inflamatorias y degenerativas [266]. En nuestro

estudio, analizamos el efecto del oleocanthal en la vía de NF κ B, factor de transcripción que está ampliamente reconocido como un mediador fundamental en la inflamación y respuesta inmunológica [162]. Nuestros resultados mostraron que el OC es capaz de bloquear la fosforilación de la subunidad p65 de NF κ B también conocida como RelA, y su posterior activación en las células de disco degenerado. Esta inhibición de la vía conlleva la reducción de la transcripción de genes inflamatorios, tales como IL-6, NOS2, ELF3, MMP3, MMP13 y ADAMTS5, lo que a su vez disminuiría de manera significativa los procesos inflamatorios en las células del disco degenerado. Es digno de mención que la supresión simultánea de los factores de transcripción NF κ B y ELF3 tiene una relevancia particular, dado que se ha documentado su colaboración en la regulación de respuestas proinflamatorias en las células del disco intervertebral y el cartílago articular [151,267].

La capacidad de varios nutraceuticos para inhibir la señalización de NF κ B, ha sido ampliamente estudiada, sugiriendo el posible uso de los mismos asociadas a procesos inflamatorios mediados por esta vía, como es el caso del resveratrol, los polifenoles, alcaloides, terpenoides, taninos e incluso algunos ácidos grasos monoinsaturados [268]. En los últimos años, las propiedades del oleocanthal han despertado el interés de numerosos investigadores. Nuestro grupo de investigación, con sus investigaciones previas en cartílago y con las presentadas en esta tesis, ha logrado respaldar el valor del oleocanthal como una molécula prometedora para la prevención y tratamiento de trastornos inflamatorios y degenerativos como es la degeneración de disco intervertebral. Es fundamental resaltar que investigaciones recientes han revelado que el oleocanthal exhibe notables efectos antioxidantes, antiinflamatorios e inmunomoduladores en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratones cuando se administra como parte de la alimentación. Estos resultados sugieren que el oleocanthal podría constituir una innovadora herramienta dietética en la lucha contra trastornos inflamatorios, incluyendo la artritis reumatoide y otras afecciones musculoesqueléticas.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio claramente señalan la viabilidad del oleocanthal como un posible tratamiento para la degeneración de disco intervertebral. No obstante, para consolidar y profundizar en la comprensión de las posibilidades terapéuticas del OC, será esencial llevar a cabo investigaciones adicionales en el futuro, incorporando estudios *in vivo*.

Conclusiones / Conclusions

6 CONCLUSIONES

1. El perfil metabolómico del disco degenerado con respecto al disco sano mostró niveles disminuidos de triglicéridos, diacilgliceroles, fosfatidilinositoles, fosfatidilcolinas y esfingomielinas, así como algunas adipoquinas, como LCN2 y LEAP/GHRL, que podrían ser una diana para el tratamiento de la enfermedad.
2. El tratamiento con leptina no tiene efectos significativos en los genes inflamatorios estudiados. La leptina junto con la interleuquina no produce sinergia en la expresión de genes inflamatorios.
3. La expresión del gen ELF3 depende del estado patológico del tejido, siendo mayor en disco degenerado.
4. La IL-1 α induce la expresión de ELF3 en células de disco.
5. La leptina y la interleuquina no producen sinergia en la expresión del gen de ELF3 en disco.
6. La dexametasona disminuye la expresión del gen de ELF3 en disco.
7. La sobreexpresión del gen ELF3 aumenta la expresión de genes inflamatorios IL-6, PTGS2 y NOS2 y genes degradadores de la matriz como MMP3, -9 y -13 y ADAMTS5 tanto en células sanas como degeneradas.
8. El silenciamiento del gen ELF3 parece disminuir la expresión de los genes inflamatorios IL-6, PTGS2, NOS2 y de degradación MMP3, -9 y -13.
9. Oleocanthal es capaz de regular el gen ELF3 en disco degenerado, así como otros genes proinflamatorios (IL-6, NOS2, PTGS2) y de degradación (MMP13), en células de disco intervertebral degenerado estimuladas tanto con LPS como con IL-1 α .
10. La fosforilación de p65 puede ser regulada por oleocanthal en células de disco intervertebral degenerado estimuladas con LPS o IL-1 α .

7 CONCLUSIONS

1. The metabolomic profile of the degenerated disc compared to the healthy disc showed decreased levels of triglycerides, diacylglycerols, phosphatidylinositols, phosphatidylcholines, and sphingomyelins, as well as certain adipokines such as LCN2 and LEAP/GHRL, which could serve as a target for disease treatment.
2. Leptin treatment does not have significant effects on the studied inflammatory genes. Leptin, in combination with interleukin, does not induce synergy in the expression of inflammatory genes.
3. The expression of the ELF3 gene depends on the pathological state of the tissue, being higher in the degenerated disc.
4. IL-1 α induces ELF3 expression in disc cells.
5. Leptin and interleukin do not induce synergy in the expression of the ELF3 gene in disc.
6. Dexamethasone reduces the expression of the ELF3 gene in disc.
7. Overexpression of the ELF3 gene increases the expression of inflammatory genes IL-6, PTGS2, NOS2, and matrix-degrading genes such as MMP3, -9, and -13, as well as ADAMTS5, in both healthy and degenerated cells.
8. Silencing of the ELF3 gene appears to decrease the expression of inflammatory genes IL-6, PTGS2, NOS2, and degradation genes MMP3, -9, and -13.
9. Oleocanthal is capable of regulating the ELF3 gene in degenerated discs, as well as other proinflammatory genes (IL-6, NOS2, PTGS2) and degradation-related genes (MMP13), in intervertebral disc cells stimulated with both LPS and IL-1 α .
10. Phosphorylation of p65 can be regulated by oleocanthal in degenerated intervertebral disc cells stimulated with LPS or IL-1 α .

Abreviaturas

8 ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
ADAMTS1	Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 1
ADAMTS2	Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 2
ADAMTS3	Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 3
ADAMTS4	Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 4
ADAMTS5	Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 5
ADAMTS13	Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 13
ADAMTS14	Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 14
ADAMTS15	Desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina 15
AF	Anillo fibroso
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AKT	Proteína quinasa AKT / Proteína quinasa B
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
ApoE	Apolipoproteína E
ARNi	Ácido Ribonucleico de interferencia
AP-1	Factor de activación de proteínas 1
BA	Ácidos biliares
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina sérica bovina
Carb acids	Ácidos carboxílicos
CCL1	Ligando 1 de quimiocina
CCL2	Ligando 2 de quimioquina /proteína quimioatrayente de monocitos 1
CCL3	Ligando 3 de quimiocina
CCL5	Ligando 5 de quimiocina
CCL11	Ligando 11 de quimiocina
CCL20	Ligando 20 de quimiocina
CCR6	Receptor del ligando 6 de quimiocina
CEP	Placas terminales cartilaginosas

Cer	Ceramidas
Cho	Colesterol
CHO	Carbohidratos
ChoE	Ésteres de colesterol
CMH	Monohexosilceramidas
CMKLR1	Receptor tipo quimiocina 1
COL1A1	Colágeno tipo I, alfa 1
COL2A1	Colágeno tipo II, alfa 1
COL9A2	Colágeno tipo IX, alfa 2
COL11A1	Colágeno tipo XI, alfa 1
COX1	Ciclooxigenasa 1
COX2	Ciclooxigenasa 2
CXCL8	Ligando de quimiocina con motivo C-X-C 8
CXCL12	Ligando de quimiocina con Motivo C-X-C 12
CXCR4	Receptor 4 de quimiocinas con motivos C-X-C
c-Met	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos c-Met
DAPC	Diacilglicerolfosfolinas
DAPE	Diacilglicerolfosfoetanolaminas
DDI	Degeneración de disco intervertebral
DG	Diglicéridos
DX	Dexametasona
ECM	Matriz extracelular
ELF3	Epithelium-specific ETS transcription factor 3
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERK1/2	Vía de señalización regulada por quinasas extracelulares 1/2
FA	Ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FOXO	Factores de transcripción "Forkhead Box O"
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GEP	Precursor de epitelina granulina
GHRL	Grelina

GHS-R	Receptor secretagogo de la hormona del crecimiento
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GLT1	Transportador de glutamina
GLUT1	Transportador de glucosa
GPR55	Receptor acoplado a proteína G 55
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN γ	Interferón gamma
IKKs	Quinasas inhibitorias del factor kappa B
IL-1	Interleuquina 1
IL-1 α	Interleuquina 1 alfa
IL-1 β	Interleuquina 1 beta
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IL-13	Interleuquina 13
IL-17	Interleuquina 17
IL-1R1	Receptor 1 de la Interleuquina-1
LCN2	Lipocalina-2
LPC	Lisofosfatidilcolinas
LEAP2	Péptido antimicrobiano expresado en el hígado-2
LepR	Receptor de leptina
LPE	Lisofosfatidiletanolaminas
LPI	Lisofosfatidilinositoles
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LRP1	Lipoproteína LDL
MAPC	1 o 2 monoacilglicerofosfocolinas
MAPE	1 o 2 monoacilglicerofosfoetanolaminas
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
MEMAPC	1-éter, 2-acilglicerofosfocolinas

MEMAPE	1-éter, 2-acilglicerofosfoetanolaminas
MEPC	1-monoeterglicerofosfocolinas
MEPE	1-monoeterglicerofosfoetanolaminas
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa
MMP1	Metaloproteinasa de matriz 1
MMP2	Metaloproteinasa de matriz 2
MMP3	Metaloproteinasa de matriz 3
MMP7	Metaloproteinasa de matriz 7
MMP8	Metaloproteinasa de matriz 8
MMP9	Metaloproteinasa de matriz 9
MMP11	Metaloproteinasa de matriz 11
MMP13	Metaloproteinasa de matriz 13
MMP14	Metaloproteinasa de matriz 14
MMP17	Metaloproteinasa de matriz 17
MMP18	Metaloproteinasa de matriz 18
MMP19	Metaloproteinasa de matriz 19
MMP24	Metaloproteinasa de matriz 24
MMP25	Metaloproteinasa de matriz 25
MMP26	Metaloproteinasa de matriz 26
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos
MTT	4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NAE	N-acil etanolaminas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAMPT	Nicotinamida fosforribosil transferasa
NF κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintasa 2
NP	Núcleo pulposo
Ns	Nucleósidos

NUCB2	Nucleobindina-2
OA	Artrosis
OC	Oleocanthal
OPLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales
PC	Fosfatidilcolinas
PCA	Análisis de componentes principales
PCDGF	Factor de crecimiento derivado de células PC
PE	Fosfatidiletanolaminas
PGRN	Progranulina
PI	Fosfatidilinositoles
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKP-1	Proteína quinasa fosfatasa-1
PN-1	Proteasa nexin-1
PPARs	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RARRES2	Proteína reactiva 2 del receptor del ácido retinoico
SDF-1	Factor 1 derivado de células estromales
SEM	Error estándar de la media
SERPINE2	Miembro 2 de la familia de las serpinas E
SFA	Ácidos grasos saturados
s-GAG	Glucosaminoglicanos sulfatados
SM	Esfingomielinas
SOX9	Factor de transcripción SRY (Sex Determining Region Y)-Box 9
STAT1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TIG2	Gen 2 inducido por tazarotina
TG	Triglicéridos
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TLR9	Receptor tipo Toll 9

TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRADD	Dominio del receptor de TNF Asociado a la vía de muerte
TRPA1	Receptor transitorio, subfamilia A, miembro 1
TRAF2	Factor asociado a receptor de TNF 2
UHPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución – espectrometría de masas
VDR	Receptor de la vitamina D
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares 1

Bibliografía

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Drake, R.L.; Vogl, A.W.; Mitchell, A.M.W. *Gray. Anatomía para estudiantes*; Elsevier Health Sciences, 2020; ISBN 9788491138167.
2. Francisco, V.; Pino, J.; González-Gay, M.Á.; Lago, F.; Karppinen, J.; Tervonen, O.; Mobasher, A.; Gualillo, O. A new immunometabolic perspective of intervertebral disc degeneration. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2022**, *18*, 47–60, doi:10.1038/s41584-021-00713-z.
3. Sun, Z.; Liu, B.; Luo, Z.-J. The Immune Privilege of the Intervertebral Disc: Implications for Intervertebral Disc Degeneration Treatment. *Int. J. Med. Sci.* **2020**, *17*, 685–692, doi:10.7150/ijms.42238.
4. Tendulkar, G.; Chen, T.; Ehnert, S.; Kaps, H.-P.; Nüssler, A.K. Intervertebral Disc Nucleus Repair: Hype or Hope? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20153622.
5. Sivakamasundari, V.; Lufkin, T. Bridging the Gap: Understanding Embryonic Intervertebral Disc Development Sivakamasundari. *Cell Dev. Biol.* **2012**, *1*, 339–351.
6. Cortes, D.H.; Elliott, D.M. The Intervertebral Disc: Overview of Disc Mechanics BT - The Intervertebral Disc: Molecular and Structural Studies of the Disc in Health and Disease. In; Shapiro, I.M., Risbud, M. V, Eds.; Springer Vienna: Vienna, 2014; pp. 17–31 ISBN 978-3-7091-1535-0.
7. Huang, Y.-C.; Urban, J.P.G.; Luk, K.D.K. Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way? *Nat. Rev. Rheumatol.* **2014**, *10*, 561–566, doi:10.1038/nrrheum.2014.91.
8. Kirnaz, S.; Capadona, C.; Wong, T.; Goldberg, J.L.; Medary, B.; Sommer, F.; McGrath, L.B.; Härtl, R. Fundamentals of Intervertebral Disc Degeneration. *World Neurosurg.* **2022**, *157*, 264–273, doi:10.1016/j.wneu.2021.09.066.
9. Liang, H.; Luo, R.; Li, G.; Zhang, W.; Song, Y.; Yang, C. The Proteolysis of ECM in Intervertebral Disc Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23031715.
10. Jones, J.L.; Walker, R.A. Integrins: A role as cell signalling molecules. *J. Clin. Pathol. - Mol. Pathol.* **1999**, *52*, 208–213, doi:10.1136/mp.52.4.208.
11. Shoulders, M.D.; Raines, R.T. Collagen Structure and Stability. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 929–958, doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
12. Eyre, D.R.; Matsui, Y.; Wu, J.-J. Collagen polymorphisms of the intervertebral disc. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 844–848, doi:10.1042/bst0300844.

13. Sivan, S.S.; Hayes, A.J.; Wachtel, E.; Caterson, B.; Merkher, Y.; Maroudas, A.; Brown, S.; Roberts, S. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. *Eur. Spine J.* **2014**, *23*, 344–353, doi:10.1007/s00586-013-2767-8.
14. Caldeira, J.; Santa, C.; Osório, H.; Molinos, M.; Manadas, B.; Goncalves, R.; Barbosa, M. Matrisome Profiling during Intervertebral Disc Development and Ageing. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–15, doi:10.1038/s41598-017-11960-0.
15. Hayes, A.J.; Benjamin, M.; Ralphs, J.R. Role of actin stress fibres in the development of the intervertebral disc: Cytoskeletal control of extracellular matrix assembly. *Dev. Dyn.* **1999**, *215*, 179–189, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199907)215:3<179::AID-AJA1>3.0.CO;2-Q.
16. Antoniou, J.; Goudsouzian, N.M.; Heathfield, T.F.; Winterbottom, N.; Steffen, T.; Poole, A.R.; Aebi, M.; Alini, M. The human lumbar endplate: Evidence of changes in biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, aging, and degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **1996**, *21*, 1153–1161, doi:10.1097/00007632-199605150-00006.
17. Wang, W.-J.; Yu, X.-H.; Wang, C.; Yang, W.; He, W.-S.; Zhang, S.-J.; Yan, Y.-G.; Zhang, J. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *448*, 238–246, doi:https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.06.023.
18. Melrose, J.; Tammi, M.; Smith, S. Visualisation of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins within ovine vertebral cartilages using biotinylated aggrecan G1-link complex and biotinylated hyaluronan oligosaccharides. *Histochem. Cell Biol.* **2002**, *117*, 327–333, doi:10.1007/s00418-002-0392-4.
19. Rodriguez, E.; Roughley, P. Link protein can retard the degradation of hyaluronan in proteoglycan aggregates. *Osteoarthr. Cartil.* **2006**, *14*, 823–829, doi:10.1016/j.joca.2006.02.008.
20. Roughley, P.J.; Melching, L.I.; Heathfield, T.F.; Pearce, R.H.; Mort, J.S. The structure and degradation of aggrecan in human intervertebral disc. *Eur. Spine J.* **2006**, *15*, 326–332, doi:10.1007/s00586-006-0127-7.
21. Watanabe, H.; Yamada, Y.; Kimata, K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J. Biochem.* **1998**, *124*, 687–693, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022166.

22. Sztrolovics, R.; Grover, J.; Cs-Szabo, G.; Shi, S.L.; Zhang, Y.; Mort, J.S.; Roughley, P.J. The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. *J. Orthop. Res.* **2002**, *20*, 257–266, doi:10.1016/S0736-0266(01)00110-3.
23. Kinsella, M.G.; Fischer, J.W.; Mason, D.P.; Wight, T.N. Retrovirally mediated expression of decorin by macrovascular endothelial cells. Effects on cellular migration and fibronectin fibrillogenesis in vitro. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13924–13932, doi:10.1074/jbc.275.18.13924.
24. Hayes, A.J.; Smith, S.M.; Gibson, M.A.; Melrose, J. Comparative Immunolocalization of the Elastin Fiber–Associated Proteins Fibrillin-1, LTBP-2, and MAGP-1 With Components of the Collagenous and Proteoglycan Matrix of the Fetal Human Intervertebral Disc. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2011**, *36*.
25. Yu, J.; Tirlapur, U.; Fairbank, J.; Handford, P.; Roberts, S.; Winlove, P.C.; Cui, Z.; Urban, J. Microfibrils, elastin fibres and collagen fibres in the human intervertebral disc and bovine tail disc. *J. Anat.* **2007**, *210*, 460–471, doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00707.x.
26. Frymoyer, J.W.; Cats-Baril, W.L. An Overview of the Incidences and Costs of Low Back Pain. *Orthop. Clin. North Am.* **1991**, *22*, 263–271, doi:https://doi.org/10.1016/S0030-5898(20)31652-7.
27. Ferreira, M.L.; de Luca, K.; Haile, L.M.; Steinmetz, J.D.; Culbreth, G.T.; Cross, M.; Kopec, J.A.; Ferreira, P.H.; Blyth, F.M.; Buchbinder, R.; et al. Global, regional, and national burden of low back pain, 1990–2020, its attributable risk factors, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Rheumatol.* **2023**, *5*, e316–e329, doi:10.1016/S2665-9913(23)00098-X.
28. Geurts, J.W.; Willems, P.C.; Kallewaard, J.-W.; van Kleef, M.; Dirksen, C. The Impact of Chronic Discogenic Low Back Pain: Costs and Patients’ Burden. *Pain Res. Manag.* **2018**, *2018*, 4696180, doi:10.1155/2018/4696180.
29. Alonso-García, M.; Sarría-Santamera, A. The Economic and Social Burden of Low Back Pain in Spain: A National Assessment of the Economic and Social Impact of Low Back Pain in Spain. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2020**, *45*, E1026–E1032, doi:10.1097/BRS.0000000000003476.

30. Vos, T.; Allen, C.; Arora, M.; Barber, R.M.; Brown, A.; Carter, A.; Casey, D.C.; Charlson, F.J.; Chen, A.Z.; Coggeshall, M.; et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **2016**, *388*, 1545–1602, doi:10.1016/S0140-6736(16)31678-6.
31. Global, regional, and national burden of low back pain, 1990-2020, its attributable risk factors, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet. Rheumatol.* **2023**, *5*, e316–e329, doi:10.1016/S2665-9913(23)00098-X.
32. Diwan, A.D.; Melrose, J. Intervertebral disc degeneration and how it leads to low back pain. *JOR spine* **2023**, *6*, e1231, doi:10.1002/jsp2.1231.
33. Rodrigues, L.M.R.; Oliveira, L.Z. de; Silva, M. de B.R. da; Accardo, C. de M.; Giglio, A.B. Del; Pinhal, M.A. da S. Inflammatory biomarkers in sera of patients with intervertebral disc degeneration. *Einstein (Sao Paulo)*. **2019**, *17*, eAO4637, doi:10.31744/einstein_journal/2019AO4637.
34. Mohd Isa, I.L.; Mokhtar, S.A.; Abbah, S.A.; Fauzi, M.B.; Devitt, A.; Pandit, A. Intervertebral Disc Degeneration: Biomaterials and Tissue Engineering Strategies toward Precision Medicine. *Adv. Healthc. Mater.* **2022**, *11*, e2102530, doi:10.1002/adhm.202102530.
35. Binch, A.L.A.; Fitzgerald, J.C.; Growney, E.A.; Barry, F. Cell-based strategies for IVD repair: clinical progress and translational obstacles. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2021, *17*, 158–175.
36. Wu, P.H.; Kim, H.S.; Jang, I.T. Intervertebral disc diseases part 2: A review of the current diagnostic and treatment strategies for intervertebral disc disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21062135.
37. Adams, M.A.; Roughley, P.J. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2006**, *31*, 2151–2161, doi:10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c.
38. Zhao, C.Q.; Wang, L.M.; Jiang, L.S.; Dai, L.Y. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res. Rev.* **2007**, *6*, 247–261, doi:10.1016/j.arr.2007.08.001.

39. Bermudez-Lekerika, P.; Crump, K.B.; Tseranidou, S.; Nüesch, A.; Kanelis, E.; Alminnawi, A.; Baumgartner, L.; Muñoz-Moya, E.; Compte, R.; Gualdi, F.; et al. *Immuno-Modulatory Effects of Intervertebral Disc Cells*; 2022; Vol. 10; ISBN 0000000298018.
40. Urban, J.P.G.; Roberts, S.; Ralphs, J.R. The Nucleus of the Intervertebral Disc from Development to Degeneration. *Am. Zool.* **2000**, *40*, 53–61, doi:10.1668/0003-1569(2000)040[0053:TNOTID]2.0.CO;2.
41. Sakai, D.; Nakamura, Y.; Nakai, T.; Mishima, T.; Kato, S.; Grad, S.; Alini, M.; Risbud, M. V.; Chan, D.; Cheah, K.S.E.; et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1264, doi:10.1038/ncomms2226.
42. Richardson, S.M.; Doyle, P.; Minogue, B.M.; Gnanalingham, K.; Hoyland, J.A. Increased expression of matrix metalloproteinase-10, nerve growth factor and substance P in the painful degenerate intervertebral discfile:///C:/Users/maria/Downloads/ar1732.pdf. *Arthritis Res. Ther.* **2009**, *11*, 1–8, doi:10.1186/ar2793.
43. Le Maitre, C.L.; Freemont, A.J.; Hoyland, J.A. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res. Ther.* **2005**, *7*, 732–745, doi:10.1186/ar1732.
44. Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 786–801, doi:10.1038/nrm3904.
45. Jabłońska-Trypuć, A.; Matejczyk, M.; Rosochacki, S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 177–183, doi:10.3109/14756366.2016.1161620.
46. Wang, W.J.; Yu, X.H.; Wang, C.; Yang, W.; He, W.S.; Zhang, S.J.; Yan, Y.G.; Zhang, J. MMPs and ADAMTSs in intervertebral disc degeneration. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *448*, 238–246, doi:10.1016/j.cca.2015.06.023.
47. Xu, H.; Mei, Q.; He, J.; Liu, G.; Zhao, J.; Xu, B. Correlation of Matrix Metalloproteinases-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 with Patient Age and Grade of Lumbar Disk Herniation. *Cell Biochem. Biophys.* **2014**, *69*, 439–444, doi:10.1007/s12013-014-9815-9.

48. Wei, F.; Zhong, R.; Zhou, Z.; Wang, L.; Pan, X.; Cui, S.; Zou, X.; Gao, M.; Sun, H.; Chen, W.; et al. In vivo experimental intervertebral disc degeneration induced by bleomycin in the rhesus monkey. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2014**, *15*, 1–10, doi:10.1186/1471-2474-15-340.
49. Sobajima, S.; Shimer, A.L.; Chadderdon, R.C.; Kompel, J.F.; Kim, J.S.; Gilbertson, L.G.; Kang, J.D. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction. *Spine J.* **2005**, *5*, 14–23, doi:10.1016/j.spinee.2004.05.251.
50. Butler, R.J.; Marchesi, S.; Royer, T.; Davis, I.S. The Effect of a Subject-Specific Amount of Lateral Wedge on Knee. *J. Orthop. Res. Sept.* **2007**, *25*, 1121–1127, doi:10.1002/jor.
51. Zhang, C.; Gullbrand, S.E.; Schaer, T.P.; Lau, Y.K.; Jiang, Z.; Dodge, G.R.; Elliott, D.M.; Mauck, R.L.; Malhotra, N.R.; Smith, L.J. Inflammatory cytokine and catabolic enzyme expression in a goat model of intervertebral disc degeneration. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **2020**, *38*, 2521–2531, doi:10.1002/jor.24639.
52. Séguin, C.A.; Pilliar, R.M.; Madri, J.A.; Kandel, R.A. TNF- α Induces MMP2 Gelatinase Activity and MT1-MMP Expression in an In Vitro Model of Nucleus Pulposus Tissue Degeneration. *Spine (Phila. Pa. 1976).* **2008**, *33*.
53. Nasto, L.A.; Robinson, A.R.; Ngo, K.; Clauson, C.L.; Dong, Q.; St. Croix, C.; Sowa, G.; Pola, E.; Robbins, P.D.; Kang, J.; et al. Mitochondrial-derived reactive oxygen species (ROS) play a causal role in aging-related intervertebral disc degeneration. *J. Orthop. Res.* **2013**, *31*, 1150–1157, doi:10.1002/jor.22320.
54. Dimozi, A.; Mavrogonatou, E.; Sklirou, A.; Kletsas, D. Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. *Eur. Cells Mater.* **2015**, *30*, 89–103, doi:10.22203/eCM.v030a07.
55. Liu, Q.; Tan, Z.; Xie, C.; Ling, L.; Hu, H. Oxidative stress as a critical factor might involve in intervertebral disc degeneration via regulating NOXs/FOXOs. *J. Orthop. Sci.* **2023**, *28*, 105–111, doi:10.1016/j.jos.2021.09.010.
56. Cheng, Y.H.; Yang, S.H.; Lin, F.H. Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogel as a controlled release system of ferulic acid for nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6953–6961, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.065.

57. Feng, G.; Zha, Z.; Huang, Y.; Li, J.; Wang, Y.; Ke, W.; Chen, H.; Liu, L.; Song, Y.; Ge, Z. Sustained and Bioresponsive Two-Stage Delivery of Therapeutic miRNA via Polyplex Micelle-Loaded Injectable Hydrogels for Inhibition of Intervertebral Disc Fibrosis. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1–14, doi:10.1002/adhm.201800623.
58. Apte, S.S. A Disintegrin-like and Metalloprotease (Reprolysin-type) with Thrombospondin Type 1 Motif (ADAMTS) Superfamily: Functions and Mechanisms *. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 31493–31497, doi:10.1074/jbc.R109.052340.
59. Gendron, C.; Kashiwagi, M.; Ngee, H.L.; Enghild, J.J.; Thøgersen, I.B.; Hughes, C.; Caterson, B.; Nagase, H. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: Comparative studies with ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 18294–18306, doi:10.1074/jbc.M701523200.
60. Pockert, A.J.; Richardson, S.M.; Le Maitre, C.L.; Lyon, M.; Deakin, J.A.; Buttle, D.J.; Freemont, A.J.; Hoyland, J.A. Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 482–491, doi:10.1002/art.24291.
61. Wang, J.; Markova, D.; Anderson, D.G.; Zheng, Z.; Shapiro, I.M.; Risbud, M. V. TNF- α and IL-1 β promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39738–39749, doi:10.1074/jbc.M111.264549.
62. Yurube, T.; Takada, T.; Suzuki, T.; Kakutani, K.; Maeno, K.; Doita, M.; Kurosaka, M.; Nishida, K. Rat tail static compression model mimics extracellular matrix metabolic imbalances of matrix metalloproteinases, aggrecanases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res. Ther.* **2012**, *14*, doi:10.1186/ar3764.
63. Salo, J.; Mackiewicz, Z.; Indahl, A.; Konttinen, Y.T.; Holm, A.K.; Sukura, A.; Holm, S. Plasmin-Matrix Metalloproteinase Cascades in Spinal Response to an Experimental Disc Lesion in Pig. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2008**, *33*.
64. Wu, X.; Liu, W.; Duan, Z.; Gao, Y.; Li, S.; Wang, K.; Song, Y.; Shao, Z.; Yang, S.; Yang, C. The Involvement of Protease Nexin-1 (PN1) in the Pathogenesis of Intervertebral Disc (IVD) Degeneration. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30563, doi:10.1038/srep30563.
65. Desmoulin, G.T.; Pradhan, V.; Milner, T.E. Mechanical Aspects of Intervertebral Disc Injury and Implications on Biomechanics. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2020**, *45*, E457–E464, doi:10.1097/BRS.0000000000003291.

66. Zhou, J.; Mi, J.; Peng, Y.; Han, H.; Liu, Z. Causal Associations of Obesity With the Intervertebral Degeneration, Low Back Pain, and Sciatica: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*, 740200, doi:10.3389/fendo.2021.740200.
67. Zhang, S.; Hu, B.; Liu, W.; Wang, P.; Lv, X.; Chen, S.; Shao, Z. The role of structure and function changes of sensory nervous system in intervertebral disc-related low back pain. *Osteoarthr. Cartil.* **2021**, *29*, 17–27, doi:10.1016/j.joca.2020.09.002.
68. Przybyla, A.; Pollintine, P.; Bedzinski, R.; Adams, M.A. Outer annulus tears have less effect than endplate fracture on stress distributions inside intervertebral discs: relevance to disc degeneration. *Clin. Biomech. (Bristol, Avon)* **2006**, *21*, 1013–1019, doi:10.1016/j.clinbiomech.2006.07.003.
69. Wang, F.; Cai, F.; Shi, R.; Wang, X.-H.; Wu, X.-T. Aging and age related stresses: a senescence mechanism of intervertebral disc degeneration. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 398–408, doi:10.1016/j.joca.2015.09.019.
70. Rider, S.M.; Mizuno, S.; Kang, J.D. Molecular Mechanisms of Intervertebral Disc Degeneration. *Spine Surg. Relat. Res.* **2019**, *3*, 1–11, doi:10.22603/ssrr.2017-0095.
71. Williams, F.M.K.; Popham, M.; Sambrook, P.N.; Jones, A.F.; Spector, T.D.; MacGregor, A.J. Progression of lumbar disc degeneration over a decade: a heritability study. *Ann. Rheum. Dis.* **2011**, *70*, 1203–1207, doi:10.1136/ard.2010.146001.
72. Battié, M.C.; Videman, T.; Levälähti, E.; Gill, K.; Kaprio, J. Genetic and Environmental Effects on Disc Degeneration by Phenotype and Spinal Level: A Multivariate Twin Study. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2008**, *33*.
73. Sambrook, P.N.; MacGregor, A.J.; Spector, T.D. Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: a magnetic resonance imaging study in twins. *Arthritis Rheum.* **1999**, *42*, 366–372, doi:10.1002/1529-0131(199902)42:2<366::AID-ANR20>3.0.CO;2-6.
74. Feng, Y.; Egan, B.; Wang, J. Genetic Factors in Intervertebral Disc Degeneration. *Genes Dis.* **2016**, *3*, 178–185, doi:10.1016/j.gendis.2016.04.005.
75. Guo, W.; Li, B.-L.; Zhao, J.-Y.; Li, X.-M.; Wang, L.-F. Causal associations between modifiable risk factors and intervertebral disc degeneration. *Spine J.* **2023**, doi:10.1016/j.spinee.2023.10.021.

76. Tu, J.; Li, W.; Hansbro, P.M.; Yan, Q.; Bai, X.; Donovan, C.; Kim, R.Y.; Galvao, I.; Das, A.; Yang, C.; et al. Smoking and tetramer tryptase accelerate intervertebral disc degeneration by inducing METTL14-mediated DIXDC1 m6 modification. *Mol. Ther.* **2023**, *31*, 2524–2542, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.06.010>.
77. Grunhagen, T.; Shirazi-Adl, A.; Fairbank, J.C.T.; Urban, J.P.G. Intervertebral Disk Nutrition: A Review of Factors Influencing Concentrations of Nutrients and Metabolites. *Orthop. Clin. North Am.* **2011**, *42*, 465–477, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ocl.2011.07.010>.
78. Shi, J.; Zhou, X.; Wang, Z.; Kurra, S.; Niu, J.; Yang, H. Increased lactic acid content associated with extracellular matrix depletion in a porcine disc degeneration induced by superficial annular lesion. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2019**, *20*, 1–9, doi:[10.1186/s12891-019-2937-x](https://doi.org/10.1186/s12891-019-2937-x).
79. Guehring, T.; Wilde, G.; Sumner, M.; Grünhagen, T.; Karney, G.B.; Tirlapur, U.K.; Urban, J.P.G. Notochordal intervertebral disc cells: Sensitivity to nutrient deprivation. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 1026–1034, doi:<https://doi.org/10.1002/art.24407>.
80. Lu, L.; Xu, A.; Gao, F.; Tian, C.; Wang, H.; Zhang, J.; Xie, Y.; Liu, P.; Liu, S.; Yang, C.; et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a Novel Strategy for the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *9*, 1–22, doi:[10.3389/fcell.2021.770510](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.770510).
81. Cannata, F.; Vadalà, G.; Ambrosio, L.; Fallucca, S.; Napoli, N.; Papalia, R.; Pozzilli, P.; Denaro, V. Intervertebral disc degeneration: A focus on obesity and type 2 diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **2020**, *36*, e3224, doi:[10.1002/dmrr.3224](https://doi.org/10.1002/dmrr.3224).
82. Quan, H.; Zuo, X.; Huan, Y.; Wang, X.; Yao, Z.; Wang, C.; Ren, F.; Wang, H.; Qin, H.; Hu, X. A systematic morphology study on the effect of high glucose on intervertebral disc endplate degeneration in mice. *Heliyon* **2023**, *9*, e13295, doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13295>.
83. Yin, X.; Motorwala, A.; Vesvoranan, O.; Levene, H.B.; Gu, W.; Huang, C.Y. Effects of Glucose Deprivation on ATP and Proteoglycan Production of Intervertebral Disc Cells under Hypoxia. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–12, doi:[10.1038/s41598-020-65691-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-65691-w).
84. Vergroesen, P.A.; Kingma, I.; Emanuel, K.S.; Hoogendoorn, R.J.W.; Welting, T.J. Mechanics and biology in intervertebral disc degeneration: a vicious circle. *J. Orthop. Res.* **2023**, *23*, 1057–1070, doi:[10.1016/j.joca.2015.03.028](https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.028).

85. Ruiz-Fernández, C.; Francisco, V.; Pino, J.; Mera, A.; González-Gay, M.A.; Gómez, R.; Lago, F.; Gualillo, O. Molecular relationships among obesity, inflammation and intervertebral disc degeneration: Are adipokines the common link? *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20082030.
86. Cannata, F.; Vadalà, G.; Ambrosio, L.; Fallucca, S.; Napoli, N.; Papalia, R.; Pozzilli, P.; Denaro, V. Intervertebral disc degeneration: A focus on obesity and type 2 diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **2020**, *36*, doi:10.1002/dmrr.3224.
87. Liuke, M.; Solovieva, S.; Lamminen, A.; Luoma, K.; Leino-Arjas, P.; Luukkonen, R.; Riihimäki, H. Disc degeneration of the lumbar spine in relation to overweight. *Int. J. Obes.* **2005**, *29*, 903–908, doi:10.1038/sj.ijo.0802974.
88. Zhao, C.-Q.; Liu, D.; Li, H.; Jiang, L.-S.; Dai, L.-Y. Expression of leptin and its functional receptor on disc cells: contribution to cell proliferation. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2008**, *33*, E858-64, doi:10.1097/BRS.0b013e31818338e5.
89. Francisco, V.; Ruiz-Fernández, C.; Pino, J.; Mera, A.; González-Gay, M.A.; Gómez, R.; Lago, F.; Mobasher, A.; Gualillo, O. Adipokines: Linking metabolic syndrome, the immune system, and arthritic diseases. *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *165*, 196–206, doi:10.1016/j.bcp.2019.03.030.
90. Sharma, A. The Role of Adipokines in Intervertebral Disc Degeneration. *Med. Sci. (Basel, Switzerland)* **2018**, *6*, 34.
91. Herrmann, M. Marrow Fat-Secreted Factors as Biomarkers for Osteoporosis. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2019**, *17*, 429–437, doi:10.1007/s11914-019-00550-w.
92. Gruber, H.E.; Ingram, J.A.; Hoelscher, G.L.; Hanley, E.N. Leptin expression by annulus cells in the human intervertebral disc. *Spine J.* **2007**, *7*, 437–443, doi:10.1016/j.spinee.2006.08.001.
93. Zhao, C.Q.; Liu, D.; Li, H.; Jiang, L.S.; Dai, L.Y. Expression of leptin and its functional receptor on disc cells: Contribution to cell proliferation. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. **2008**, *33*, 858–864, doi:10.1097/BRS.0b013e31818338e5.
94. Segar, A.; Urban, J.; Fairbank, J.C.T. Adipokines and the Intervertebral Disc: A Biochemical Link Exists between Obesity, Intervertebral Disc Degeneration and Low Back Pain. *Spine J.* **2016**, *16*, S225, doi:10.1016/j.spinee.2016.07.135.
95. Reilly, S.M.; Saltiel, A.R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 633–643, doi:10.1038/nrendo.2017.90.
96. Wauman, J.; Zabeau, L.; Tavernier, J. The leptin receptor complex: Heavier than expected? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2017**, *8*, doi:10.3389/fendo.2017.00030.

97. Mazor, R.; Friedmann-Morvinski, D.; Alsaigh, T.; Kleifeld, O.; Kistler, E.B.; Rousso-Noori, L.; Huang, C.; Li, J.B.; Verma, I.M.; Schmid-Schönbein, G.W. Cleavage of the leptin receptor by matrix metalloproteinase-2 promotes leptin resistance and obesity in mice. *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*, 1–12, doi:10.1126/scitranslmed.aah6324.
98. Curic, G. Intervertebral disc and adipokine leptin-loves me, loves me not. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–23, doi:10.3390/ijms22010375.
99. Segar, A.H.; Fairbank, J.C.T.; Urban, J. Leptin and the intervertebral disc: a biochemical link exists between obesity, intervertebral disc degeneration and low back pain—an in vitro study in a bovine model. *Eur. Spine J.* **2019**, *28*, 214–223, doi:10.1007/s00586-018-5778-7.
100. Koskinen, A.; Vuolteenaho, K.; Nieminen, R.; Moilanen, T.; Moilanen, E. Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from oa patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2011**, *29*, 57–64.
101. Natelson, D.M.; Lai, A.; Krishnamoorthy, D.; Hoy, R.C.; Iatridis, J.C.; Illien-Jünger, S. Leptin signaling and the intervertebral disc: Sex dependent effects of leptin receptor deficiency and Western diet on the spine in a type 2 diabetes mouse model. *PLoS One* **2020**, *15*, e0227527.
102. Cui, H.; Du, X.; Liu, C.; Chen, S.; Cui, H.; Liu, H.; Wang, J.; Zheng, Z. Visfatin promotes intervertebral disc degeneration by inducing IL-6 expression through the ERK/JNK/p38 signalling pathways. *Adipocyte* **2021**, *10*, 201–215, doi:10.1080/21623945.2021.1910155.
103. Francisco, V.; Pérez, T.; Pino, J.; López, V.; Franco, E.; Alonso, A.; Gonzalez-Gay, M.A.; Mera, A.; Lago, F.; Gómez, R.; et al. Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. *J. Orthop. Res.* **2018**, *36*, 594–604, doi:10.1002/jor.23788.
104. Shi, C.; Wu, H.; Du, D.; Im, H.J.; Zhang, Y.; Hu, B.; Chen, H.; Wang, X.; Liu, Y.; Cao, P.; et al. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitor APO866 Prevents IL-1 β -Induced Human Nucleus Pulposus Cell Degeneration via Autophagy. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *49*, 2463–2482, doi:10.1159/000493843.
105. Jaber, S. Al; Cohen, A.; D'Souza, C.; Abdulrazzaq, Y.M.; Ojha, S.; Bastaki, S.; Adeghate, E.A. Lipocalin-2: Structure, function, distribution and role in metabolic disorders. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *142*, 112002, doi:10.1016/j.biopha.2021.112002.

106. Gómez, R.; Conde, J.; Scotece, M.; Gómez-Reino, J.J.; Lago, F.; Gualillo, O. What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011, 7, 528–536.
107. Wilson, R.; Belluoccio, D.; Little, C.B.; Fosang, A.J.; Bateman, J.F. Proteomic characterization of mouse cartilage degradation in vitro. *Arthritis Rheum.* **2008**, 58, 3120–3131, doi:10.1002/art.23789.
108. Ruiz-Fernández, C.; Ait Eldjoudi, D.; González-Rodríguez, M.; Cordero Barreal, A.; Farrag, Y.; García-Caballero, L.; Lago, F.; Mobasher, A.; Sakai, D.; Pino, J.; et al. Monomeric CRP regulates inflammatory responses in human intervertebral disc cells. *Bone Jt. Res.* **2023**, 12, 189–198, doi:10.1302/2046-3758.123.BJR-2022-0223.R1.
109. Kao, T.H.; Peng, Y.J.; Salter, D.M.; Lee, H.S. Nerve growth factor increases MMP9 activity in annulus fibrosus cells by upregulating lipocalin 2 expression. *Eur. Spine J.* **2015**, 24, 1959–1968, doi:10.1007/s00586-014-3675-2.
110. Pradhan, G.; Samson, S.L.; Sun, Y. Ghrelin: Much more than a hunger hormone. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2013**, 16, 619–624, doi:10.1097/MCO.0b013e328365b9be.
111. Lu, X.; Huang, L.; Huang, Z.; Feng, D.; Clark, R.J.; Chen, C. LEAP-2: An Emerging Endogenous Ghrelin Receptor Antagonist in the Pathophysiology of Obesity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, 12, 1–13, doi:10.3389/fendo.2021.717544.
112. Ge, X.; Yang, H.; Bednarek, M.A.; Galon-Tilleman, H.; Chen, P.; Chen, M.; Lichtman, J.S.; Wang, Y.; Dalmas, O.; Yin, Y.; et al. LEAP2 Is an Endogenous Antagonist of the Ghrelin Receptor. *Cell Metab.* **2018**, 27, 461–469.e6, doi:10.1016/j.cmet.2017.10.016.
113. Li, W.; Wu, X.; Qu, R.; Wang, W.; Chen, X.; Cheng, L.; Liu, Y.; Guo, L.; Zhao, Y.; Liu, C. Ghrelin protects against nucleus pulposus degeneration through inhibition of NF-κB signaling pathway and activation of Akt signaling pathway. *Oncotarget* **2017**, 8, 91887–91901, doi:10.18632/oncotarget.19695.
114. Hrabal, R.; Chen, Z.; James, S.; Bennett, H.P.; Ni, F. The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors. *Nat. Struct. Biol.* 1996, 3, 747–752.
115. Tolkathev, D.; Malik, S.; Vinogradova, A.; Wang, P.; Chen, Z.; Xu, P.; Bennett, H.P.J.; Bateman, A.; Ni, F. Structure dissection of human progranulin identifies well-folded granulin/epithelin modules with unique functional activities. *Protein Sci.* **2008**, 17, 711–724, doi:10.1110/ps.073295308.

116. Park, B.; Buti, L.; Lee, S.; Matsuwaki, T.; Spooner, E.; Brinkmann, M.M.; Nishihara, M.; Ploegh, H.L. Granulin Is a Soluble Cofactor for Toll-like Receptor 9 Signaling. *Immunity* **2011**, *34*, 505–513, doi:10.1016/j.immuni.2011.01.018.
117. Zhao, Y.P.; Tian, Q.Y.; Liu, B.; Cuellar, J.; Richbourgh, B.; Jia, T.H.; Liu, C.J. Progranulin Knockout Accelerates Intervertebral Disc Degeneration in Aging Mice. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–9, doi:10.1038/srep09102.
118. Wang, S.; Wei, J.; Fan, Y.; Ding, H.; Tian, H.; Zhou, X.; Cheng, L. Progranulin Is Positively Associated with Intervertebral Disc Degeneration by Interaction with IL-10 and IL-17 Through TNF Pathways. *Inflammation* **2018**, *41*, 1852–1863, doi:10.1007/s10753-018-0828-1.
119. Nagpal, S.; Patel, S.; Jacobe, H.; DiSepio, D.; Ghosn, C.; Malhotra, M.; Teng, M.; Duvic, M.; Chandraratna, R.A. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J. Invest. Dermatol.* **1997**, *109*, 91–95, doi:10.1111/1523-1747.ep12276660.
120. Bozaoglu, K.; Bolton, K.; McMillan, J.; Zimmet, P.; Jowett, J.; Collier, G.; Walder, K.; Segal, D. Chemerin Is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome. *Endocrinology* **2007**, *148*, 4687–4694, doi:10.1210/en.2007-0175.
121. Kralisch, S.; Weise, S.; Sommer, G.; Lipfert, J.; Lossner, U.; Bluher, M.; Stumvoll, M.; Fasshauer, M. Interleukin-1 β induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. *Regul. Pept.* **2009**, *154*, 102–106, doi:10.1016/j.regpep.2009.02.010.
122. Hu, S.; Shao, Z.; Zhang, C.; Chen, L.; Al Mamun, A.; Zhao, N.; Cai, J.; Lou, Z.; Wang, X.; Chen, J. Chemerin facilitates intervertebral disc degeneration via TLR4 and CMKLR1 and activation of NF-kB signaling pathway. *Aging (Albany, NY)*. **2020**, *12*, 11732–11753, doi:10.18632/aging.103339.
123. Luo, J.; Wen, F.; Qiu, D.; Wang, S. Nesfatin-1 in lipid metabolism and lipid-related diseases. *Clin. Chim. Acta* **2021**, *522*, 23–30, doi:https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.08.005.
124. Sundarajan, L.; Blanco, A.M.; Bertucci, J.I.; Ramesh, N.; Canosa, L.F.; Unniappan, S. Nesfatin-1-Like Peptide Encoded in Nucleobindin-1 in Goldfish is a Novel Anorexigen Modulated by Sex Steroids, Macronutrients and Daily Rhythm. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28377, doi:10.1038/srep28377.

125. Ramanjaneya, M.; Chen, J.; Brown, J.E.; Tripathi, G.; Hallschmid, M.; Patel, S.; Kern, W.; Hillhouse, E.W.; Lehnert, H.; Tan, B.K.; et al. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology* **2010**, *151*, 3169–3180, doi:10.1210/en.2009-1358.
126. Zhang, Y.; Shui, X.; Lian, X.; Wang, G. Serum and Synovial Fluid Nesfatin-1 Concentration is Associated with Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis. *Med. Sci. Monit.* **2015**, *21*, 1078–1082, doi:https://dx.doi.org/10.12659/MSM.892875.
127. Scotece, M.; Conde, J.; Abella, V.; López, V.; Lago, F.; Pino, J.; Gómez-Reino, J.J.; Gualillo, O. NUCB2/nesfatin-1: A new adipokine expressed in human and murine chondrocytes with pro-inflammatory properties, an in vitro study. *J. Orthop. Res.* **2014**, *32*, 653–660, doi:https://doi.org/10.1002/jor.22585.
128. Roe, K. An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scand. J. Immunol.* **2021**, *93*, e12970, doi:10.1111/sji.12970.
129. Maddipati, K.R. Non-inflammatory Physiology of “Inflammatory” Mediators – Unalamation, a New Paradigm. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fimmu.2020.580117.
130. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 428–435, doi:10.1038/nature07201.
131. Cosamalón-Gan, I.; Cosamalón-Gan, T.; Mattos-Piaggio, G.; Villar-Suárez, V.; García-Cosamalón, J.; Vega-Álvarez, J.A. Inflamación en la hernia del disco intervertebral. *Neurocirugia* **2021**, *32*, 21–35, doi:https://doi.org/10.1016/j.neucir.2020.01.001.
132. Zhang, J.-M.; An, J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* **2007**, *45*, 27–37, doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.
133. Li, H.; Wang, X.; Pan, H.; Xiao, C.; Wang, C.; Guo, S.; Long, L.; Shi, H.; Chen, H.; Li, S. The mechanisms and functions of IL-1 β in intervertebral disc degeneration. *Exp. Gerontol.* **2023**, *177*, 112181, doi:10.1016/j.exger.2023.112181.
134. Kim, H.; Hong, J.Y.; Lee, J.; Jeon, W.-J.; Ha, I.-H. IL-1 β promotes disc degeneration and inflammation through direct injection of intervertebral disc in a rat lumbar disc herniation model. *Spine J.* **2021**, *21*, 1031–1041, doi:10.1016/j.spinee.2021.01.014.
135. Wang, Y.; Che, M.; Xin, J.; Zheng, Z.; Li, J.; Zhang, S. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110660, doi:10.1016/j.biopha.2020.110660.

136. Deng, X.; Zhao, F.; Kang, B.; Zhang, X. Elevated interleukin-6 expression levels are associated with intervertebral disc degeneration. *Exp. Ther. Med.* **2016**, *11*, 1425–1432, doi:10.3892/etm.2016.3079.
137. Ataie-Kachoie, P.; Pourgholami, M.H.; Morris, D.L. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: A strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2013**, *24*, 163–173, doi:10.1016/j.cytogfr.2012.09.001.
138. Fan, N.; Yuan, S.; Hai, Y.; Du, P.; Li, J.; Kong, X.; Zhu, W.; Liu, Y.; Zang, L. Identifying the potential role of IL-1 β in the molecular mechanisms of disc degeneration using gene expression profiling and bioinformatics analysis. *J. Orthop. Surg.* **2022**, *30*, doi:10.1177/23094990211068203.
139. Grad, S.; Bow, C.; Karppinen, J.; Luk, K.D.K.; Cheung, K.M.C.; Alini, M.; Samartzis, D. Systemic blood plasma CCL5 and CXCL6: Potential biomarkers for human lumbar disc degeneration. *Eur. Cells Mater.* **2016**, *31*, 1–10, doi:10.22203/eCM.v031a01.
140. Zhang, Y.; Liu, L.; Wang, S.; Zhao, Y.; Liu, Y.; Li, J.; Nie, L.; Cheng, L. Production of CCL20 on nucleus pulposus cells recruits IL-17-producing cells to degenerated IVD tissues in rat models. *J. Mol. Histol.* **2016**, *47*, 81–89, doi:10.1007/s10735-015-9651-2.
141. Zhang, H.; Zhu, T.; Zhang, L.; Wu, Q. Stromal cell-derived factor-1 induces matrix metalloproteinase expression in human endplate chondrocytes, cartilage endplate degradation in explant culture, and the amelioration of nucleus pulposus degeneration in vivo. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *41*, 969–976, doi:10.3892/ijmm.2017.3278.
142. Xu, H.; Qi, G.; Li, K.; Yang, K.; Luo, D.; Cai, Z. Impact of NF- κ B pathway on the intervertebral disc inflammation and degeneration induced by over-mechanical stretching stress. *J. Inflamm. (Lond)*. **2021**, *18*, 6, doi:10.1186/s12950-021-00273-9.
143. Hu, S.; Fu, Y.; Yan, B.; Shen, Z.; Lan, T. Analysis of key genes and pathways associated with the pathogenesis of intervertebral disc degeneration. *J. Orthop. Surg. Res.* **2020**, *15*, 371, doi:10.1186/s13018-020-01902-4.
144. Zhang, K.; Zhang, Y.; Zhang, C.; Zhu, L. Upregulation of P53 promotes nucleus pulposus cell apoptosis in intervertebral disc degeneration through upregulating NDRG2. *Cell Biol. Int.* **2021**, *45*, 1966–1975, doi:10.1002/cbin.11650.
145. Lee, C.M.; Wu, J.; Xia, Y.; Hu, J. ESE-1 in Early Development: Approaches for the Future. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, *4*, 73, doi:10.3389/fcell.2016.00073.

146. Conde, J.; Otero, M.; Scotece, M.; Abella, V.; Gómez, R.; López, V.; Pino, J.; Mera, A.; Goldring, M.B.; Gualillo, O. E74-Like Factor (ELF3) and Leptin, a Novel Loop Between Obesity and Inflammation Perpetuating a Pro-Catabolic State in Cartilage. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2018**, *45*, 2401–2410, doi:10.1159/000488227.
147. Oettgen, P.; Alani, R.M.; Barcinski, M.A.; Brown, L.; Akbarali, Y.; Boltax, J.; Kunsch, C.; Munger, K.; Libermann, T.A. Isolation and characterization of a novel epithelium-specific transcription factor, ESE-1, a member of the ets family. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 4419–4433, doi:10.1128/MCB.17.8.4419.
148. Rudders, S.; Gaspar, J.; Madore, R.; Volland, C.; Grall, F.; Patel, A.; Pellacani, A.; Perrella, M.A.; Libermann, T.A.; Oettgen, P. ESE-1 is a Novel Transcriptional Mediator of Inflammation that Interacts with NF- κ B to Regulate the Inducible Nitric-oxide Synthase Gene. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3302–3309, doi:10.1074/jbc.M006507200.
149. Lee, S.H.; Jae, H.B.; Chang, K.C.; Whitlock, N.C.; English, A.E.; Safe, S.; Seung, J.B. ESE-1/EGR-1 pathway plays a role in tolfenamic acid-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 3739–3750, doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0548.
150. Grall, F.T.; Prall, W.C.; Wei, W.; Gu, X.; Cho, J.Y.; Choy, B.K.; Zerbini, L.F.; Inan, M.S.; Goldring, S.R.; Gravalles, E.M.; et al. The Ets transcription factor ESE-1 mediates induction of the COX-2 gene by LPS in monocytes. *FEBS J.* **2005**, *272*, 1676–1687, doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04592.x.
151. Conde, J.; Otero, M.; Scotece, M.; Abella, V.; López, V.; Pino, J.; Gómez, R.; Lago, F.; Goldring, M.B.; Gualillo, O. E74-like factor 3 and nuclear factor- κ B regulate lipocalin-2 expression in chondrocytes. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 6133–6146, doi:10.1113/JP272240.
152. Grall, F.; Gu, X.; Tan, L.; Cho, J.Y.; Inan, M.S.; Pettit, A.R.; Thamrongsak, U.; Choy, B.K.; Manning, C.; Akbarali, Y.; et al. Responses to the proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor α in cells derived from rheumatoid synovium and other joint tissues involve nuclear factor κ B-mediated induction of the Ets transcription factor ESE-1. *Arthritis Rheum.* **2003**, *48*, 1249–1260, doi:10.1002/art.10942.
153. Otero, M.; Peng, H.; Hachem, K. El; Culley, K.L.; Wondimu, E.B.; Quinn, J.; Asahara, H.; Tsuchimochi, K.; Hashimoto, K.; Goldring, M.B. ELF3 modulates type II collagen gene (COL2A1) transcription in chondrocytes by inhibiting SOX9-CBP/p300-driven histone acetyltransferase activity. *Connect. Tissue Res.* **2017**, *58*, 15–26, doi:10.1080/03008207.2016.1200566.

154. Wondimu, E.B.; Culley, K.L.; Quinn, J.; Chang, J.; Dragomir, C.L.; Plumb, D.A.; Goldring, M.B.; Otero, M. Elf3 contributes to cartilage degradation in vivo in a surgical model of post-traumatic osteoarthritis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–10, doi:10.1038/s41598-018-24695-3.
155. Chen, X.; Shi, Y.; Xue, P.; Ma, X.; Li, J.; Zhang, J. Mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-136-5p inhibits chondrocyte degeneration in traumatic osteoarthritis by targeting ELF3. *Arthritis Res. Ther.* **2020**, *22*, 1–13, doi:10.1186/s13075-020-02325-6.
156. Otero, M.; Plumb, D.A.; Tsuchimochi, K.; Dragomir, C.L.; Hashimoto, K.; Peng, H.; Olivotto, E.; Bevilacqua, M.; Tan, L.; Yang, Z.; et al. E74-like Factor 3 (ELF3) impacts on Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13) transcriptional control in articular chondrocytes under proinflammatory stress. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3559–3572, doi:10.1074/jbc.M111.265744.
157. Rudders, S.; Gaspar, J.; Madore, R.; Volland, C.; Grall, F.; Patel, A.; Pellacani, A.; Perrella, M.A.; Libermann, T.A.; Oettgen, P. ESE-1 is a novel transcriptional mediator of inflammation that interacts with NF-kappa B to regulate the inducible nitric-oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3302–3309, doi:10.1074/jbc.M006507200.
158. Goldring, M.B.; Otero, M.; Tsuchimochi, K.; Ijiri, K.; Li, Y. Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Ann. Rheum. Dis.* **2008**, *67 Suppl 3*, iii75-82, doi:10.1136/ard.2008.098764.
159. Zhang, Q.; Lenardo, M.J.; Baltimore, D. 30 Years of NF-κB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell* **2017**, *168*, 37–57, doi:10.1016/j.cell.2016.12.012.
160. Ranjan Sen; David Baltimore Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **1986**, *46*, 705–716.
161. Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. IChen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, *9*(6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208> inflammatory respon. *Oncotarget* **2018**, *9*, 7204–7218.
162. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
163. Giridharan, S.; Srinivasan, M. Mechanisms of NF-κB p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J. Inflamm. Res.* **2018**, *11*, 407–419, doi:10.2147/JIR.S140188.

164. Kelliher, M.A.; Grimm, S.; Ishida, Y.; Kuo, F.; Stanger, B.Z.; Leder, P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* **1998**, *8*, 297–303, doi:10.1016/s1074-7613(00)80535-x.
165. Loughlin, J. Knee osteoarthritis, lumbar-disc degeneration and developmental dysplasia of the hip--an emerging genetic overlap. *Arthritis Res. Ther.* 2011, *13*, 108.
166. Fine, N.; Lively, S.; Séguin, C.A.; Perruccio, A. V; Kapoor, M.; Rampersaud, R. Intervertebral disc degeneration and osteoarthritis: a common molecular disease spectrum. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2023**, *19*, 136–152, doi:10.1038/s41584-022-00888-z.
167. Molinos, M.; Almeida, C.R.; Caldeira, J.; Cunha, C.; Gonçalves, R.M.; Barbosa, M.A. Inflammation in intervertebral disc degeneration and regeneration. *J. R. Soc. Interface* **2015**, *12*, 20141191, doi:10.1098/rsif.2014.1191.
168. Lyu, F.-J.; Cui, H.; Pan, H.; Mc Cheung, K.; Cao, X.; Iatridis, J.C.; Zheng, Z. Painful intervertebral disc degeneration and inflammation: from laboratory evidence to clinical interventions. *Bone Res.* **2021**, *9*, 7, doi:10.1038/s41413-020-00125-x.
169. Woodell-May, J.E.; Sommerfeld, S.D. Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **2020**, *38*, 253–257, doi:10.1002/jor.24457.
170. Miller, R.E.; Scanzello, C.R.; Malfait, A.-M. An emerging role for Toll-like receptors at the neuroimmune interface in osteoarthritis. *Semin. Immunopathol.* **2019**, *41*, 583–594, doi:10.1007/s00281-019-00762-3.
171. Krock, E.; Rosenzweig, D.H.; Currie, J.B.; Bisson, D.G.; Ouellet, J.A.; Haglund, L. Toll-like receptor activation induces degeneration of human intervertebral discs. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–12, doi:10.1038/s41598-017-17472-1.
172. Barreto, G.; Manninen, M.; K Eklund, K. Osteoarthritis and Toll-Like Receptors: When Innate Immunity Meets Chondrocyte Apoptosis. *Biology (Basel).* **2020**, *9*, doi:10.3390/biology9040065.
173. Wang, L.; Gu, Y.; Zhao, H.; Chen, R.; Chen, W.; Qi, H.; Gao, W. Dioscin Attenuates Interleukin 1 β (IL-1 β)-Induced Catabolism and Apoptosis via Modulating the Toll-Like Receptor 4 (TLR4)/Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) Signaling in Human Nucleus Pulposus Cells. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2020**, *26*, e923386, doi:10.12659/MSM.923386.
174. Reichardt, S.D.; Amouret, A.; Muzzi, C.; Vettorazzi, S.; Tuckermann, J.P.; Lühder, F.; Reichardt, H.M. The role of glucocorticoids in inflammatory diseases. *Cells* **2021**, *10*, 1–30, doi:10.3390/cells10112921.

175. Neira, F.; Ortega, J.L. Revisión del tratamiento con corticoides en el dolor de espalda según la medicina basada en la evidencia. *Rev. la Soc. Española del Dolor* **2009**, *16*, 352–369, doi:10.1016/s1134-8046(09)72543-1.
176. Martín-Esteve, I.; Aparicio-Espinar, M.; Hernández-Gañan, J.; Narváez, J. Vertebral osteonecrosis as a complication of corticosteroid therapy: The intravertebral vacuum cleft sign. *Reumatol. Clin.* **2012**, *8*, 375–377, doi:10.1016/j.reuma.2011.10.014.
177. Ingawale, D.K.; Mandlik, S.K. New insights into the novel anti-inflammatory mode of action of glucocorticoids. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2020**, *42*, 59–73, doi:10.1080/08923973.2020.1728765.
178. Ingawale, D.K.; Mandlik, S.K. New insights into the novel anti-inflammatory mode of action of glucocorticoids. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2020**, *42*, 59–73, doi:10.1080/08923973.2020.1728765.
179. Vaudreuil, N.; Kadow, T.; Yurube, T.; Hartman, R.; Ngo, K.; Dong, Q.; Pohl, P.; Coelho, J.P.; Kang, J.; Vo, N.; et al. NSAID use in intervertebral disc degeneration: what are the effects on matrix homeostasis in vivo? *Spine J.* **2017**, *17*, 1163–1170, doi:10.1016/j.spinee.2017.04.012.
180. Nicolescu, A.; Babotă, M.; Barros, L.; Rocchetti, G.; Lucini, L.; Tanase, C.; Mocan, A.; Bunea, C.I.; Crișan, G. Bioaccessibility and bioactive potential of different phytochemical classes from nutraceuticals and functional foods. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1184535, doi:10.3389/fnut.2023.1184535.
181. Huskisson, E.C. Glucosamine and Chondroitin for Osteoarthritis. *J. Int. Med. Res.* **2008**, *36*, 1161–1179, doi:10.1177/147323000803600602.
182. Brito, R.; Costa, D.; Dias, C.; Cruz, P.; Barros, P. Chondroitin Sulfate Supplements for Osteoarthritis: A Critical Review. *Cureus* **2023**, *15*, e40192, doi:10.7759/cureus.40192.
183. van Blitterswijk, W.J.; van de Nes, J.C.M.; Wuisman, P.I.J.M. Glucosamine and chondroitin sulfate supplementation to treat symptomatic disc degeneration: Biochemical rationale and case report. *BMC Complement. Altern. Med.* **2003**, *3*, 1–8, doi:10.1186/1472-6882-3-2.
184. NaPier, Z.; Kanim, L.E.A.; Arabi, Y.; Salehi, K.; Sears, B.; Perry, M.; Kim, S.; Sheyn, D.; Bae, H.W.; Glaeser, J.D. Omega-3 Fatty Acid Supplementation Reduces Intervertebral Disc Degeneration. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2019**, *25*, 9531–9537, doi:10.12659/MSM.918649.

185. Ros, E.; Martínez-González, M.A.; Estruch, R.; Salas-Salvadó, J.; Fitó, M.; Martínez, J.A.; Corella, D. Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Adv. Nutr.* **2014**, *5*, 330S–6S, doi:10.3945/an.113.005389.
186. Aparicio-Soto, M.; Sánchez-Hidalgo, M.; Rosillo, M.Á.; Castejón, M.L.; Alarcón-de-la-Lastra, C. Extra virgin olive oil: a key functional food for prevention of immune-inflammatory diseases. *Food Funct.* **2016**, *7*, 4492–4505, doi:10.1039/c6fo01094f.
187. Wongwarawipat, T.; Papageorgiou, N.; Bertias, D.; Siasos, G.; Tousoulis, D. Olive Oil-related Anti-inflammatory Effects on Atherosclerosis: Potential Clinical Implications. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **2018**, *18*, 51–62, doi:10.2174/1871530317666171116103618.
188. Escrich, E.; Moral, R.; Solanas, M. Olive oil, an essential component of the Mediterranean diet, and breast cancer. *Public Health Nutr.* **2011**, *14*, 2323–2332, doi:10.1017/S1368980011002588.
189. Casamenti, F.; Stefani, M. Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. *Expert Rev. Neurother.* **2017**, *17*, 345–358, doi:10.1080/14737175.2017.1245617.
190. Servili, M.; Selvaggini, R.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Montedoro, G.; Morozzi, G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 113–127.
191. Olmo-Cunillera, A.; Pérez, M.; López-Yerena, A.; Abuhabib, M.M.; Ninot, A.; Romero-Aroca, A.; Vallverdú-Queralt, A.; Lamuela-Raventós, R.M. Oleacein and Oleocanthal: Key Metabolites in the Stability of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1776, doi:10.3390/antiox12091776.
192. Sköldstam, L.; Brudin, L.; Hagfors, L.; Johansson, G. Weight reduction is not a major reason for improvement in rheumatoid arthritis from lacto-vegetarian, vegan or Mediterranean diets. *Nutr. J.* **2005**, *4*, 15, doi:10.1186/1475-2891-4-15.
193. Lai, A.; Ho, L.; Evashwick-Rogler, T.W.; Watanabe, H.; Salandra, J.; Winkelstein, B.A.; Laudier, D.; Hecht, A.C.; Pasinetti, G.M.; Iatridis, J.C. Dietary polyphenols as a safe and novel intervention for modulating pain associated with intervertebral disc degeneration in an in-vivo rat model. *PLoS One* **2019**, *14*, e0223435, doi:10.1371/journal.pone.0223435.

194. Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Miniati, E.; Macchioni, A. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil: 3. Spectroscopic characterization of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2228–2234.
195. Beauchamp, G.K.; Keast, R.S.J.; Morel, D.; Lin, J.; Pika, J.; Han, Q.; Lee, C.-H.; Smith, A.B.; Breslin, P.A.S. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* **2005**, *437*, 45–46, doi:10.1038/437045a.
196. Beauchamp, G.K.; Keast, R.S.J.; Morel, D.; Lin, J.; Pika, J.; Han, Q.; Lee, C.-H.; Smith, A.B.; Breslin, P.A.S. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* **2005**, *437*, 45–46, doi:10.1038/437045a.
197. Iacono, A.; Gómez, R.; Sperry, J.; Conde, J.; Bianco, G.; Meli, R.; Gómez-Reino, J.J.; Smith, A.B. 3rd; Gualillo, O. Effect of oleocanthal and its derivatives on inflammatory response induced by lipopolysaccharide in a murine chondrocyte cell line. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62*, 1675–1682, doi:10.1002/art.27437.
198. Peyrot des Gachons, C.; Uchida, K.; Bryant, B.; Shima, A.; Sperry, J.B.; Dankulich-Nagrudny, L.; Tominaga, M.; Smith, A.B. 3rd; Beauchamp, G.K.; Breslin, P.A.S. Unusual pungency from extra-virgin olive oil is attributable to restricted spatial expression of the receptor of oleocanthal. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2011**, *31*, 999–1009, doi:10.1523/JNEUROSCI.1374-10.2011.
199. Scotece, M.; Conde, J.; Abella, V.; López, V.; Francisco, V.; Ruiz, C.; Campos, V.; Lago, F.; Gomez, R.; Pino, J.; et al. Oleocanthal Inhibits Catabolic and Inflammatory Mediators in LPS-Activated Human Primary Osteoarthritis (OA) Chondrocytes Through MAPKs/NF- κ B Pathways. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *49*, 2414–2426, doi:10.1159/000493840.
200. Vougiannopoulou, K.; Lemus, C.; Halabalaki, M.; Pergola, C.; Werz, O.; Smith, A.B. 3rd; Michel, S.; Skaltsounis, L.; Deguin, B. One-step semisynthesis of oleacein and the determination as a 5-lipoxygenase inhibitor. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 441–445, doi:10.1021/np401010x.
201. Abramson, S.B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2008**, *10*, S2, doi:10.1186/ar2463.
202. Hodge, A.M.; English, D.R.; McCredie, M.R.E.; Severi, G.; Boyle, P.; Hopper, J.L.; Giles, G.G. Foods, nutrients and prostate cancer. *Cancer Causes Control* **2004**, *15*, 11–20, doi:10.1023/B:CACO.0000016568.25127.10.

203. Pauwels, E.K.J. The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Med. Princ. Pract. Int. J. Kuwait Univ. Heal. Sci. Cent.* **2011**, *20*, 103–111, doi:10.1159/000321197.
204. Bosetti, C.; Negri, E.; Franceschi, S.; Talamini, R.; Montella, M.; Conti, E.; Lagiou, P.; Parazzini, F.; La Vecchia, C. Olive oil, seed oils and other added fats in relation to ovarian cancer (Italy). *Cancer Causes Control* **2002**, *13*, 465–470, doi:10.1023/a:1015760004130.
205. Markellos, C.; Ourailidou, M.-E.; Gavriatopoulou, M.; Halvatsiotis, P.; Sergentanis, T.N.; Psaltopoulou, T. Olive oil intake and cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **2022**, *17*, e0261649, doi:10.1371/journal.pone.0261649.
206. González-Rodríguez, M.; Ait Edjoudi, D.; Cordero-Barreal, A.; Farrag, M.; Varela-García, M.; Torrijos-Pulpón, C.; Ruiz-Fernández, C.; Capuozzo, M.; Ottaiano, A.; Lago, F.; et al. Oleocanthal, an Antioxidant Phenolic Compound in Extra Virgin Olive Oil (EVOO): A Comprehensive Systematic Review of Its Potential in Inflammation and Cancer. *Antioxidants* **2023**, *12*.
207. Elnagar, A.Y.; Sylvester, P.W.; El Sayed, K.A. (-)-Oleocanthal as a c-Met inhibitor for the control of metastatic breast and prostate cancers. *Planta Med.* **2011**, *77*, 1013–1019, doi:10.1055/s-0030-1270724.
208. Akl, M.R.; Ayoub, N.M.; Mohyeldin, M.M.; Busnena, B.A.; Foudah, A.I.; Liu, Y.-Y.; Sayed, K.A.E. Olive phenolics as c-Met inhibitors: (-)-Oleocanthal attenuates cell proliferation, invasiveness, and tumor growth in breast cancer models. *PLoS One* **2014**, *9*, e97622, doi:10.1371/journal.pone.0097622.
209. Margarucci, L.; Monti, M.C.; Cassiano, C.; Mozzicafreddo, M.; Angeletti, M.; Riccio, R.; Tosco, A.; Casapullo, A. Chemical proteomics-driven discovery of oleocanthal as an Hsp90 inhibitor. *Chem. Commun. (Camb.)* **2013**, *49*, 5844–5846, doi:10.1039/c3cc41858h.
210. Scotece, M.; Gómez, R.; Conde, J.; Lopez, V.; Gómez-Reino, J.J.; Lago, F.; Smith, A.B. 3rd; Gualillo, O. Oleocanthal inhibits proliferation and MIP-1 α expression in human multiple myeloma cells. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2467–2475, doi:10.2174/0929867311320190006.
211. Qosa, H.; Batarseh, Y.S.; Mohyeldin, M.M.; El Sayed, K.A.; Keller, J.N.; Kaddoumi, A. Oleocanthal enhances amyloid- β clearance from the brains of TgSwDI mice and in vitro across a human blood-brain barrier model. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6*, 1849–1859, doi:10.1021/acschemneuro.5b00190.

212. Batarseh, Y.S.; Kaddoumi, A. Oleocanthal-rich extra-virgin olive oil enhances donepezil effect by reducing amyloid- β load and related toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Nutr. Biochem.* **2018**, *55*, 113–123, doi:10.1016/j.jnutbio.2017.12.006.
213. Monti, M.C.; Margarucci, L.; Tosco, A.; Riccio, R.; Casapullo, A. New insights on the interaction mechanism between tau protein and oleocanthal, an extra-virgin olive-oil bioactive component. *Food Funct.* **2011**, *2*, 423–428, doi:10.1039/c1fo10064e.
214. Pitt, J.; Roth, W.; Lacor, P.; Smith, A.B. 3rd; Blankenship, M.; Velasco, P.; De Felice, F.; Breslin, P.; Klein, W.L. Alzheimer's-associated Abeta oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *240*, 189–197, doi:10.1016/j.taap.2009.07.018.
215. Abuznait, A.H.; Qosa, H.; Busnena, B.A.; El Sayed, K.A.; Kaddoumi, A. Olive-oil-derived oleocanthal enhances β -amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 973–982, doi:10.1021/cn400024q.
216. Tsolakou, A.; Diamantakos, P.; Kalaboki, I.; Mena-Bravo, A.; Priego-Capote, F.; Abdallah, I.M.; Kaddoumi, A.; Melliou, E.; Magiatis, P. Oleocanthalic Acid, a Chemical Marker of Olive Oil Aging and Exposure to a High Storage Temperature with Potential Neuroprotective Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 7337–7346, doi:10.1021/acs.jafc.8b00561.
217. Batarseh, Y.S.; Mohamed, L.A.; Al Rihani, S.B.; Mousa, Y.M.; Siddique, A.B.; El Sayed, K.A.; Kaddoumi, A. Oleocanthal ameliorates amyloid- β oligomers' toxicity on astrocytes and neuronal cells: In vitro studies. *Neuroscience* **2017**, *352*, 204–215, doi:10.1016/j.neuroscience.2017.03.059.
218. Scotece, M.; Gómez, R.; Conde, J.; Lopez, V.; Gómez-Reino, J.J.; Lago, F.; Smith, A.B. 3rd; Gualillo, O. Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life Sci.* **2012**, *91*, 1229–1235, doi:10.1016/j.lfs.2012.09.012.
219. Patravale, V.; Dandekar, P.; Jain, R. Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. *Nanoparticulate Drug Deliv.* **2012**, 123–155, doi:10.1533/9781908818195.123.
220. Kuete, V.; Karaosmanoğlu, O.; Sivas, H. Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In; Kuete, V.B.T.-M.S. and V. from A., Ed.; Academic Press, 2017; pp. 271–297 ISBN 978-0-12-809286-6.

221. Barr, J.; Caballería, J.; Martínez-Arranz, I.; Domínguez-Díez, A.; Alonso, C.; Muntané, J.; Pérez-Cormenzana, M.; García-Monzón, C.; Mayo, R.; Martín-Duce, A.; et al. Obesity-dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 2521–2532, doi:10.1021/pr201223p.
222. FM, van der K.; I, B.; ER, V.; RH, J. Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5132–5141, doi:10.1021/PR900499R.
223. Barr, J.; Caballería, J.; Martínez-Arranz, I.; Domínguez-Díez, A.; Alonso, C.; Muntané, J.; Pérez-Cormenzana, M.; García-Monzón, C.; Mayo, R.; Martín-Duce, A.; et al. Obesity dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression NIH Public Access. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 2521–2532, doi:10.1021/pr201223p.
224. Martínez-Arranz, I.; Mayo, R.; Pérez-Cormenzana, M.; Mincholé, I.; Salazar, L.; Alonso, C.; Mato, J.M. Enhancing metabolomics research through data mining. *J. Proteomics* **2015**, *127*, 275–288, doi:10.1016/J.JPROT.2015.01.019.
225. Otero, M.; Lago, R.; Lago, F.; Reino, J.J.G.; Gualillo, O. Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Res. Ther.* **2005**, *7*, 581–591, doi:10.1186/ar1708.
226. Shan, L.; Liao, F.; Jin, H.; Ye, F.; Tong, P.; Xiao, L.; Zhou, J.; Wu, C. Plasma metabonomic profiling of lumbar disc herniation and its traditional Chinese medicine subtypes in patients by using gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10*, 2965–2973, doi:10.1039/c4mb00301b.
227. Radek, M.; Pacholczyk-Sienicka, B.; Jankowski, S.; Albrecht, Ł.; Grodzka, M.; Depta, A.; Radek, A. Assessing the correlation between the degree of disc degeneration on the Pfirrmann scale and the metabolites identified in HR-MAS NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Imaging* **2016**, *34*, 376–380, doi:10.1016/j.mri.2015.12.005.
228. Jump, D.B. Fatty Acid Regulation of Gene Transcription. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2004**, *41*, 41–78, doi:10.1080/10408360490278341.
229. Agrawal, A.; Guttapalli, A.; Narayan, S.; Albert, T.J.; Shapiro, I.M.; Risbud, M. V. Normoxic stabilization of HIF-1 α drives glycolytic metabolism and regulates aggrecan gene expression in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disk. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2007**, *293*, 621–631, doi:10.1152/ajpcell.00538.2006.

230. Johnston, S.N.; Silagi, E.S.; Madhu, V.; Nguyen, D.H.; Shapiro, I.M.; Risbud, M. V GLUT1 is redundant in hypoxic and glycolytic nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *bioRxiv* **2023**, 2022.07.22.501129, doi:10.1101/2022.07.22.501129.
231. Pacholczyk-Sienicka, B.; Radek, M.; Radek, A.; Jankowski, S. Characterization of metabolites determined by means of ¹H HR MAS NMR in intervertebral disc degeneration. *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* **2015**, *28*, 173–183, doi:10.1007/s10334-014-0457-0.
232. Glaeser, J.D.; Salehi, K.; Kanim, L.E.A.; NaPier, Z.; Kropf, M.A.; Cuéllar, J.M.; Perry, T.G.; Bae, H.W.; Sheyn, D. NF-κB inhibitor, NEMO-binding domain peptide attenuates intervertebral disc degeneration. *Spine J.* **2020**, *20*, 1480–1491, doi:10.1016/j.spinee.2020.04.025.
233. Tu, J.; Li, W.; Zhang, Y.; Wu, X.; Song, Y.; Kang, L.; Liu, W.; Wang, K.; Li, S.; Hua, W.; et al. Simvastatin Inhibits IL-1β-Induced Apoptosis and Extracellular Matrix Degradation by Suppressing the NF-κB and MAPK Pathways in Nucleus Pulposus Cells. *Inflammation* **2017**, *40*, 725–734, doi:10.1007/s10753-017-0516-6.
234. Alhouayek, M.; Masquelier, J.; Muccioli, G.G. Lysophosphatidylinositols, from Cell Membrane Constituents to GPR55 Ligands. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, *39*, 586–604, doi:10.1016/j.tips.2018.02.011.
235. Zeng, Y.; Liu, Z.; Tan, X.; Lei, L. The GPR55 antagonist CID16020046 mitigates advanced glycation end products (AGEs)- induced chondrocyte activation. *Chem. Biol. Interact.* **2020**, *325*, 109088, doi:10.1016/j.cbi.2020.109088.
236. van der Veen, J.N.; Kennelly, J.P.; Wan, S.; Vance, J.E.; Vance, D.E.; Jacobs, R.L. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859*, 1558–1572, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006.
237. Song, Y.; Lu, S.; Geng, W.; Feng, X.; Luo, R.; Li, G.; Yang, C. Mitochondrial quality control in intervertebral disc degeneration. *Exp. Mol. Med.* **2021**, *53*, 1124–1133, doi:10.1038/s12276-021-00650-7.
238. Wang, D.-K.; Zheng, H.-L.; Zhou, W.-S.; Duan, Z.-W.; Jiang, S.-D.; Li, B.; Zheng, X.-F.; Jiang, L.-S. Mitochondrial Dysfunction in Oxidative Stress-Mediated Intervertebral Disc Degeneration. *Orthop. Surg.* **2022**, *14*, 1569–1582, doi:10.1111/os.13302.
239. Saberi, M.; Zhang, X.; Mobasheri, A. Targeting mitochondrial dysfunction with small molecules in intervertebral disc aging and degeneration. **2021**, 517–537.

240. Knapp, M.; Baranowski, M.; Czarnowski, D.; Lisowska, A.; Zabielski, P.; Górski, J.; Musiał, W. Plasma sphingosine-1-phosphate concentration is reduced in patients with myocardial infarction. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2009**, *15*, CR490-3.
241. Hernández-Bello, F.; Franco, M.; Pérez-Méndez, Ó.; Donis-Maturano, L.; Zarco-Olvera, G.; Bautista-Pérez, R. Sphingolipid metabolism and its relationship with cardiovascular, renal and metabolic diseases. *Arch. Cardiol. Mex.* **2023**, *93*, 88–95, doi:10.24875/ACM.21000333.
242. Taniguchi, M.; Okazaki, T. Role of ceramide/sphingomyelin (SM) balance regulated through “SM cycle” in cancer. *Cell. Signal.* **2021**, *87*, 110119, doi:https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110119.
243. Trayssac, M.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Role of sphingolipids in senescence: implication in aging and age-related diseases. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*, 2702–2712, doi:10.1172/JCI97949.
244. Johnson, A.A.; Stolzing, A. The role of lipid metabolism in aging , lifespan regulation , and age - related disease. **2019**, 1–26, doi:10.1111/accel.13048.
245. Bhujel, B.; Shin, H.; Choi, D.; Han, I. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Intervertebral Disc Regeneration : Review. **2022**.
246. Monchaux, M.; Forterre, S.; Spreng, D.; Karol, A.; Forterre, F.; Wuertz-Kozak, K. Inflammatory Processes Associated with Canine Intervertebral Disc Herniation. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1681, doi:10.3389/fimmu.2017.01681.
247. Li, S.; Huang, C.; Xiao, J.; Wu, Y.; Zhang, Z.; Zhou, Y.; Tian, N.; Wu, Y.; Wang, X.; Zhang, X. The Potential Role of Cytokines in Diabetic Intervertebral Disc Degeneration. *Aging Dis.* **2022**, *13*, 1323–1335, doi:10.14336/AD.2022.0129.
248. Wang, Y.; Jiang, L.; Dai, G.; Li, S.; Mu, X. Bioinformatics analysis reveals different gene expression patterns in the annulus fibrosis and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration. *Exp Ther Med* **2018**, *16*, 5031–5040, doi:10.3892/etm.2018.6884.
249. Lan, Y.-J.; Sam, N.B.; Cheng, M.-H.; Pan, H.-F.; Gao, J. Progranulin as a Potential Therapeutic Target in Immune-Mediated Diseases. *J. Inflamm. Res.* **2021**, *14*, 6543–6556, doi:10.2147/JIR.S339254.
250. Böck, M.; Hinley, J.; Schmitt, C.; Wahlicht, T.; Kramer, S.; Southgate, J. Identification of ELF3 as an early transcriptional regulator of human urothelium. *Dev. Biol.* **2014**, *386*, 321–330, doi:10.1016/j.ydbio.2013.12.028.

251. Le Maitre, C.L.; Hoyland, J.A.; Freemont, A.J. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1 β and TNF α expression profile. *Arthritis Res. Ther.* **2007**, *9*, 1–11, doi:10.1186/AR2275/FIGURES/3.
252. Lefebvre, V.; Li, P.; de Crombrughe, B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J.* **1998**, *17*, 5718–5733, doi:10.1093/emboj/17.19.5718.
253. Bi, W.; Deng, J.M.; Zhang, Z.; Behringer, R.R.; de Crombrughe, B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 85–89, doi:10.1038/8792.
254. Vo, N. V.; Hartman, R.A.; Yurube, T.; Jacobs, L.J.; Sowa, G.A.; Kang, J.D. Expression and regulation of metalloproteinases and their inhibitors in intervertebral disc aging and degeneration. *Spine J.* **2013**, *13*, 331–341, doi:10.1016/j.spinee.2012.02.027.
255. Maitre, C.L. Le; Pockert, A.; Buttle, D.J.; Freemont, A.J.; Hoyland, J.A. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. **2007**, *35*, 652–655.
256. Zigouris, A.; Alexiou, G.A.; Batistatou, A.; Voulgaris, S.; Kyritsis, A.P. The role of matrix metalloproteinase 9 in intervertebral disc degeneration. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* **2011**, *18*, 1424–1425, doi:10.1016/j.jocn.2011.01.036.
257. Wang, X.; Wang, H.; Yang, H.; Li, J.; Cai, Q.; Shapiro, I.M.; Risbud, M. V. Tumor necrosis factor- α - and interleukin-1 β -dependent matrix metalloproteinase-3 expression in nucleus pulposus cells requires cooperative signaling via syndecan 4 and mitogen-activated protein kinase-NF- κ B axis: Implications in inflammatory disc disease. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 2560–2572, doi:10.1016/j.ajpath.2014.06.006.
258. Zhao, C.-Q.; Zhang, Y.-H.; Jiang, S.-D.; Li, H.; Jiang, L.-S.; Dai, L.-Y. ADAMTS-5 and intervertebral disc degeneration: the results of tissue immunohistochemistry and in vitro cell culture. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **2011**, *29*, 718–725, doi:10.1002/jor.21285.
259. Seki, S.; Asanuma-Abe, Y.; Masuda, K.; Kawaguchi, Y.; Asanuma, K.; Muehleman, C.; Iwai, A.; Kimura, T. Effect of small interference RNA (siRNA) for ADAMTS5 on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular needle-puncture model. *Arthritis Res. Ther.* **2009**, *11*, 1–10, doi:10.1186/ar2851.
260. Kouri, V.-P.; Olkkonen, J.; Nurmi, K.; Peled, N.; Ainola, M.; Mandelin, J.; Nordström, D.C.; Eklund, K.K. IL-17A and TNF synergistically drive expression of proinflammatory mediators in synovial fibroblasts via I κ B ζ -dependent induction of ELF3. *Rheumatology (Oxford)*. **2023**, *62*, 872–885, doi:10.1093/rheumatology/keac385.

261. Francisco, V.; Ait Eldjoudi, D.; González-Rodríguez, M.; Ruiz-Fernández, C.; Cordero-Barreal, A.; Marques, P.; Sanz, M.J.; Real, J.T.; Lago, F.; Pino, J.; et al. Metabolomic signature and molecular profile of normal and degenerated human intervertebral disc cells. *Spine J.* **2023**, doi:<https://doi.org/10.1016/j.spinee.2023.06.005>.
262. Segar, A.H.; Fairbank, J.C.T.; Urban, J. Leptin and the intervertebral disc: a biochemical link exists between obesity, intervertebral disc degeneration and low back pain—an in vitro study in a bovine model. *Eur. Spine J.* **2019**, *28*, 214–223, doi:[10.1007/s00586-018-5778-7](https://doi.org/10.1007/s00586-018-5778-7).
263. Flynn, M.M.; Tierney, A.; Itsiopoulos, C. Is Extra Virgin Olive Oil the Critical Ingredient Driving the Health Benefits of a Mediterranean Diet? A Narrative Review. *Nutrients* **2023**, *15*, doi:[10.3390/nu15132916](https://doi.org/10.3390/nu15132916).
264. Scotece, M.; Gomez, R.; Conde, J.; Lopez, V.; Gomez-Reino, J.J.; Lago, F.; Smith III, A.B.; Gualillo, O. Oleocanthal Inhibits Proliferation and MIP-1 α ; Expression in Human Multiple Myeloma Cells. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2467–2475, doi:[10.2174/0929867311320190006](https://doi.org/10.2174/0929867311320190006).
265. Sakalyte, R.; Denkovskij, J.; Bernotiene, E.; Stropuviene, S.; Mikulenaite, S.O.; Kvederas, G.; Porvaneckas, N.; Tutkus, V.; Venalis, A.; Butrimiene, I. The Expression of Inflammasomes NLRP1 and NLRP3, Toll-Like Receptors, and Vitamin D Receptor in Synovial Fibroblasts From Patients With Different Types of Knee Arthritis. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 767512, doi:[10.3389/fimmu.2021.767512](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.767512).
266. Cavalli, G.; Colafrancesco, S.; Emmi, G.; Imazio, M.; Lopalco, G.; Maggio, M.C.; Sota, J.; Dinarello, C.A. Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* **2021**, *20*, 102763, doi:[10.1016/j.autrev.2021.102763](https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102763).
267. Longoni, N.; Sarti, M.; Albino, D.; Civenni, G.; Malek, A.; Orтели, E.; Pinton, S.; Mello-Grand, M.; Ostano, P.; D'Ambrosio, G.; et al. ETS transcription factor ESE1/ELF3 orchestrates a positive feedback loop that constitutively activates NF- κ B and drives prostate cancer progression. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4533–4547, doi:[10.1158/0008-5472.CAN-12-4537/651109/AM/ETS-TRANSCRIPTION-FACTOR-ESE1-ELF3-ORCHESTRATES-A](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4537/651109/AM/ETS-TRANSCRIPTION-FACTOR-ESE1-ELF3-ORCHESTRATES-A).
268. Alba, G.; Dakhaoui, H.; Santa-Maria, C.; Palomares, F.; Cejudo-Guillen, M.; Geniz, I.; Sobrino, F.; Montserrat-de la Paz, S.; Lopez-Enriquez, S. Nutraceuticals as Potential Therapeutic Modulators in Immunometabolism. *Nutrients* **2023**, *15*, doi:[10.3390/nu15020411](https://doi.org/10.3390/nu15020411).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la columna vertebral y los subtipos de vértebras existentes, junto con la representación de una vértebra tipo y sus partes en vista lateral y superior.	27
Figura 2. Esquema de la estructura del disco intervertebral.	28
Figura 3. Representación gráfica del desarrollo de las vértebras y los discos intervertebrales a partir de la notocorda y el esclerotoma.	29
Figura 4. Disco intervertebral sano.	31
Figura 5. Composición del disco intervertebral a nivel tisular y anatómico.	32
Figura 6. Porcentaje de composición de la matriz extracelular en el núcleo pulposo (NP) y anillo fibroso (AF) de disco intervertebral sano.	33
Figura 7. Prevalencia estandarizada del dolor lumbar por país en 2020.	35
Figura 8. Escala de Pffirman representada con resonancias magnéticas de paciente.	37
Figura 9. Discos intervertebrales procedentes de cadáveres seccionados en plano sagital medio.	38
Figura 10. Representación de los cambios de composición según el estado patológico del disco intervertebral.	39
Figura 11. Esquema gráfico sobre la implicación de las MMPs y ADAMTSs en la degeneración de disco.	42
Figura 12. Principales factores de riesgo y desencadenantes de la enfermedad de degeneración de disco intervertebral.	43
Figura 13. Función de resistencia del agregano y el colágeno en el disco intervertebral.	44
Figura 14. Representación esquemática de la estructura y cambios en la función sensorial del sistema nervioso en la degeneración de disco intervertebral.	45
Figura 15. Anatomía y fisiopatología del disco intervertebral degenerado y sano.	48
Figura 16. Leptina aumenta en obesidad e incrementa la inflamación de bajo grado y respuesta metabólica.	51
Figura 17. Representación esquemática del funcionamiento de ELF3 en cartílago articular.	59

Figura 18. Esquema de la vía de señalización canónica de NFκB.	61
Figura 19. Representación esquemática de los efectos transcripcionales de los glucocorticoides.	64
Figura 20. Estructura química del oleocanthal.	67
Figura 21. Representación esquemática de la actividad antiinflamatoria del oleocanthal (OC).	68
Figura 22. Efecto del oleocanthal en macrófagos y condrocitos estimulados con LPS	71
Figura 23. Vista de células de disco degenerado a microscopio óptico 40x.	80
Figura 24. Esquema representativo del protocolo de procesado de una muestra de disco intervertebral.	81
Figura 25. Representación gráfica del protocolo de transformación de bacterias competentes.....	87
Figura 26. Reducción enzimática de 4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) a sal de formazán [220].	89
Figura 27. Ejemplo de recta patrón para la determinación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford.	91
Figura 28. Esquema del protocolo de Western Blot.	92
Figura 29. Gráfico de dispersión de puntos del modelo PCA de muestras de células en los diferentes grupos experimentales.	104
Figura 30. Gráfico de dispersión de puntos del modelo OPLS-DA de muestras celulares de disco intervertebral sano (blanco) y degenerado (azul).....	104
Figura 31. Diagrama de dispersión de cargas del modelo OPLS-DA de muestras de disco intervertebral.	105
Figura 32. Representación en mapa de calor (heatmap) de los metabolitos obtenidos por HPLC-MS para las diferentes muestras de disco sanas y degeneradas	107
Figura 33. Niveles de los metabolitos indicados en disco intervertebral degenerado (n=10, 5 hombres, 5 mujeres) y en el disco intervertebral sano (n=5).	109
Figura 34. Comparación del perfil de expresión de ARN mensajero en disco sano (NP sano y AF sano) y disco degenerado.....	110
Figura 35. Representación en mapa de calor de la comparación del perfil de expresión de ARN mensajero en disco sano (NP sano y AF sano) y disco degenerado.	111

Figura 36. Mapa de calor de los diferentes perfiles de expresión génica de núcleo pulposo, anillo fibroso en células de disco sano y células de disco degenerado estimuladas con IL-1 β y leptina.....	112
Figura 37. Niveles de expresión de ARNm en el núcleo pulposo y anillo fibroso de células de disco sano y células de disco degenerado en respuesta a tratamientos con IL-1 β y leptina.....	113
Figura 38. Niveles de expresión de proteína en anillo fibroso de células de disco degenerado estimuladas con IL-1 β y leptina.	114
Figura 39. Localización de ELF3 en tejido de disco intervertebral sano y degenerado.	117
Figura 40. La expresión de ELF3 está aumentada en células de disco intervertebral degenerado.....	118
Figura 41. El LPS y la IL-1 α aumentan la expresión de ELF3 en células de disco intervertebral sano.	118
Figura 42. El LPS y la IL-1 α aumentan la expresión del ARNm de ELF3 en células de disco intervertebral degenerado.....	119
Figura 43. Comparación de la expresión de diversos genes en disco degenerado tras la estimulación con IL-1 α e IL-1 β	120
Figura 44. Comprobación de la expresión de genes inflamatorios y catabólicos inducidos por IL-1 α en disco intervertebral degenerado.....	121
Figura 45. Expresión de diversos genes proinflamatorios en experimentos tiempo respuesta a IL-1 α	122
Figura 46. La dexametasona disminuye la expresión de ARNm de ELF3 en células de disco intervertebral degenerado (A) y sano (B) en respuesta a estímulos proinflamatorios.....	123
Figura 47. La dexametasona disminuye la expresión proteica de ELF3 en células de disco intervertebral degenerado en respuesta a estímulos proinflamatorios.	124
Figura 48. La dexametasona disminuye la expresión de genes inflamatorios y catabólicos en células de disco intervertebral degenerado en respuesta a estímulos proinflamatorios.	124
Figura 49. La expresión de leptina se ve disminuida en disco degenerado, y los niveles de su receptor permanecen invariables.	125
Figura 50. La combinación IL-1 α y leptina no muestran variaciones significativas en la expresión de ELF3.....	126
Figura 51. La sobreexpresión del gen ELF3 en células de AF sanas aumenta la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz.....	128

Figura 52. La sobreexpresión del gen ELF3 en células de AF degeneradas aumenta la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz.	129
Figura 53. La sobreexpresión del gen ELF3 en combinación con IL-1 α 0.1ng/ml en células de AF sanas aumenta la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz.	131
Figura 54. La sobreexpresión del gen ELF3 en combinación con IL-1 α 0.1ng/ml en células de AF degeneradas aumenta la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz.	132
Figura 55. La sobreexpresión del gen ELF3 en combinación con IL-1 α en células de AF degeneradas aumenta la expresión proteica de genes inflamatorios y de degeneración de matriz	133
Figura 56. Niveles de expresión de ELF3 en disco degenerado tras el silenciamiento del gen ELF3.	134
Figura 57. El silenciamiento del gen ELF3 en células de AF degeneradas disminuye la expresión de genes inflamatorios y de degeneración de matriz (solo y en combinación con IL-1 α).	135
Figura 58. El silenciamiento del gen ELF3 en células de AF degeneradas disminuye la expresión proteica de genes inflamatorios y de degeneración de matriz (solo y en combinación con IL-1 α).	136
Figura 59. El oleocanthal no afecta a la viabilidad celular en disco degenerado.	139
Figura 60. Oleocanthal disminuye la expresión de genes involucrados en la inflamación y el catabolismo de matriz inducida por la estimulación con LPS.	141
Figura 61. Oleocanthal disminuye la expresión proteica de genes involucrados en la inflamación inducidos por la estimulación con LPS.	142
Figura 62. Oleocanthal regula la activación de la vía de NF κ B inducida por el LPS.	143
Figura 63. Representación esquemática del efecto del oleocanthal sobre la vía de señalización NF κ B.	144
Figura 64. El oleocanthal no afecta a la viabilidad celular en disco degenerado.	145
Figura 65. Oleocanthal disminuye la expresión de genes involucrados en la inflamación y el catabolismo de matriz inducida por la estimulación con IL-1 α	146
Figura 66. Oleocanthal disminuye la expresión proteica de genes involucrados en la inflamación inducidos por la estimulación con IL-1 α	147
Figura 67. Oleocanthal regula la activación de la vía de NF κ B inducida por IL-1 α	148



Anexos

ANEXOS

9.1 DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 22 de junio de 2017 el estudio:

Título: Papel de las adipokinas, de los factores neuroendocrinos y de las nuevas citokinas en la degeneración del disco intervertebral (DDIV)

Promotor: Jesús Pino Mínguez, Oreste Gualillo

Tipo de estudio: Outros

Versión:

Código del Promotor:

Código de Registro: 2017/279

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humana, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Postautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y la Circular nº 07/2004, de investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos da Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del estudio **por el/la investigador/a del centro:**

Centros	Investigadores Principales
IDIS-CHUS	Jesús Pino Mínguez, Oreste Gualillo

En Santiago de Compostela, a 30 de junio 2017.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



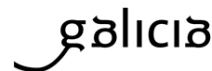
firmado digitalmente por: guillermo.jose.prada.ramallal@sergas.es
Fecha: 2017.06.29 15:38:20 +02'00'

Guillermo José Prada Ramallal





Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Concellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881546425. Correo-e: ceic@sergas.es



Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes (RD 1090/2015 de ensayos clínicos, y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

- **Juan Manuel Vázquez Lago (Presidente)**. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Guillermo José Prada Ramallal (Secretario)**. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Ramón Domínguez.
- **Lorenzo Armenteros del Olmo (Vicesecretario)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Francisco Campos Pérez**. Biólogo. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Rosana Castelo Domínguez**. Farmacéutica de Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Ricardo García Martínez**. Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Jaime Gulín Dávila**. Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Victor Herrán Carreira**. Paciente. ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
- **María Jesús Lamas Díaz**. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Carlos Rodríguez Moreno**. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Rafael Carlos Vidal Pérez**. Médico especialista en Cardiología. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **María Jesús Wandosell Picatoste**. Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor/investigador, en Santiago de Compostela, a 30 de junio de 2017.

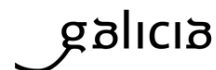
El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



Firmado digitalmente por: guillermo.jose.prada.ramallal@sergas.es
Fecha: 2017.06.29 15:38:24 +02'00'

Guillermo José Prada Ramallal





DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 25 de mayo de 2021 la modificación del estudio:

Título: Papel de las adipokinas, de los factores neuroendocrinos y de las nuevas citokinas en la degeneración del disco intervertebral (DDIV)

Versión modificación: modificación Abril 2021

Promotor/a: Jesús Pino Mínguez, Oreste Gualillo

Investigador/a: Jesús Pino Mínguez, Oreste Gualillo

Código de Registro: 2017/279

Y que este Comité acepta de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, que dicha modificación sea incorporada al estudio de investigación mencionado.

Documento asinado dixitalmente por:
Ana Estany Gestal (02/06/2021 10:45)
<https://sede.xunta.gal/cve?dcve=SAOC-3JAG4-BOAH-OF40-TAHT-6K79-EDB6-D162-2623-7602-71>



NOTA: Se le recuerda que en el caso de que en este estudio se recluten pacientes, el equipo investigador debe tener disponible el Documento de Consentimiento Informado (Hojas de Información y Hojas de Firma) tanto en *galego* como en castellano en el momento de comenzar el reclutamiento.





Y HACE CONSTAR QUE:

- 1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes.
- 2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

Vicepresidenta

Pilar Rodríguez Ledo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Secretaria

Ana Estany Gestal. Licenciada en Farmacia.

Vicesecretaria

María Mercedes Rodicio García. Médico especialista en Pediatría.

Vocales

Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.

Beatriz Bernardez Ferrán. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria

Cristina Blanco Freire. Enfermera.

Francisco Campos Pérez. Licenciado en Biología.

Jesús Fernández Álvarez. Miembro lego.

Ricardo García Martínez. Licenciado en Derecho.

Eva Marcos Doldán. Analista-programadora.

Jesús Prego Domínguez. Enfermero.

Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica.

Juan Manuel Vázquez Lago. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.

Para que conste donde proceda, y a petición de quien proceda, en Santiago de Compostela,
La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



9.2 PERMISOS PARA LA UTILIZACIÓN DE FIGURAS CON COPYRIGHT EN ESTA TESIS.

Figura 5. Composición del disco intervertebral a nivel tisular y anatómico.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 27, 2024

This Agreement between María González Rodríguez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5598771427993
License date	Jul 30, 2023
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	World Neurosurgery
Licensed Content Title	Fundamentals of Intervertebral Disc Degeneration
Licensed Content Author	Sertac Kirnaz, Charisse Capadona, Taylor Wong, Jacob L. Goldberg, Branden Medary, Fabian Sommer, Lynn B. McGrath, Roger Härtl
Licensed Content Date	Jan 1, 2022
Licensed Content Volume	157
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	10
Start Page	264
End Page	273
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of translations	1
Title	EFFECTOS INMUNOMETABÓLICOS EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DEGENERATIVOS E INFLAMATORIOS DEL DISCO INTERVERTEBRAL
Institution name	Universidad de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2024
Portions	Figures 1 and 2
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	María González Rodríguez Calle varela de montes, 7 santiago de compostela, 15706 Spain Attn: IDIS
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at <https://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given. The material may not be reproduced or used in any other way, including use in combination with an artificial intelligence tool (including to train an algorithm, test, process, analyse, generate output and/or develop any form of artificial intelligence tool), or to create any derivative work and/or service (including resulting from the use of artificial intelligence tools).
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.
16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.
Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each

image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.10

Questions? E-mail us at customercare@copyright.com.

Figura 9. Discos intervertebrales procedentes de cadáveres seccionados en plano sagital medio./Figura 13. Función de resistencia del agregano y el colágeno en el disco intervertebral.

WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 27, 2024

This Agreement between María González Rodríguez ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	5598260686351
License date	Jul 29, 2023
Licensed Content Publisher	Wolters Kluwer Health, Inc.
Licensed Content Publication	Spine
Licensed Content Title	What is Intervertebral Disc Degeneration, and What Causes It?
Licensed Content Author	Michael Adams and Peter Roughley
Licensed Content Date	Aug 15, 2006
Licensed Content Volume	31
Licensed Content Issue	18
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/College
Sponsorship	No Sponsorship
Format	Print and electronic
Will this be posted online?	Yes, on a secure website
Portion	Figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Author of this Wolters Kluwer article	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Intend to modify/change the content	No
Title	EFFECTOS INMUNOMETABÓLICOS EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DEGENERATIVOS E INFLAMATORIOS DEL DISCO INTERVERTEBRAL
Institution name	Universidad de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2024
Portions	Figure 2 and 6
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	María González Rodríguez Calle varela de montes, 7 santiago de compstela, 15706 Spain Attn: IDIS
Publisher Tax ID	EU826013006
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Wolters Kluwer Health Inc. Terms and Conditions



1. **Duration of License:** Permission is granted for a one time use only. Rights herein do not apply to future reproductions, editions, revisions, or other derivative works. This permission shall be effective as of the date of execution by the parties for the maximum period of 12 months and should be renewed after the term expires.
 - i. When content is to be republished in a book or journal the validity of this agreement should be the life of the book edition or journal issue.
 - ii. When content is licensed for use on a website, internet, intranet, or any publicly accessible site (not including a journal or book), you agree to remove the material from such site after 12 months, or request to renew your permission license
2. **Credit Line:** A credit line must be prominently placed and include: For book content: the author(s), title of book, edition, copyright holder, year of publication; For journal content: the author(s), titles of article, title of journal, volume number, issue number, inclusive pages and website URL to the journal page; If a journal is published by a learned society the credit line must include the details of that society.
3. **Warranties:** The requestor warrants that the material shall not be used in any manner which may be considered derogatory to the title, content, authors of the material, or to Wolters Kluwer Health, Inc.
4. **Indemnity:** You hereby indemnify and hold harmless Wolters Kluwer Health, Inc. and its respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims, costs, proceeding or demands arising out of your unauthorized use of the Licensed Material
5. **Geographical Scope:** Permission granted is non-exclusive and is valid throughout the world in the English language and the languages specified in the license.
6. **Copy of Content:** Wolters Kluwer Health, Inc. cannot supply the requestor with the original artwork, high-resolution images, electronic files or a clean copy of content.
7. **Validity:** Permission is valid if the borrowed material is original to a Wolters Kluwer Health, Inc. imprint (J.B Lippincott, Lippincott-Raven Publishers, Williams & Wilkins, Lea & Febiger, Harwal, Rapid Science, Little Brown & Company, Harper & Row Medical, American Journal of Nursing Co, and Urban & Schwarzenberg - English Language, Raven Press, Paul Hoeber, Springhouse, Ovid), and the Anatomical Chart Company
8. **Third Party Material:** This permission does not apply to content that is credited to publications other than Wolters Kluwer Health, Inc. or its Societies. For images credited to non-Wolters Kluwer Health, Inc. books or journals, you must obtain permission from the source referenced in the figure or table legend or credit line before making any use of the image(s), table(s) or other content.
9. **Adaptations:** Adaptations are protected by copyright. For images that have been adapted, permission must be sought from the rightsholder of the original material and the rightsholder of the adapted material.
10. **Modifications:** Wolters Kluwer Health, Inc. material is not permitted to be modified or adapted without written approval from Wolters Kluwer Health, Inc. with the exception of text size or color. The adaptation should be credited as follows: Adapted with permission from Wolters Kluwer Health, Inc.: [the author(s), title of book, edition, copyright holder, year of publication] or [the author(s), titles of article, title of journal, volume number, issue number, inclusive pages and website URL to the journal page].
11. **Full Text Articles:** Republication of full articles in English is prohibited.
12. **Branding and Marketing:** No drug name, trade name, drug logo, or trade logo can be included on the same page as material borrowed from *Diseases of the Colon & Rectum*, *Plastic Reconstructive Surgery*, *Obstetrics & Gynecology (The Green Journal)*, *Critical Care Medicine*, *Pediatric Critical Care Medicine*, *the American Heart Association publications* and *the American Academy of Neurology publications*.
13. **Open Access:** Unless you are publishing content under the same Creative Commons license, the following statement must be added when reprinting material in Open Access journals: "The Creative Commons license does not apply to this content. Use of the material in any format is prohibited without written permission from the publisher, Wolters Kluwer Health, Inc. Please contact permissions@lww.com for further information."
14. **Translations:** The following disclaimer must appear on all translated copies: Wolters Kluwer Health, Inc. and its Societies take no responsibility for the accuracy of the translation from the published English original and are not liable for any errors which may occur.
15. **Published Ahead of Print (PAP):** Articles in the PAP stage of publication can be cited using the online publication date and the unique DOI number.
 - i. Disclaimer: Articles appearing in the PAP section have been peer-reviewed and accepted for publication in the relevant journal and posted online before print publication. Articles appearing as PAP may contain statements, opinions, and information that have errors in facts, figures, or interpretation. Any final changes in manuscripts will be made at the time of print publication and will be reflected in the final electronic version of the issue. Accordingly, Wolters Kluwer Health, Inc., the editors, authors and their respective employees are not responsible or liable for the use of any such inaccurate or misleading data, opinion or information contained in the articles in this section.
16. **Termination of Contract:** Wolters Kluwer Health, Inc. must be notified within 90 days of the original license date if you opt not to use the requested material.
17. **Waived Permission Fee:** Permission fees that have been waived are not subject to future waivers, including similar requests or renewing a license.
18. **Contingent on payment:** You may exercise these rights licensed immediately upon issuance of the license, however until full payment is received either by the publisher or our authorized vendor, this license is not valid. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of Wolters

Kluwer Health, Inc.'s other billing and payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

19. **STM Signatories Only:** Any permission granted for a particular edition will apply to subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and do not involve the separate exploitation of the permitted illustrations or excerpts. Please view: [STM Permissions Guidelines](#)
20. **Warranties and Obligations:** LICENSOR further represents and warrants that, to the best of its knowledge and belief, LICENSEE's contemplated use of the Content as represented to LICENSOR does not infringe any valid rights to any third party.
21. **Breach:** If LICENSEE fails to comply with any provisions of this agreement, LICENSOR may serve written notice of breach of LICENSEE and, unless such breach is fully cured within fifteen (15) days from the receipt of notice by LICENSEE, LICENSOR may thereupon, at its option, serve notice of cancellation on LICENSEE, whereupon this Agreement shall immediately terminate.
22. **Assignment:** License conveyed hereunder by the LICENSOR shall not be assigned or granted in any manner conveyed to any third party by the LICENSEE without the consent in writing to the LICENSOR.
23. **Governing Law:** The laws of The State of New York shall govern interpretation of this Agreement and all rights and liabilities arising hereunder.
24. **Unlawful:** If any provision of this Agreement shall be found unlawful or otherwise legally unenforceable, all other conditions and provisions of this Agreement shall remain in full force and effect.

For Copyright Clearance Center / RightsLink Only:

1. **Service Description for Content Services:** Subject to these terms of use, any terms set forth on the particular order, and payment of the applicable fee, you may make the following uses of the ordered materials:
 - i. **Content Rental:** You may access and view a single electronic copy of the materials ordered for the time period designated at the time the order is placed. Access to the materials will be provided through a dedicated content viewer or other portal, and access will be discontinued upon expiration of the designated time period. An order for Content Rental does not include any rights to print, download, save, create additional copies, to distribute or to reuse in any way the full text or parts of the materials.
 - ii. **Content Purchase:** You may access and download a single electronic copy of the materials ordered. Copies will be provided by email or by such other means as publisher may make available from time to time. An order for Content Purchase does not include any rights to create additional copies or to distribute copies of the materials

Other Terms and Conditions:

v1.18

Questions? E-mail us at customercare@copyright.com.

Figura 14. Representación esquemática de la estructura y cambios en la función sensorial del sistema nervioso en la degeneración de disco intervertebral.

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 27, 2024

This Agreement between María González Rodríguez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5598270689808
License date	Jul 29, 2023
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Osteoarthritis and Cartilage
Licensed Content Title	The role of structure and function changes of sensory nervous system in intervertebral disc-related low back pain
Licensed Content Author	S. Zhang,B. Hu,W. Liu,P. Wang,X. Lv,S. Chen,Z. Shao
Licensed Content Date	Jan 1, 2021
Licensed Content Volume	29
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	11
Start Page	17
End Page	27
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of translations	1
Title	EFFECTOS INMUNOMETABÓLICOS EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DEGENERATIVOS E INFLAMATORIOS DEL DISCO INTERVERTEBRAL
Institution name	Universidad de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2024
Portions	Figure 2
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	María González Rodríguez Calle varela de montes, 7 santiago de compsotela, 15706 Spain Attn: IDIS
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at <https://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS



2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given. The material may not be reproduced or used in any other way, including use in combination with an artificial intelligence tool (including to train an algorithm, test, process, analyse, generate output and/or develop any form of artificial intelligence tool), or to create any derivative work and/or service (including resulting from the use of artificial intelligence tools).
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.
16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.
Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each

image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.10

Questions? E-mail us at customercare@copyright.com.

Figura 17. Representación esquemática del funcionamiento de ELF3 en cartílago articular.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 26, 2024

This Agreement between María González Rodríguez ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5691431060207
License date	Dec 17, 2023
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Physiology
Licensed Content Title	E74-like factor 3 and nuclear factor-κB regulate lipocalin-2 expression in chondrocytes
Licensed Content Author	Javier Conde, Miguel Otero, Morena Scotece, et al
Licensed Content Date	Jul 18, 2016
Licensed Content Volume	594
Licensed Content Issue	21
Licensed Content Pages	14
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title of new work	EFEITOS INMUNOMETABÓLICOS EN LA REGULACIÓN DE LOS PROCESOS DEGENERATIVOS E INFLAMATORIOS DEL DISCO INTERVERTEBRAL
Institution name	Universidad de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jan 2024
Portions	Figure 7
Requestor Location	María González Rodríguez Calle varela de montes, 7 Santiago de Compostela , 15706 Spain Attn: IDIS
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This



license, and any **CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.

- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the STM Permissions Guidelines only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts**, You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? E-mail us at customer-care@copyright.com.

9.3 PUBLICACIONES CON DATOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

Metabolomic signature and molecular profile of normal and degenerated human intervertebral disc cells

Vera Francisco^{a,b}; Djedjiga Ait Eldjoudi^b; **María González-Rodríguez^b**; Clara Ruiz-Fernández^b; Alfonso Cordero-Barreal^b; Patrice Marques^c; Maria Jesus Sanz^{c,d}; José T. Real^{a,d,e}; Francisca Lago^f; Jesús Pino^{b,*}; Yousof Farrag^b; Oreste Gualillo^b.

Afiliaciones:

^a Institute of Health Research INCLIVA and Endocrinology and Nutrition Service, University Clinic Hospital of Valencia, Calle Menéndez y Pelayo 4, 46010 Valencia, Spain

^b SERGAS (Servizo Galego de Saude) and IDIS (Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago), NEIRID Lab (Neuroendocrine Interactions in Rheumatology and Inflammatory Diseases), Research Laboratory 9, Santiago University Clinical Hospital, Tr. da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain

^c University Clinic Hospital of Valencia and Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Odontology, Institute of Health Research INCLIVA, University of Valencia, Calle Menéndez y Pelayo, nº 4, 46010 Valencia, Spain

^d CIBERDEM - Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders, ISCIII, Av. Monforte de Lemos, 3-5, 28029 Madrid, Spain

^e Department of Medicine, Faculty of Medicine and Odontology, University of Valencia, Av. de Blasco Ibáñez, nº 15, 46010 Valencia, Spain

^f SERGAS (Servizo Galego de Saude) and IDIS (Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago), Molecular and Cellular Cardiology Lab, Research Laboratory 7, Santiago University Clinical Hospital, Tr. da Choupana s/n, 15706 Santiago de Compostela, Spain

Fecha de recepción: 20 de diciembre de 2022.

Fecha de revisión: 2 de mayo de 2023.

Fecha de aceptación: 3 de junio de 2023.

Fecha de publicación: 18 de junio de 2023.

Francisco, V., Ait Eldjoudi, D., González-Rodríguez, M., Ruiz-Fernández, C., Cordero-Barreal, A., Marques, P., Sanz, M. J., Real, J. T., Lago, F., Pino, J., Farrag, Y., & Gualillo, O. (2023). Metabolomic signature and molecular profile of normal and degenerated human intervertebral disc cells. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*, 23(10), 1549–1562. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2023.06.005>

The Spine Journal: ISSN impreso: 1529-9430 / ISSN online: 1878-1632 © 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Derechos de autor de la revista “*The Spine Journal*”: Como autora de este artículo de Elsevier, donde se ha publicado el Capítulo I, la revista permite la reutilización del artículo por parte de la autora como parte de su tesis. Por lo tanto, no se requiere permiso. Para más información: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

Contribución de la autora María González-Rodríguez: Trabajo experimental, análisis de datos y redacción del manuscrito.

2022 JCR The Spine Journal impact factor: **4,5**.

Orthopedics 10/86 – Q1

Clinical Neurology 55/212 – Q2



Metabolomic signature and molecular profile of normal and degenerated human intervertebral disc cells

Author:

Vera Francisco,Djedjiga Ait Eldjoudi,María González-Rodríguez,Clara Ruiz-Fernández,Alfonso Cordero-Barreal,Patrice Marques,María Jesus Sanz,José T. Real,Franisca Lago,Jesus Pino,Yousof Farrag,Oreste Gualillo

Publication: The Spine Journal

Publisher: Elsevier

Date: October 2023

© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW



La degeneración de disco intervertebral (DDI), un trastorno patológico que causa dolor en la espalda o el cuello debido al deterioro de los discos vertebrales, es una enfermedad huérfana sin opciones terapéuticas efectivas. Esta tesis destaca la importancia de comprender los procesos subyacentes a la DDI y presenta un análisis detallado del perfil metabolómico y molecular de células de discos intervertebrales sanas y degeneradas. Se describe el papel del factor de transcripción ELF3 en la degeneración, revelando su aumento en respuesta a factores inflamatorios y su contribución a procesos catabólicos celulares. Además, se explora el potencial farmacológico de moléculas como el oleocanthal para regular la expresión de ELF3, destacando su potencial en el tratamiento de la inflamación y catabolismo en el disco intervertebral.