



Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía

TESIS DOCTORAL

Modelo de degeneración discal en cola de rata:
aislamiento vascular de los platillos vertebrales.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de
Compostela por el licenciado Juan Pablo Pardo Seco

Santiago de Compostela, Abril 2013



Disertación de la Facultad de Medicina y Odontología,
Universidad de Santiago de Compostela, España
Juan Pablo Pardo Seco (jppardos@gmail.com)
Modulación del proceso de degeneración de disco intervertebral en cola de rata
Santiago de Compostela, Abril de 2013

José Couceiro Follente, profesor titular, y Máximo Alberto Díez Ulloa, profesor asociado de la Universidad de Santiago de Compostela

CERTIFICAN

que la presente memoria, titulada “*Modelo de degeneración discal en cola de rata: aislamiento vascular de los platillos vertebrales*”, fue realizada por Juan Pablo Pardo Seco bajo su dirección, y que concluye la Tesis que presenta para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y, para que así conste, firman la presente en Santiago de Compostela a 29 de Abril de 2013.

Fdo. José Couceiro Follente

Fdo. Máximo Alberto Díez Ulloa

A mi mujer, Elena.

A ella le debo todo. Todo lo que soy, todo lo que tengo y todo a lo que
aspiro.

Y a mis hijos, el sol de cada mañana. Sin ellos este trabajo hubiera
finalizado mucho antes.

La espera ha merecido la pena.

Agradecimientos

A mi director de tesis el Dr. MAD Ulloa por su persistencia en avanzar en este proyecto, la paciencia que ha demostrado tener con su doctorando y pupilo y el inagotable esfuerzo que ha realizado para llevar a cabo este trabajo. También gracias por su idea.

Al Prof. Dr. José Couceiro porque a él le debo mi formación como especialista en Traumatología y Cirugía Ortopédica y por su ánimo para el desarrollo de la labor investigadora además de la asistencial.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario por su inestimable ayuda, sin la cual este proyecto no hubiera llegado a puerto; especialmente al Prof. Dr. Jerónimo Forteza y al Prof. Dr. José Ramón Antúnez, cuyo tiempo de trabajo han ocupado en mi proyecto de forma completamente desinteresada.

A María Jesús Vázquez, por su participación en el manejo de los animales de experimentación, aún restándole horas de dedicación a la realización de su propia labor investigadora en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina.

A mi suegro el Prof. Dr. Pérez Villar por su insistencia (muchísima insistencia, obstinación dirían algunos) en que su yerno realizara este trabajo y por el orgullo que demuestra y transmite por pertenecer a la Universidad de Santiago de Compostela .

A mis padres, Fernando y Mercedes, que tantas facilidades me han dado en la vida para poder prepararme para el futuro, para hoy. Ellos me han enseñado a no cejar en el esfuerzo.



ÍNDICE.....	xi
-------------	----

INDICE

1. Introducción	1
1.1. El problema del dolor lumbar	1
1.2. Disco intervertebral	4
1.2.1. Histología	4
1.2.2. Metabolismo	6
1.2.3. Marcadores moleculares.....	6
1.3. Degeneración discal	7
1.4. Relación entre daño tisular y dolor	14
1.5. Modelos terapéuticos en estudio.....	17
1.6. Modelo vascular de degeneración fisiológica	20
1.7. Alteraciones patológicas de la vascularización	21
1.7.1. In vivo	21
1.7.2. In vitro	22
1.8. Hipótesis	24
1.9. Objetivos	24

2. Material y métodos	27
2.1. Modelo experimental	28
2.2. Métodos de medición de degeneración	34
3. Resultados	35
3.1. Van Gieson	35
3.2. Inmunohistoquímica	40
4. Discusión	43
5. Conclusiones	55
APÉNDICE	57
BIBLIOGRAFÍA	69

Lista de figuras y tablas

Figura 1. Imagen de RM en T2 con degeneración en el disco entre las vértebras L5 S1 con rotura radial del anillo fibroso	11
Figura 2. Grados de degeneración discal según cambios en el anillo fibroso	13
Figura 3. Esquema de discos intervenidos en la longitud de la cola de la rata; rojo: platillo con aislamiento del cuerpo vertebral y sellado con sustancia inerte; azul: platillo con aislamiento sin sellado	29
Figura 4. Fotos de la cola de rata antes y después del abordaje de la columna vertebral	30
Figura 5. Foto de la cola de rata tras realizar las separaciones de los platillos vertebrales respecto a los discos anexos	31
Figura 6. A y B. Discos cultivados durante 1 semana en DMEM. Observación a 5 aumentos. C y D. discos fijados en fresco. C en 10 aumentos y D en 5 aumentos	38
Figura 7. Resultados del grado de degeneración obtenido para cada grupo de muestras (según el tiempo transcurrido entre intervención y extracción para estudio) respecto al tipo de intervención realizada	40
Figura 8. Promedio(media aritmética) de todas las observaciones realizadas en los periodos de 2, 4, 6, 8 meses	41
Figura 9. Media aritmética (promedio) correspondiente a la serie de datos de 2, 4, 6, y 8 meses para cada técnica	41

Figura 10. Grado de degeneración discal según tipo de intervención realizada en los
platos anexos42

Figura 11. 2 meses/ Intervención A/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado
3.....65

Figura 12. 2 meses/ Intervención A/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado
3.....65

Figura 13. 6 meses/ Intervención B/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 5
.....66

Figura 14. 6 meses/ Intervención B/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 5
.....66

Figura 15. 2 meses/ Intervención C/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 1
.....67

Figura 16. 2 meses/ Intervención C/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 1
.....67

Figura 17. 8 meses/ Intervención D/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 2
.....68

Figura 18. 8 meses/ Intervención D/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 2
.....68

Figura 19. 4 meses/ Intervención E/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 1
.....69

Figura 20. 4 meses/ Intervención E/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 1
.....69

ÍNDICE.....xv

Figura 21. Promedio del grado de marcado de colágeno VI de todas las observaciones realizadas en los periodos de 2, 4, 6 y 8 meses45

Figura 22. Intensidad de marcado con anticuerpos de colágeno VI según tipo de intervención realizada46

Figura 23. 6 meses / Intervención D/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado ++70

Figura 24. 2 meses / Intervención B/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado ++70

Figura 25. 4 meses / intervención D/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado +71

Figura 26. 6 meses/ Intervención C/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado +71

Figura 27. 2 meses / Intervención B / Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado –72

Figura 28. 3 meses / Intervención C/ Inmunohistoquímica de colágeno V / marcado –72

Figura 29. Muestra con infección. Tinción de hematoxilina-eosina. 4 aumentos73

Figura 30. Muestra con infección. Tinción de hematoxilina-eosina. 10 aumentos73

Tabla 1. Resultados del grado de degeneración obtenido en cada muestra estudiada por tipo de intervención y tiempo transcurrido entre intervención y extracción para estudio.
In: muestra infectada39

Tabla 2. Resultados del marcado con anticuerpos de colágeno VI obtenido en varias muestras estudiadas por tipo de intervención y tiempo transcurrido entre intervención y extracción para estudio44



1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL PROBLEMA DEL DOLOR LUMBAR

La lumbalgia es uno de los principales problemas de salud en los países industrializados. En Estados Unidos afecta al 80% de la población adulta en algún momento de su vida¹ y en cualquier momento el 18% de la población adulta está afectada^{2,3,4}. Es la segunda causa de consulta médica en atención primaria (sólo superado en frecuencia por el resfriado común). A nivel económico supone en aquel país unos costes anuales de cien mil millones de dólares, con una gran tendencia al uso de recursos médicos en caso de complicaciones: el 5% de los pacientes consultados por lumbalgia consumen un 75% del total de costes sanitarios derivados de dicha afección. Estos datos subestiman la realidad en gran medida, porque no se tiene en cuenta la pérdida de productividad de estudiantes, ancianos y amas de casa. Se estima que un 5% de los pacientes de lumbalgia crónica nunca retornan a su actividad laboral previa⁵ por la discapacidad que provoca. Es por tanto un síntoma responsable de una gran carga económica y social en forma de bajas laborales. Esta última apreciación agrava el problema de salud, puesto que la lumbalgia se ve influenciada por factores de riesgo socio-económicos (insatisfacción laboral, escasa compensación económica por una invalidez, bajo nivel cultural), así como alteraciones psicológicas y hábitos o enfermedades muy perjudiciales pero muy comunes (tabaquismo, diabetes, obesidad)^{5,6}.

La degeneración del disco intervertebral es una de las principales causas de lumbalgia crónica (23-40% de casos)^{7,8,9,10}. No obstante puede constituir un proceso fisiológico, asociado a la edad y normal en la evolución del órgano y por tanto, no se le puede considerar este proceso en sí mismo la única fuente de dolor lumbar. Se estima que un 30% de los adultos sanos presenta degeneración discal en algún disco intervertebral lumbar demostrado mediante RM, sin que esa afectación provoque siempre dolor, por lo que se entiende que la degeneración discal y el dolor lumbar no tienen una asociación unívoca.

Todos estos datos subrayan la necesidad de investigar con mayor atención los aspectos etiológicos y fisiopatogénicos de una dolencia cuyos costes, por ahora, superan ampliamente los derivados de cualquier tipo de investigación que se realice al respecto. El tratamiento de la lumbalgia crónica es un permanente desafío para médicos e investigadores que deben encontrar una solución acorde al problema que representa esta patología, tanto para el paciente (por el dolor en sí mismo y cómo afecta a su calidad de vida) como para la sociedad.

La degeneración de la columna lumbar comienza por la degeneración discal, que se desarrolla según la ya clásica cascada degenerativa descrita por Kirkaldy-Willis¹¹:

- Fase primera: limitación funcional temporal por dolor.
- Fase segunda: sin limitación funcional pero con una situación clínica precaria. Hay inestabilidad de la unidad funcional vertebral afecta, con episodios de limitación funcional según las sollicitaciones mecánicas debido a la hipermovilidad segmentaria y la pérdida de altura del disco intervertebral.
- Fase tercera: la unidad funcional se estabiliza a expensas de cambios degenerativos globales, con aparición de artrosis interapofisaria, lo cual, junto a la inestabilidad relativa puede condicionar afectación del saco dural y raíces nerviosas, con la consecuente aparición de clínica álgica y neurológica¹².

Histológicamente este proceso se relaciona con las siguientes alteraciones: roturas, primero circunferenciales y luego radiales, en el anillo fibroso; luego disrupción completa y pérdida de altura del disco; en la última fase hay pérdida completa de la estructura del disco e incluso reabsorción del mismo, con anquilosis de los cuerpos vertebrales adyacentes¹³. Estos cambios tiene una base fisiopatológica todavía en estudio para su completo desarrollo, al igual que la relación entre este proceso y la aparición de dolor.

Actualmente los tratamientos establecidos como eficaces para la lumbalgia discogénica se clasifican en dos tipos: conservadores y quirúrgicos. No es objeto de este estudio la revisión de las diversas opciones y técnicas terapéuticas, por otra parte en constante revisión y desarrollo, sino iniciar una vía de investigación que permita desarrollar una de las posibilidades de tratamiento quirúrgico que más se están estudiando actualmente: la ingeniería tisular. Se han propuesto diversas posibilidades con tal fin, pero para su estudio se hacen necesarias dos condiciones previas:

- La creación de un modelo experimental que permita provocar el proceso patológico de degeneración discal o acelerar el proceso fisiológico, si entendemos que la aceleración de éste es la causa de aquél. Con tal modelo será posible estudiar de manera reproducible los cambios provocados en presencia o ausencia de las medidas propuestas para la modulación de la degeneración.

- El conocimiento, hasta ahora limitado, de la biología y metabolismo del disco intervertebral.

En esta memoria se recoge información relacionada con la biología del disco intervertebral, del proceso de degeneración y su relación con el dolor. Presentamos un modelo experimental animal que puede facilitar posteriores investigaciones sobre el tema con más fiabilidad.

1.2. DISCO INTERVERTEBRAL

1.2.1. Histología

El disco intervertebral es una matriz de fibras colágenas altamente organizada con una cantidad relativamente escasa de células (1% del volumen). Se compone de un núcleo pulposo gelatinoso rodeado por el anillo fibroso, delimitado entre dos platillos vertebrales, a los que se une por fibras de colágeno y, desde las capas más externas por contigüidad, con los ligamentos longitudinales en los cuerpos vertebrales¹⁴. Hasta estos platillos vertebrales, cuya superficie está formada por cartílago hialino, llegan los capilares que en mayor cuantía aportan la nutrición al disco intervertebral. El resto de aporte de nutrientes proviene de los vasos que circundan la periferia del disco intervertebral^{15,16,17}. El origen del anillo fibroso, cartílago de los platillos vertebrales y vértebras está en el mesodermo, mientras que el núcleo pulposo proviene del endodermo, siendo un vestigio de la notocorda¹⁴. En distintos animales y épocas de la vida hay un grado variable de células de la notocorda en núcleo pulposo, pero se desconoce con certeza si las células existentes en humanos provienen de ellas o si son completamente sustituidas por células condrocíticas¹⁸. Las células del núcleo pulposo son de estirpe cartilaginosa, y las del anillo fibroso son de estirpe fibrocondroide, si bien tienen menos capacidad que las de cartílago hialino para proliferar y producir colágeno¹⁴. Todo ello evidencia que siguen sin identificarse claramente las características fenotípicas de las células propias del disco^{8,19}.

La matriz extracelular está formada principalmente por proteínas de tipo cartilaginosa; colágeno I y II y grandes agregados de proteoglicanos²⁰:

- En el núcleo pulposo predomina el colágeno tipo II.
- En el anillo fibroso aparecen tanto colágeno I como colágeno II^{14,21,22}. El anillo fibroso está compuesto al principio de la vida por quince a veinticinco

capas individuales de colágeno, con sus fibras orientadas perpendicularmente entre capas contiguas. Esta estructura evoluciona a otra más compleja.

- También hay en el disco intervertebral normal colágenos tipo III, V, VI, IX y XI^{21,23, 24}.

Algunas de estas moléculas pueden servir como marcadores de degeneración discal: el colágeno X aparece en el platillo vertebral y en fases avanzadas de degeneración discal⁶, de igual modo que una alta concentración de colágeno II en las capas más internas del anillo fibroso²⁵.

Otros proteoglicanos presentes en el disco son el versicano, la decorina, el biglicano, la fibromodulina, el lumicano²⁶ y la elastina, molécula que une entre sí las capas del anillo fibroso¹⁴. El mayor proteoglicano presente en la matriz del disco intervertebral es el agregcano, que al unirse al ácido hialurónico dispone una carga negativa que aporta la capacidad del tejido de absorber agua para y generar presión de hinchado, necesaria para que el disco soporte cargas de compresión²⁶.

La integridad de la matriz extracelular del disco intervertebral se mantiene gracias al proceso constante de remodelación y recambio tisular²⁶, proceso que se instaura entre la acción anabólica en las células y la acción catabólica de las colagenasas, pertenecientes a la familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMP), de las que la primera en separar las fibras de colágeno es la MMP-1, mientras que la MMP-2, MMP-3 (estromelisina) y MMP-9 degradan esos fragmentos²⁷. La actividad de esas enzimas es inhibida por los inhibidores titulares de las metaloproteinasas (TIMPS)²⁸ para mantener el tejido en un adecuado proceso de recambio. El exceso de acción de las MMP (se encuentra en mayor cantidad cuanto mayor sea el grado de degeneración del disco) o defecto de los TIMPS puede ser responsable del inicio del proceso de degeneración en el disco intervertebral²⁶. En la zona más externa del anillo fibroso se localizan los nervios y vasos que escasean en el disco intervertebral adulto, con escasos mecanorreceptores parecidos a los órganos tendinosos de Golgi (propiorreceptores)²⁹.

1.2.2. Metabolismo

Se sabe que el disco intervertebral es un órgano avascular. Su aporte de nutrientes y oxígeno se realiza desde capilares que emergen de los cuerpos vertebrales y, en mucha menor medida, desde el tejido fibrovascular que rodea las capas externas del anillo fibroso. Por tanto cualquier factor que altere este proceso desde los platillos vertebrales (anemias megaloblásticas, calcificación de platillo vertebral, déficit de microcirculación periférica etc.) o aumente la demanda de nutrientes en el tejido discal (citoquinas, factores de crecimiento) provocará un déficit de nutrientes en el disco, empeorando sus ya de por sí precarias condiciones metabólicas basales. Estas condiciones de escasez de nutrientes y oxígeno empeora progresivamente desde los platillos vertebrales hasta el núcleo, por lo que la situación metabólica es particularmente precaria en éste. Además en el disco intervertebral, dado su bajo nivel de oxigenación, se obtiene de forma habitual la energía en sus células por la vía de la glicolisis, haciendo innecesario el oxígeno para mantener la viabilidad celular y generando lactato a partir de la glucosa. El lactato acidifica el medio y en esas condiciones la glicolisis se reduce, igual que la oxigenación, el transporte de glucosa y la síntesis matricial (la degradación se afecta en menor medida). Las células discales son viables hasta un pH de 6,0; por debajo de ese nivel aumenta la mortalidad celular³⁰.

1.2.3. Marcadores moleculares

Para conocer la biología del disco intervertebral es importante la identificación de las características específicas de las células discales, hasta ahora limitada. Actualmente no existen características fenotípicas ni marcadores moleculares en sus células que las hagan únicas frente a las de otras localizaciones. Pero la particularidad de que el disco intervertebral sobrevive a partir de cierta edad en un ambiente con un restringido aporte de oxígeno y flujo de nutrientes hace pensar que el disco intervertebral debe contener células con características genéticas y fenotípicas únicas.

En este sentido se han propuesto las siguientes moléculas como marcadores de las células del núcleo pulposo^{26,31}:

- factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α): media en el incremento de la actividad glicolítica, fuente de energía en tejidos donde se dispone de poco oxígeno, como el núcleo pulposo.

- transportador de glucosa-1 (GLUT-1): aumenta la captación de glucosa al núcleo pulposo en ambiente de hipoxia.

- metaloproteinasa de la matriz-2 (MMP-2): no sólo es una proteína con mucha mayor presencia en núcleo pulposo que en tejidos circundantes, sino que se relaciona directamente con la degeneración patológica del disco (HIF-1 y GLUT-1 forman parte de la actividad metabólica normal del disco intervertebral)²⁶.

1.3. DEGENERACIÓN DISCAL

La degeneración discal es un proceso fisiológico y al igual que sucede en cualquier otro órgano del cuerpo está condicionada por el paso del tiempo: al principio de la vida disponemos de mecanismos para reparar y contrarrestar el daño celular y tisular causado por ciertas exposiciones e influencias ambientales perniciosas, pero con el paso del tiempo perdemos esa capacidad y el daño se acumula. La incidencia de ciertos condicionantes pueden provocar que la degeneración discal se torne en patológica, lo cual se intuye por el hecho de que la mitad de la población en la sexta década de la vida tiene discos degenerados. Estos cambios degenerativos son demostrables por resonancia magnética, pero los discos que provocan dolor presentan cambios degenerativos más graves^{32,33}, presumiblemente patológicos.

Se presupone que la degeneración patológica es una aceleración del proceso fisiológico tras ciertos trastornos y circunstancias que afectan a la nutrición del disco, a la carga mecánica que soporta y la predisposición genética del sujeto^{34,35}, pero se desconocen los mecanismos que llevan a ciertos casos a esa aceleración del proceso

fisiológico. Lo que parece evidente para todos los investigadores es que, dado el escaso conocimiento de su biología, la degeneración discal carece de conceptos universalmente aceptados. Se reconoce la dificultad para diferenciar la etiología, fisiopatología e histología de la degeneración patológica respecto de la fisiológica, incluso se postulan las pruebas de imagen como fuente de definición del proceso en la práctica³⁶, aún siendo un método poco fiable, impreciso y sin uniformidad en los criterios de interpretación³².

La degeneración fisiológica se define por la interacción a lo largo del tiempo entre genes y ambiente (al igual que en el resto del organismo). Este fenómeno es inevitable³⁷ e irreversible³⁸. Por la interacción entre genes y ambiente se mantiene un equilibrio en la síntesis y destrucción de la matriz extracelular, de sus proteoglicanos, de forma que la estructura se adapta en cada momento a las solicitudes mecánicas que soporta el disco; pero cualquier cambio en el balance creación-destrucción de cualquier tejido de la unidad funcional vertebral puede conducir a la destrucción y pérdida de función de la misma³⁹.

Es posible que la pérdida de funciones del disco, mediante el proceso definido por Kirkaldy-Willis de degeneración de la unidad funcional vertebral, pueda generar dolor, y en este contexto es de especial importancia la disminución del agregano, principal proteoglicano del núcleo pulposo²⁶, que parece una vía común en el proceso de degeneración. El agregano es el responsable, a través de sus cargas negativas, de la captación y retención de agua en el disco intervertebral. Al reducirse la cantidad de agregano²⁹ se pierde contenido de agua en el núcleo pulposo, que deja de comportarse como un fluido viscoso. La alteración mecánica que ello implica da lugar a un aumento de carga mecánica de estructuras circundantes y a la distribución anormal de fuerzas en el disco intervertebral, lo que lleva a roturas en el anillo fibroso.

Diversos autores atribuyen a la pérdida progresiva de proteoglicanos (como el agregano) la responsabilidad del inicio del proceso degenerativo^{40,41,42,43}, ya que no sólo se alteran las propiedades biomecánicas del disco, sino también la capacidad de difusión

de nutrientes a su través¹⁰. Los diferentes tipos de colágeno también modifican su distribución en tejidos patológicos respecto a tejidos normales: aumenta la distribución de colágeno I, III y VI^{6,44}. El colágeno VI se distribuye en disco normales en la cápsula pericelular de anillo fibroso y núcleo pulposo, y de manera variable en la propia célula y en la matriz interpuesta entre la célula y la cápsula. Es particularmente significativo el aumento demostrado de colágeno III y VI en el cartílago del platillo vertebral, cuyos canales vasculares se llenan de colágeno VI en asociación con los cambios degenerativos. No está demostrado si la alteración en la distribución y cantidad de estos tipos de colágeno es consecuencia de la degeneración discal y sus desencadenantes o si puede ser uno de los factores predisponentes para dicho proceso degenerativo⁴⁴.

Ciertos estudios en gemelos homocigóticos atribuyen al factor genético el mayor peso en la aparición de la degeneración discal⁴⁵. Múltiples genes se han demostrado implicados en los cambios en anabolismo y catabolismo en el disco intervertebral: colágeno IX A2⁴⁶, 9 A3⁴⁷, CILP (proteína de capa intermedia de cartílago)⁴⁸, colágeno XI A1⁴⁹ y AGC1⁵⁰.

Debido a esta estrecha relación de la genética con el problema que nos ocupa las terapias génicas se postulan como una solución de futuro para la degeneración discal patológica. Proponen aumentar el anabolismo celular de matriz extracelular para paliar el desequilibrio que genera el problema⁵¹, o bien disminuir el catabolismo⁴³.

Antes de la implicación genética tradicionalmente se entendía la degeneración fisiológica del disco intervertebral como consecuencia de la adaptación del mismo a las cargas mecánicas durante toda la vida, definidas habitualmente por trabajo físico pesado, posturas de trabajo estáticas, vibraciones, etc.⁵², pero sin acumulo de daño periférico ni componente nociceptivo en la unidad funcional vertebral. Es evidente que la carga mecánica supone un factor influyente en la degeneración discal, puesto que los últimos niveles lumbares se ven de forma persistente más afectados que los primeros, de menor demanda mecánica. En este sentido se estudia la regulación de las respuestas

celulares (dependientes de la genética) del disco intervertebral a los estímulos mecánicos de carga, y cómo esas respuestas pueden acelerar la degeneración:

- Magnitudes leves o moderadas de compresión estática cíclica provocan que en el disco intervertebral aumenten los eventos anabólicos de los proteoglicanos y colágenos de la matriz.
- Grandes cargas mecánicas provocan que se incremente el catabolismo (se expresa más mRNA de proteasas) y la muerte celular⁴³.
- Cargas mecánicas estáticas de mayor intensidad hacen que los discos pierdan mayor contenido de agua y disminuye la síntesis de colágeno (no se sabe si por persistir un menor número de células viables o porque las que quedan tienen menos capacidad de síntesis).

Esto implica que las elevadas cargas mecánicas afectan a la función y homeostasis del disco intervertebral (y no sólo la genética). Se desconocen los acontecimientos que condicionan la respuesta celular ante procesos mecánicos que afectan al disco, si bien se plantea la influencia de cambios de volumen y de presión, flujo de fluidos, efectos electrocinéticos y deformaciones en compresión, tensión o cizallamiento. Los cambios de volumen suponen una señal celular a través de cambios en los procesos de ósmosis, que cambian con la degeneración discal. Inicialmente aumenta el contenido de agua, lo que desestructura la malla de colágeno la debilita. En segundan instancia provoca pérdida del contenido hídrico del disco. Particularmente las células del núcleo pulposos son sensibles a pequeños cambios de volumen o presión hidrostática¹⁸, y el descenso de producción de proteoglicanos y colágeno es el mayor desencadenante del proceso degenerativo⁸.

Se han creado diversas clasificaciones de los grados de degeneración discal, que en cierta medida ayudan a entender el proceso fisiopatológico. En base a los hallazgos por RM en secuencia T2⁵³ la clasificación es la siguiente:

Grado I: disco homogéneo, brillante/ hiperintenso, buena distinción de anillo fibroso y núcleo pulposo, altura normal del disco.

Grado II: bandas horizontales, el resto igual que en I.

Grado III: disco gris, de intensidad intermedia, de difícil distinción entre anillo fibroso y núcleo pulposo.

Grado IV: pérdida de distinción entre anillo y núcleo, con posible disminución de altura del disco intervertebral.

Grado V: disco negro, de señal hipointensa, colapsado.

Se puede establecer una relación entre este sistema de clasificación en sus diversos grados con el proceso progresivo de degeneración a nivel tisular:

Grado I: la estructura está conservada con normalidad.

Grado II: las roturas en el anillo fibroso se rellenan con tejido de granulación y corresponderán a las bandas oscuras horizontales.

Grado III: la degeneración mucoide progresiva y roturas más graves condicionan la pérdida de intensidad difusa del disco en la RM.

Grados IV y V: se pierde la estructura del disco, se confunden sus componentes y pierde capacidad mecánica para mantener su altura (ver figura 1).



Figura 1. Imagen de RM en T2 con degeneración en el disco entre las vértebras L5 y S1 con rotura radial del anillo fibroso.

También son importantes los cambios que afectan al platillo vertebral: se producen con el tiempo roturas y posteriormente esclerosis (demostrado en unidades vertebrales de escoliosis¹⁴) que impermeabilizan el platillo, microfracturas en el hueso subcondral y alteración más marcada de la densidad celular. Asimismo se pueden formar nódulos de Schmörl, que en los niveles T10-L1 están más relacionados con degeneración patológica y en L2-L5 con la degeneración propia de la edad. El cartílago que recubre los platillos vertebrales decrece en su grosor desde el nacimiento, cuando ocupa el 50% del espacio intervertebral y durante toda la vida adulta, hasta llegar a un 5% del espacio. Esto supone un peor sustrato de paso de los capilares desde los cuerpos vertebrales¹⁴.

Nishimura, Mochida y Nomura propusieron dos clasificaciones de los grados de degeneración discal: la primera según cambios semicuantitativos de la apariencia histológica del anillo fibroso en muestras procesadas con tinción de Van Gieson⁵⁴ (ver figura 2) .

Grado 0: estructura normal.

Grado 1: apariencia levemente serpenteante con alguna rotura del anillo fibroso.

Grado 2: apariencia moderadamente serpenteante.

Grado 3: apariencia gravemente serpenteante con leve inversión de la concavidad-convexidad del anillo fibroso.

Grado 4: contorno gravemente invertido.

Grado 5: estructura indefinida.

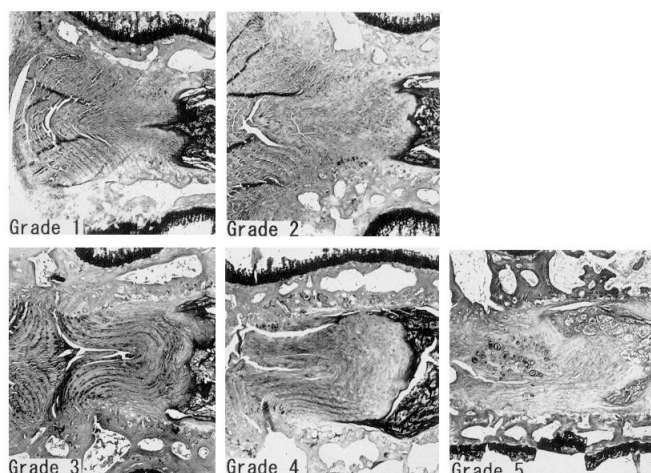


Figura 2. Grados de degeneración discal según cambios en el anillo fibroso.

Dada la sencillez de esta clasificación al graduar el proceso degenerativo, en base a parámetros fácilmente inteligibles, nos decantamos por ella para validar las muestras obtenidas en nuestro estudio, dado que una elevada complejidad en la valoración supondría un sesgo en los resultados.

La segunda clasificación se realiza según los cambios degenerativos en el núcleo pulposos, en base al estudio de las muestras tratadas con tinción de hematoxilina-eosina²⁵, proponiendo los siguientes grados:

Grado 0: estructura normal.

Grado 1: apariencia en panal de miel de la matriz extracelular sin tejido conectivo proliferativo.

Grado 2: <25% del núcleo pulposos ocupado por tejido conectivo proliferativo.

Grado 3: 25-50% de ocupación.

Grado 4: >50% de ocupación.

Grado 5: sustitución completa de la estructura normal del núcleo pulposos por tejido conectivo proliferativo.

1.4. RELACION ENTRE DAÑO TISULAR Y DOLOR

Es controvertido el hecho de que la degeneración de un disco intervertebral no implica necesariamente que éste provoque dolor⁶. Diversos autores que proponen, como se expone a continuación, mecanismos puente entre la mera degeneración discal y la aparición del dolor en el seno de la misma. Es de gran importancia de cara a la aplicabilidad clínica de cualquier estudio sobre degeneración discal el determinar el origen del dolor asociado al proceso, aun sabiendo que tal relación causa-efecto no siempre existe.

Lotz y cols. proponen la pérdida de volumen del núcleo pulposo por deshidratación como parte esencial del proceso degenerativo. En tal proceso se pierde el contenido fluido del disco intervertebral y la matriz extracelular del núcleo pulposo adopta características más propias del anillo fibroso, haciendo al disco más rígido⁵² y mecánicamente insuficiente³⁴. Se añadiría a este proceso la menor tensión de oxígeno del núcleo pulposo y un menor pH³⁹, partiendo de la base de que ambos parámetros son particularmente bajos en el núcleo pulposo en condiciones fisiológicas. En este contexto se produce un progresivo daño tisular como consecuencia de las demandas mecánicas, que incrementan los fenómenos catabólicos en un órgano cuyas células no tiene capacidad regenerativa⁸. Esto provoca acumulo de productos de degradación tisular, que en la periferia del anillo fibroso inician respuestas de inflamación, neovascularización⁴, neoinervación y sensibilización de los nociceptores en capas externas del anillo fibroso y platillos vertebrales³⁵. En estas localizaciones, donde llega la vascularización del órgano y origen verdadero del dolor, estarían las dianas sobre las que actuar para evitar o aliviar la sintomatología.

El daño que sufren estas zonas del disco intervertebral se intenta reparar con tejido de granulación, fibroblastos que aumentan la producción de colágeno II⁵⁵, fibras nerviosas y más elementos inflamatorios desde las capas externas del anillo fibroso siguiendo la dirección de la rotura hasta el núcleo pulposo⁴. Crean y col. demostraron en muestras de discos procedentes de escoliosis que en la concavidad de la curva de la

escoliosis la cantidad de colágeno en capas externas del anillo fibroso y glucosaminoglicanos en el núcleo pulposos es inferior a lo normal, siendo este déficit más marcado en el ápex de la curva²⁶.

Entre las moléculas que regulan el proceso de reparación descrito se incluyen

- a) interleuquina-1 (IL-1)
- b) factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)
- c) proteína quimioattractora de macrófagos-1
- d) factores de crecimiento: con nula expresión en discos normales, escasa en discos de edad avanzada y abundante en discos dolorosos, sobre todo en zonas de granulación
 - a. factor de crecimiento fibroblástico- β (FGF- β): acelerador de la mitosis, también promueve el crecimiento de vasos sanguíneos al interior del disco e incrementa la actividad proteolítica.
 - b. factor de crecimiento transformador- β (TGF- β): estimula síntesis de procolágeno tipo I (la cantidad de TGF- β es proporcional al grado de fibrosis en el disco) y atrae células inflamatorias y de reparación tisular

Otro elemento implicado en la degeneración, consecuente al intento de reparación del daño tisular, son los mastocitos. Se localizan dentro del anillo fibroso y su degranulación provoca dolor agudo. También influyen los macrófagos, que eventualmente aceleran la reabsorción de células dañadas y tejidos necróticos y de material herniario si lo hubiera y secretan las demás moléculas implicadas⁴. Entre esas moléculas podría estar el factor de crecimiento neural (NGF), posiblemente implicado en el crecimiento de fibras nerviosas hacia capas más internas del anillo fibroso en el disco intervertebral doloroso⁵⁶.

La reparación del daño tisular, que hemos descrito anteriormente, se da sobre todo en roturas de capas externas del anillo fibroso, se produce a expensas de diferenciación y proliferación celular de tipo fibroblástico en capas externas, de tipo

condrocítico en capas internas del anillo fibroso y por proliferación de la matriz extracelular (colágeno II, X). Se provoca fibrosis en el intento de restaurar el equilibrio creación-destrucción de matriz²⁶ y ese tejido resultante nunca es biomecánicamente comparable al tejido sano. La fibrosis y la diferenciación celular anormal consecuentes conducen a la insuficiencia biomecánica del órgano y la generación de dolor⁴. Otros autores defienden las roturas del anillo fibroso, con todos los eventos mencionados, como causa principal del dolor discogénico^{57,58,59,60}. Es reseñable el hecho de que sólo un 20% de discos con hernia tienen mastocitos, lo que indica la diferente patogenia del dolor por degeneración discal respecto al provocado por las hernias discales⁶¹.

Existen factores relacionados con la aparición de la respuesta inflamatoria patológica y también con la existencia de insuficiencia biomecánica. Esta se define por el conjunto de hipermovilidad⁶² (inestabilidad), alteración cinemática⁶³ y de distribución de cargas en los tejidos⁶⁴. Este hecho da lugar al aumento de factores proinflamatorios, entre los que se incluyen las metaloproteininas de la matriz 3⁵¹, 7 y 8 (MMP-7 y MMP-8, más comúnmente halladas en discos herniados), que potencian la inflamación y la sensibilización de nociceptores. Asimismo disminuye la inhibidora tisular de metaloproteininas de la matriz-1 (TIMPS-1)⁵¹. En cola de rata las neuronas son sensibles al factor de crecimiento neural y su receptor el Taka, que aparte de sensibilizar nociceptores puede estimular la secreción de citoquinas en el disco intervertebral o formarse en el ganglio de la raíz dorsal que inerva el disco intervertebral y regular al alza la secreción de neuropéptidos responsables directos del dolor (aumentan en discos dolorosos).

Otro factor implicado en estas respuestas es la N-carboximetil lisina (CML), un biomarcador de estrés oxidativo en el disco intervertebral. La oxidación se provoca posiblemente ante alteraciones mecánicas o metabólicas (de la homeostasis discal en cualquier caso) y conduce a la formación de radicales libres de oxígeno y glicosidación. El CML se acumula con la edad tanto en anillo fibroso como en núcleo pulposo, con mayor concentración en las áreas del órgano con más degeneración histológica (buena correlación con la histología) y mayor depósito en el disco intervertebral cuanto mayor sea el grado de degeneración patológica del órgano en su conjunto. Sin embargo no se

acumula en ausencia de cambios degenerativos histológicos⁶, lo que lo posiciona como un buen marcador de degeneración patológica diferenciada de la fisiológica, al igual que ocurre con el aumento del colágeno X. Es notable que el depósito de CML se produce de forma más temprana en núcleo pulposo, lo que indica que el anillo fibroso es menos propenso al estrés oxidativo que conduce a la degeneración tisular (menos incluso que el platillo vertebral).

También se suele relacionar la patología discal con el dolor a través de la respuesta bioquímica a cargas mecánicas de un disco biomecánicamente insuficiente. Es remarcable que en estudios in vitro la rigidez del disco intervertebral disminuye (aumenta la movilidad) a medida que aumenta el número de ciclos de carga mecánica sobre el mismo, al igual que sucede en la degeneración patológica. Esto es lo contrario de lo que sucede in vivo (con las demandas físicas aumenta la rigidez) lo que podría traducir la importancia de la musculatura perivertebral en el mantenimiento de la estabilidad de los niveles vertebrales, evitando el proceso patológico de degeneración⁵². En estudio in vivo persiste por tanto sólo el proceso fisiológico, condicionado entre otros factores por el hecho de que el disco está sometido a tensión constante por la tensión muscular y ligamentosa^{65,66}.

Popularmente se atribuye el dolor discal al efecto mecánico que por compresión ejerce el material discal herniado dentro del canal medular, si bien como hemos descrito el dolor también es también debido a la liberación de factores inflamatorios en los tejidos de la unidad vertebral, y por tanto a un efecto químico derivado de la alteración del disco intervertebral, que efectivamente puede tener un inicio mecánico.

1.5. MODELOS TERAPÉUTICOS EN ESTUDIO

Existe una gran variedad de tratamientos enfocados a aliviar el dolor o la incapacidad que provoca la degeneración discal patológica, desde fusiones de varios niveles vertebrales a discectomías limitadas o completas; pero todos estos enfoques

terapéuticos tienen en común que intentan solucionar un problema creando otro, dado que suponen una alteración en la biomecánica de la columna y por tanto una amenaza para la evolución de su capacidad fisiológica de soportar cargas mecánicas. En última instancia suponen un desencadenante para el proceso de degeneración discal³⁶ al mismo o a otros niveles.

Mochida y cols. Realizaron un estudio sobre la evolución clínica y radiográfica de pacientes tratados con discectomía total y otros en los que sólo se extraía el material herniario en el anillo posterior, dejando el resto del disco *in situ*. Los resultados eran mejores en pacientes a los que sólo se les extraía el material de núcleo pulposo herniado en la parte posterior del anillo fibroso, siendo esta diferencia más llamativa en menores de cuarenta años, lo que refleja la importancia de alterar lo menos posible la estructura interna del disco intervertebral para no influir demasiado sobre su biomecánica³⁶.

Se están investigando diversos métodos que permitan actuar directamente sobre el disco degenerado, no para eliminar la parte que crea el problema, sino para repararlo y conseguir que dicho disco pueda recuperar toda o parte de su capacidad perdida de absorción de energía. Se pretende que recupere las características biomecánicas normales del nivel vertebral en el que funciona, para evitar los cambios histológicos descritos anteriormente que pueden conducir a la aparición del dolor en primera o segunda instancia (a consecuencia de la alteración biomecánica previa). Es lo que se conoce como regeneración tisular, uno de los objetivos de la ingeniería tisular. Estos métodos implican aumentar la población celular viable dentro del disco para que regenere la matriz extracelular, lo cual precisa un ambiente de adecuada nutrición en el disco intervertebral huésped, de lo contrario cualquier población celular será inviable.

Entre los métodos de regeneración tisular se ha propuesto el uso de vectores virales, factores de crecimiento y trasplante de células o tejidos. El uso de vectores virales vienen asociados a problemas de índole ético, y los factores de crecimiento tienen un efecto temporal que obstaculiza claramente su aplicación. Parecen más factibles los métodos de trasplante celular o tisular, como los propuestos por Sakai e

Iwashima y col^{67,8,38}, que consiguieron una línea inmortal de células del núcleo pulposo que se podían infiltrar dentro de un disco degenerado para reinstaurar su integridad hística. Demostraron igualmente la eficacia de introducir en el disco células madre pluripotenciales de origen mesenquimal, de la misma naturaleza de las células discales. Con ellas aumenta el contenido de condroitin-4-sulfato, keratán sulfato y colágeno tipo II, mientras que disminuye el contenido de colágeno tipo I con respecto a discos no trasplantados. Además las células madre trasplantadas expresan con más intensidad los marcadores propios del núcleo pulposo (HIF-1 α , GLUT-1, MMP-2), lo que demuestra que en un microambiente adecuado se diferencian hacia células discales.

Okuma obtuvo similares conclusiones en un estudio sobre reinsertión de células de núcleo pulposo cultivadas con células de anillo fibroso: la tasa de degeneración discal disminuye³⁷. Esto también resalta la importancia del estudio de células discales en órgano sólido (*ex vivo* o mejor *in vivo*) para valorar su evolución en condiciones de pleno desarrollo fisiológico (interacción con el medio adecuado).

Para ensayar estos métodos terapéuticos se hace necesaria la consecución de un modelo experimental que permita obtener discos con homeostasis alterada que provoque un proceso degenerativo, proceso que se pueda controlar en su intensidad y evolución cronológica. El modelo debe ser fiable, económicamente asequible y por tanto reproducible. Sólo de esta forma se podrá conocer con certeza la influencia que el tratamiento ensayado tenga sobre el disco tratado según el estadio degenerativo en que se encuentre, y de tal forma aplicar un manejo individualmente adaptado a cada disco tratado.

En un trabajo de 2005 sobre terapia molecular del disco intervertebral Yoon obtenía buenos resultados en sus estudios *in vitro* con anticatabólicos, mitógenas, morfógenas condrogénicas y reguladores intracelulares. Estos resultados abarcaron y diferenciación celular de tipo condrocítico (propia del núcleo pulposo), síntesis de proteoglicanos y colágeno de la matriz del disco e incluso la conservación de la altura del disco. También concluía la falta de un modelo degenerativo animal realista para la

realización de estudios *in vivo* en humanos⁶⁸. Igualmente Sakai y col. en sus trabajos manifiestan esta necesidad de un modelo *in vivo*⁸.

Este estudio surge de la falta de modelos que imiten la fisiopatología de la cascada degenerativa de los discos en el ser humano. El objetivo es desarrollar un modelo experimental en animal vivo de degeneración discal mediante privación vascular. Este modelo se mantendrá por un periodo biológicamente equiparable al tiempo en el que en el ser humano se desarrolla la cascada degenerativa descrita por Kirkaldy-Willis, originando dichos acontecimientos en circunstancias similares a las que desencadenan el proceso en humanos.

1.6. MODELO VASCULAR DE DEGENERACIÓN

Se pretende aplicar sobre los discos intervertebrales un modelo de degeneración ya probado en otros estudios^{1,69}: el aislamiento de los discos respecto a los platillos vertebrales; esto disminuye el aporte nutricional al disco intervertebral y así comienza la cascada de acontecimientos que conduce a su degeneración. En condiciones fisiológicas este proceso comienza con dos procesos:

- La calcificación de los platillos vertebrales, que reduce al aporte sanguíneo hasta el disco.
- El aumento de volumen del mismo, que empeora la capacidad de difusión de nutrientes hasta el núcleo pulposo. Este problema comienza en las capas más externas del disco⁶ y es responsable de la alteración en la malla de colágeno que sustenta el disco.

En 1945 un estudio anátomo-patológico de Coventry demostró la existencia en los platillos vertebrales de pequeños orificios a través de los cuales probablemente

recibían vascularización desde el tejido óseo esponjoso del cuerpo vertebral⁷⁰; por difusión desde el cartílago que recubre estos platillos se nutren los discos.

La vascularización de la que se nutren los discos involuciona en humanos a partir de los dos años de edad, y a partir de los 30 años resulta despreciable, motivo por el cual se teoriza con que esa podría ser la causa de la aparición de problemas biomecánicos asociados a la edad en los discos intervertebrales. Desde los dos años de edad se aprecian incipientes cambios degenerativos microscópicos en el disco intervertebral¹⁴ consecuencia probable del estrés oxidativo que se produce en el interior del órgano avascular, lo cual se confirma con el acumulo de CML.

En la segunda década de la vida se detecta en el núcleo pulposo proliferación celular; en el platillo vertebral surgen grietas y alteraciones en la densidad celular y en la matriz del cartílago⁶. En edad más avanzada aumenta el número y extensión de las grietas y roturas. Esto conlleva aparición de neovascularización de fuera adentro del anillo fibroso⁴ en un intento de reparación del daño. También aparece tejido de granulación, con lo que aumenta la síntesis de proteoglicanos y colágeno y la proliferación celular, lo que aumenta la muerte celular. Finalmente se pierden los límites entre anillo fibroso y núcleo pulposo en el último estadio¹⁴.

1.7. ALTERACIONES PATOLÓGICAS DE LA VASCULARIZACIÓN

1.7.1. *In vivo*

La disposición de los capilares desde los que se difunden los nutrientes se ve afectada por factores externos como el tabaco⁷¹, patologías de la microcirculación como

la diabetes, las vibraciones⁷² y la estructura del platillo vertebral (esclerosis y calcificación por escoliosis^{73,74}, por la edad, etc.) de tal forma que al perderse la difusión desde los capilares comienza el proceso degenerativo del disco intervertebral⁷⁵, afectando en primer lugar en el interior, donde menos efectiva es la difusión de nutrientes⁷⁶. Este proceso degenerativo de la microcirculación es variable entre los distintos individuos, lo que condiciona la importante variabilidad etaria en el desarrollo de problemas biomecánicos en la columna. En todo caso hacia el final de la primera década de vida no quedan canales vasculares y el disco intervertebral se transforma en el mayor tejido avascular del organismo^{14,77,78}. Este hecho fue respaldado por un estudio de Boos y Steffen en el que hallaban mediante resonancia magnética nuclear un defecto de distribución de contraste en los tejidos de los discos degenerados desde los platillos vertebrales, si bien no demostraron que esta difusión insuficiente fuera la causa de la degeneración⁷⁹.

Holm y col. y Iwahashi y col. realizaron sendos estudios sobre el efecto vasoconstrictor de la nicotina del tabaco en disco intervertebral, y como dicho efecto conduce a la degeneración discal. Demostraron disminución del flujo sanguíneo a la periferia del disco intervertebral y un aumento de IL-1 en los discos intervertebrales estudiados^{71,80}. Estos estudios se ven relativizados por otros que no encuentran evidencia de que el tabaquismo se asocie a la aceleración del proceso degenerativo⁸¹

1.7.2. *In vitro*

Lee y col. obtuvieron un aumento de células muertas en cultivo de disco intervertebral si se hacía con preservación de los platillos vertebrales respecto a hacerlo sin ellos. Esto les llevó a concluir que la formación de coágulos en los vasos de los platillos disminuye la tasa de difusión de nutrientes hacia el disco y productos de desecho hacia el exterior, lo cual empeora las condiciones ambientales del disco. Esto demuestra la importancia del aporte de nutrientes a través de los platillos superior e inferior al disco intervertebral¹. Haschtmann y col. publicaron sus avances en el

desarrollo de un modelo de cultivo controlado ex vivo in vitro de disco intervertebral como órgano completo para investigar las patologías de disco y platillo vertebral⁶⁹, tanto en lo que refiere a viabilidad celular como a su actividad: el metabolismo matricial y la activación de cascadas de señales. Obtuvieron resultados similares a los del estudio de Lee¹.

La investigación del proceso degenerativo del disco intervertebral y, si es posible, la aplicación de ingeniería tisular para modulación del mismo requiere un modelo experimental que reproduzca el proceso fisiopatológico que sucede en el ser humano. Actualmente no hay un modelo globalmente aceptado que cumpla estas condiciones.

De entre las múltiples teorías que intentan explicar dicho proceso la privación nutricional a través de los platillos vertebrales por la falta de flujo vascular es, quizá, la más sugerente. Se han publicado múltiples modelos de degeneración discal, pero inducidos a) por lesiones físicas (punción) o químicas (inyecciones enzimáticas) que generan un fenómeno cataclísmico, lejos de lo que sucede en la realidad ; o B) por entornos mecánicos poco fisiológicos, con lo que tampoco reproducen las condiciones de la naturaleza en el problema clínico que nos atañe.

Los modelos desarrollados de privación nutricional se han dirigido a situaciones y técnicas muy complejas, que alteran el entorno para subsiguientes actuaciones (ej: corderos con cirugía mayor para acceder a los discos).

Es necesario por tanto diseñar un modelo de privación nutricional fácil, reproducible y que permita actuaciones posteriores sin gran alteración del entorno peridiscal. Además, hay que comprobar que dicho modelo produce una secuencia fisiopatológica similar a la del ser humano como paciente y no una destrucción cataclísmica por una actuación puntual muy diferente de la realidad clínica.

1.8. HIPÓTESIS

Se propone que el modelo de privación nutricional en cola de rata, podría cumplir todos los requisitos presentados para un modelo fisiológico de degeneración discal, con la posibilidad de servir de base a posteriores desarrollos de investigación terapéutica.

Tal como se ha definido en este trabajo, se trata de un modelo original, nunca antes planteado desde la perspectiva de privación vascular.

1.9. OBJETIVOS:

En este trabajo se pretende comprobar la hipótesis planteada mediante el estudio concreto de los siguientes aspectos:

- 1) Si la interrupción del aporte vascular a los platillos del disco intervertebral provoca degeneración discal.
- 2) Si la degeneración sigue un proceso fisiopatológico progresivo, no cataclísmico, como progresivo es el proceso en el ser humano.
- 3) Si permitiendo la regeneración del aporte vascular la degeneración provocada es menor, al poder reinstaurarse el aporte de nutrientes.
- 4) Si interrumpiendo el aporte vascular en los dos platillos la degeneración es mayor que si sólo sucede en uno, al ser la privación mayor.

- 5) Si hay una relación directa entre tiempo transcurrido desde la actuación y la degeneración provocada.





2. MATERIAL Y METODOS

Se utilizan ratas de la especie *Rattus norvegicus* (rata noruega) de la raza *Sprague Dawley*, de aproximadamente 250 gr de peso procedentes del animalario de la Universidad de Santiago de Compostela, a las que no se somete a ningún tipo de alimentación ni condiciones de cría especiales.

Se intervienen 16 ratas, en cada una de las cuales se trabajó sobre 5 niveles vertebrales contiguos, realizando las siguientes intervenciones sucesivamente (ver figura 3):

- A: aislamiento del platillo distal al disco intervertebral con sellado.
- B: aislamiento de ambos platillos con sellado
- C: no intervención adyacente a ninguno de los dos platillos vertebrales
- D: aislamiento de ambos platillos vertebrales sin sellado.
- E: aislamiento del platillo proximal al disco sin sellado

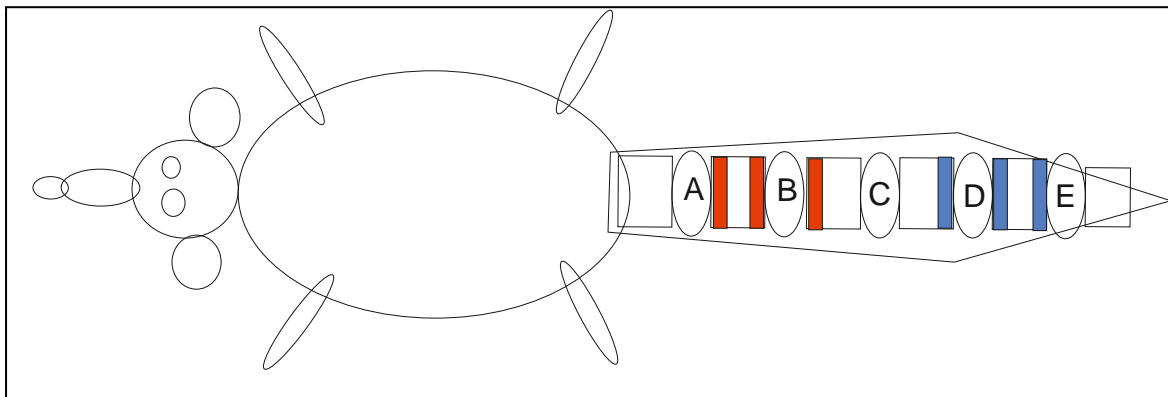


Figura 3. Esquema de discos intervenidos en la longitud de la cola de la rata;
rojo: platillo con aislamiento del cuerpo vertebral y sellado con sustancia inerte;
azul: platillo con aislamiento sin sellado.

2.1 Modelo experimental

Se realiza la intervención bajo anestesia general de la rata, obtenida mediante inyección intraperitoneal a través de la ingle de 0,5 ml de una solución de ketamina (50 mg/ml), suero salino fisiológico y xilacina (2g/ 100 ml) con una composición del 42,5%, 37,5% y 20% respectivamente, para una inyección de 200 microlitros por 100 g de peso (se intervenían ratas de unos 250 gr de peso). Esta cantidad de producto anestésico ocasionalmente se incrementa si la anestesia no es completa y por tanto no se puede realizar la intervención por movilidad activa de la cola. Tras comprobar la eficacia de la anestesia, mediante la no respuesta motora a estímulo doloroso no lesivo en las patas, se procede a la intervención

Se realiza una incisión longitudinal de la piel de la cola, a 3 cm. de la base y de 4,5 cm. de longitud como referencia. Se realiza centrada en el espacio dorsal que delimitan los tendones dorsales de la cola, de forma que se manipulan lo menos posible, realizando una separación de sus inserciones al periostio que recubre las vértebras, para poder rechazarlos a ambos lados de la incisión (ver figura 4). Se realiza esta separación y protección tendinosa para poder trabajar sobre las vértebras sin alterar los tendones,

con lo que se pretende conseguir en la cola una movilidad lo más aproximada a la normalidad tras la intervención, y una cicatrización de partes blandas más efectiva. Se preserva asimismo las venas laterales de la cola, con lo que se evitan hemorragias que modifiquen el modelo degenerativo propuesto el proceso o alteren la cicatrización posterior.

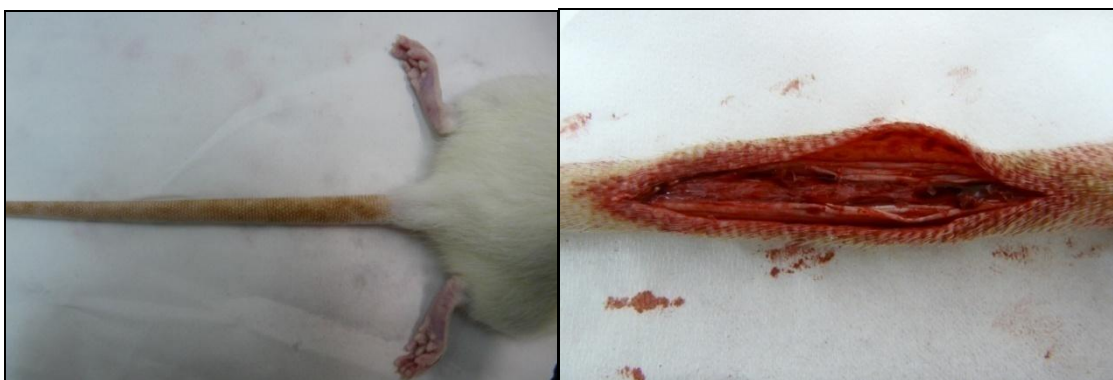


Figura 4. Fotos de la cola de rata antes y después del abordaje de la columna vertebral.

Se identifican los discos intervertebrales mediante movilización de los sucesivos segmentos vertebrales, y por palpación del reborde que crean los platillos vertebrales, que marcan la separación entre cuerpo vertebral y disco intervertebral. Se realiza un orificio a 1 mm del platillo vertebral mediante broca de 1 mm de diámetro con taladro de precisión con eje flexible, a una velocidad de giro de 20000 revoluciones por minuto. Se utiliza una alta velocidad de giro para realizar el orificio con la máxima precisión posible, sin oscilaciones hacia el cuerpo vertebral o hacia el platillo y minimizando la posibilidad de necrosis térmica del hueso esponjoso. Una vez introducida la broca en todo el espesor el ancho del cuerpo vertebral se realizan movimientos pendulares hacia ambos lados del cuerpo vertebral, creando así un espacio vacío de configuración laminar de 1 m de ancho anexo al platillo vertebral (ver figura 5) En ese espacio en algunos casos se introduce cianoacrilato (Superglue 3®, Loctite™) para sellar dicho espacio, a modo de barrera para la revascularización, lo que genera dos variantes de aislamiento:

a) con aislamiento del platillo mediante material biocompatible que sella la comunicación con el cuerpo vertebral

b) con aislamiento sin sellado, de forma que el espacio formado se pueda posteriormente rellenar de sangre.

La introducción de cianoacrilato se realiza con jeringa estéril de 2 ml con aguja estéril de calibre 25 G.



Figura 5. Foto de la cola de rata tras realizar las separaciones de los platillos vertebrales respecto a los discos anexos.

El cierre del abordaje se realiza mediante sutura reabsorbible trenzada (Vicryl [Ethicon, NJ]) con puntos sueltos. Al cabo de 10-15 días los puntos de sutura desaparecen por degradación y probablemente por arrancamiento del propio animal.

Se intervienen mediante este método 17 ratas, una de las cuales es excluida del estudio por *exitus* en el postoperatorio inmediato. Las 16 ratas restantes se clasifican en cuatro grupos, según el tiempo transcurrido desde la intervención hasta la extracción de los disco intervertebrales: cuatro ratas con dos meses, cuatro ratas con cuatro meses, cuatro ratas con seis meses y cuatro ratas con ocho meses..

Pasado el tiempo preestablecido para cada animal se sacrifica la rata mediante decapitación en guillotina y exanguinación, tras provocarle un estado de inconsciencia

por traumatismo en la base del cráneo. Se corta la cola por su base, proximal a la cicatriz de la intervención realizada y se disecciona inmediatamente. Se realiza apertura de la piel a través del abordaje anterior y se realiza separación de los diferentes niveles vertebrales por sección a través de hueso con sierra de 0,5 mm de grosor.

Los discos intervertebrales aislados se fijan inmediatamente en formol neutro tamponado al 10% durante 24 h y se incluyen en parafina de forma rutinaria. Se realizan secciones de 4 μm que se montan en portas pretratados FLEX IHC (Dako, Glostrup, Denmark) y se secan en una estufa a 60°C durante 4 h. Las secciones se desparafinan, hidratan e incuban en solución de recuperación antigénica EnVision FLEX (pH bajo) en un PT Link (Dako) durante 20 min a 95°C. Posteriormente se atemperan en el PT Link a 65°C y se pasan a tampón de lavado (Dako) durante 5 min a temperatura ambiente.

Para comparar el proceso de degeneración obtenido con las intervenciones practicadas todas las muestras de biopsia (formadas por platillo vertebral, anillo fibroso y núcleo pulposo) se tiñen con hematoxilina-eosina y Van Gieson. Una selección representativa de muestras se marca con anticuerpos de colágeno VI.

La técnica inmunohistoquímica se realiza de forma automática en un inmunotefñidor AutostainerLink 48 (Dako). El protocolo de inmunotinción incluye las siguientes etapas de incubación:

- 1) Reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako) durante 5 min.
- 2) Anticuerpo monoclonal de ratón anti-colágeno VI, clon VI-26 (MP Biomedicals, Aurora, OH, USA), diluido al 1/100 en tampón de dilución (Dako) durante 20 min.
- 3) Polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano e inmunoglobulinas de cabra anti-ratón y anti-conejo durante 20 min.

4) Solución de trabajo de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina con peróxido de hidrógeno (Dako) durante 10 min.

5) Contratinción con hematoxilina EnVision FLEX (Dako) durante 15 min.

Entre las distintas etapas se realizan lavados con tampón (Dako) y tras la última, las secciones se lavan de nuevo en tampón durante 5 min, para posteriormente proceder a su deshidratación, aclaramiento y montaje. Los controles de la técnica se llevan a cabo sustituyendo el anticuerpo primario por tampón de dilución (Dako). En todos los controles negativos no se obtuvo inmunotinción.

Los cortes se observan y fotografian en un microscopio Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con una cámara digital DP70 (Olympus).

Como criterio de inclusión de muestras discales se realiza la comprobación de que hay algún grado de movilidad entre los dos cuerpos vertebrales adyacentes. Los criterios de exclusión son la infección en ese nivel demostrada microscópicamente o macroscópicamente y el exitus del animal tras la intervención y el daño grave en la cola en la manipulación del animal.

De las 80 muestras de unidad intervertebral obtenidas se descartan para la obtención de resultados válidos 12 muestras, debido a la evidencia macroscópica o microscópica de infección en la unidad. En varios casos la infección se constata macroscópicamente antes o durante la extracción del disco intervertebral tras el sacrificio del animal, por exudado purulento desde el orificio de inserción de la broca para aislamiento del platillo vertebral. En algunas muestras ese exudado genera fístulas comunicadas con la piel. En las restantes muestras descartadas por infección la constatación de la misma se hace en el estudio microscópico, por la evidente proliferación de linfocitos en todas las muestras afectas. Se eliminan del estudio las muestras en las que se objetiva infección porque dicho proceso patológico supone

un modelo de degeneración distinto al propuesto (alteración de la vascularización local, efecto mecánico del pus como barrera al paso de nutrientes, inflamación desencadenada en los tejidos), y por tanto supondría un factor de confusión en el estudio.

Tras la obtención de unos primeros resultados parciales con el aislamiento de los primeros discos intervertebrales en los que se demostraba infección, se procede a intervenir nuevos ejemplares para no disminuir de forma importante el número de muestras disponibles en los resultados, pero la depuración de la técnica de intervención con la práctica no consigue eliminar completamente el riesgo de infección.

No se eliminan del estudio las muestras sin signos de infección dentro de los animales con alguna unidad intervertebral infectada, porque se entiende que el proceso degenerativo que puede favorecer la infección se produce sólo a nivel local. No se encuentran motivos para pensar que la infección en un nivel puede afectar a otros niveles no afectados en el mismo animal, partiendo de la hipótesis del modelo de degeneración discal con causa vascular. La afectación de la vascularización y difusión al disco desde el platillo vertebral en un nivel no implica afectación de segmentos adyacentes, cuyos discos pueden recibir nutrientes sin bloqueo de la difusión desde su platillo correspondiente.

Se disponen 68 muestras válidas de unidad intervertebral distribuidas en 16 animales, que se reparten en los 4 grupos descritos previamente como sigue: 4 ratas con 2 meses entre la intervención sobre los discos de la cola y el sacrificio y extracción de dichos discos, 4 ratas con 4 meses, 4 ratas con 6 meses y 4 ratas con 8 meses.

2.2 Método de medición de la degeneración

2.2.1 Van Gieson.

Mediante la observación microscópica de las muestras teñidas se adjudica a cada muestra un grado de degeneración mediante estudio ciego. La degeneración discal es valorada según la clasificación de Nishimura y Mochida: del 1 (mínima degeneración) al 5 (máxima degeneración).

2.2.2 Inmunohistoquímica.

Se determina la cantidad de colágeno VI en varias muestras preseleccionadas, mediante clasificación en tres grupos: marcado escaso o nulo (-), moderado (+) o intenso (++) . Esta observación se aplica principalmente al anillo fibroso, para establecer una relación con la clasificación de Nishimura y Mochida. Esta clasificación semicuantitativa es habitualmente utilizada en la valoración de muestras con aplicación de técnicas de inmunohistoquímica.

3 RESULTADOS

3.1 Van Gieson.

Los resultados obtenidos en todas las muestras se detallan en la tabla 1 y la figura 7.

Meses	2				4				6				8			
<i>Animal/ Intervención</i>	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°
<i>A</i>	1	1	3	In	5	1	In	In	2	5	2	1	In	1	1	1
<i>B</i>	4	1	1	1	1	3	1	In	5	2	4	In	In	1	2	1
<i>C</i>	1	In	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1
<i>D</i>	4	In	In	1	2	3	1	In	1	1	1	1	3	1	2	1
<i>E</i>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	In	1	1	1	1	2

Tabla 1. Resultados del grado de degeneración obtenido en cada muestra estudiada por tipo de intervención y tiempo transcurrido entre intervención y extracción para estudio. In: muestra infectada

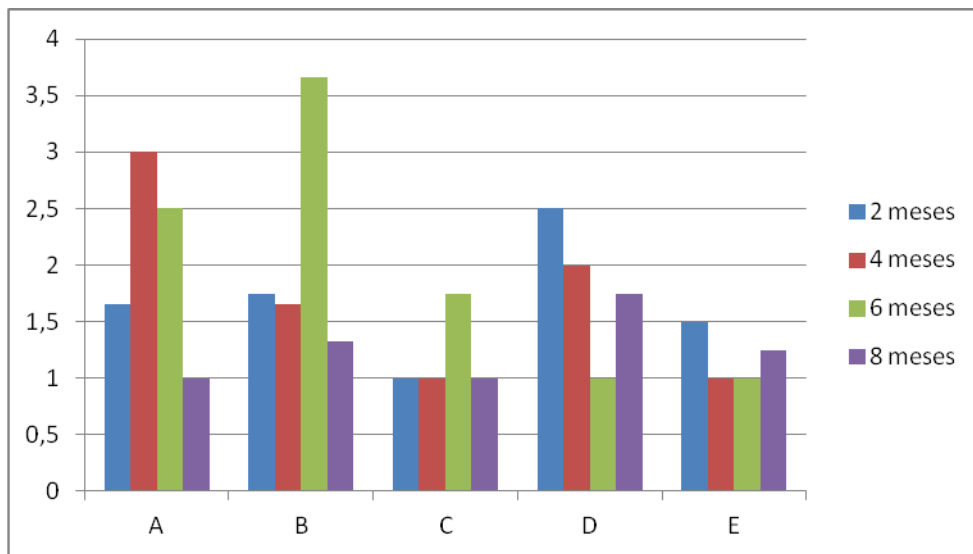


Figura 7. Resultados del grado de degeneración obtenido para cada grupo de muestras (según el tiempo transcurrido entre intervención y extracción para estudio) respecto al tipo de intervención realizada.

Se analizan los valores obtenidos mediante media simple/ aritmética y obtenemos los siguientes resultados de degeneración según tiempo transcurrido entre intervención y extracción de los discos afectados:

- Ratas con 2 meses: degeneración media 1,62
- Ratas con 4 meses: degeneración media 1,56
- Ratas con 6 meses: degeneración media 2,21
- Ratas con 8 meses: degeneración media 1,27

El conjunto de resultados se recoge en los gráficos de las figuras 8 y 9 .

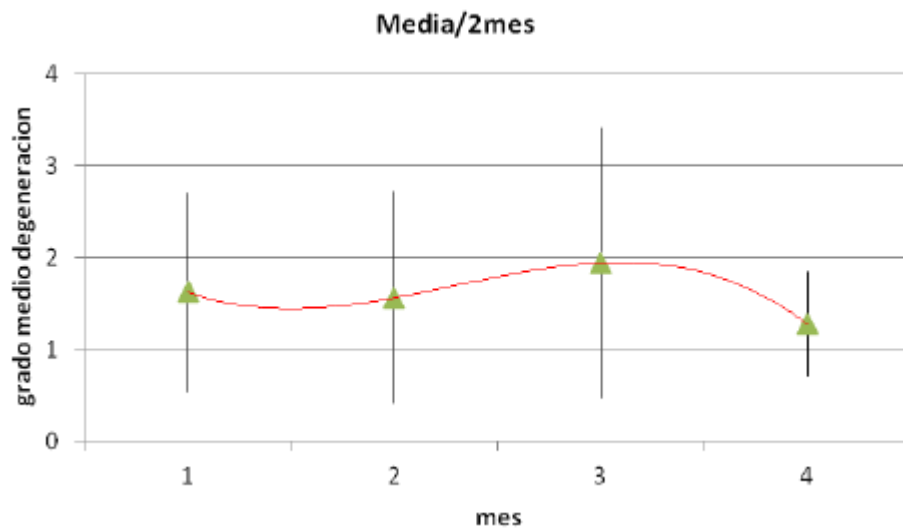


Figura 8. Promedio(media aritmética) de todas las observaciones realizadas en los periodos de 2, 4, 6, 8 meses

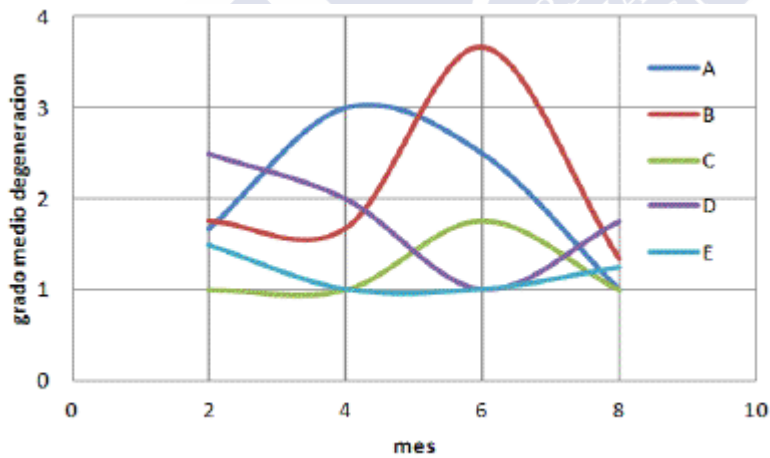


Figura 9. Media aritmética (promedio) correspondiente a la serie de datos de 2, 4, 6, y 8 meses para cada técnica.

El segundo punto de interés de los resultados de la investigación es la eficacia de cada tipo intervención aplicada en cada unidad intervertebral para obtener la aceleración del proceso degenerativo. Se realizan 5 tipos de intervención en las unidades

intervertebrales, las 5 aplicadas en la cola de cada uno de los 16 animales utilizados, y los resultados por tipo de intervención son los siguientes:

- A (aislado y sellado; un platillo vertebral): degeneración media 2,00
- B (aislado y sellado; los dos platillos vertebrales): degeneración media 2,08
- C (control sin intervención): degeneración media 1,20
- D (aislado sin sellado; los dos platillos vertebrales): degeneración media 1,93
- E (aislado sin sellado; un platillo vertebral): degeneración media 1,20

Los resultados siguen por tanto una secuencia de degeneración según el tipo de intervención sobre el disco como sigue (ver ver figura 10):

$$B > A > D > E = C$$

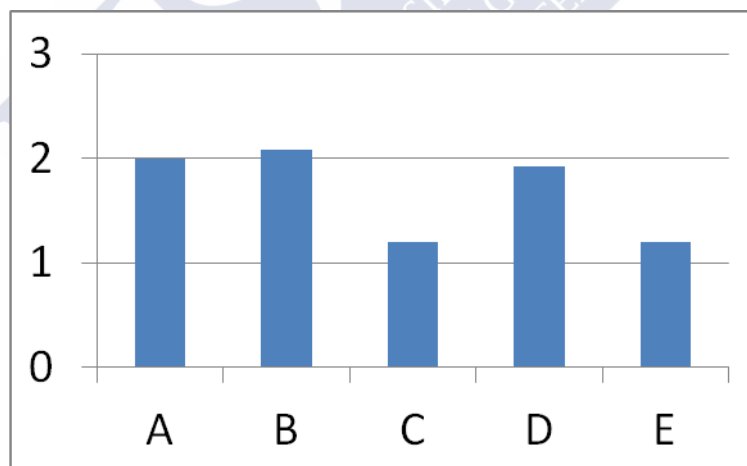


Figura 10. Grado de degeneración discal según tipo de intervención realizada en los platillos anexos.

La degeneración de los discos aislados y sellados en ambos platillos anexos es mayor que la de los que sufren aislado y sellado de un solo platillo, que a su vez es mayor que la de los discos con aislado sin sellado de los dos platillos. El menor

grado de degeneración se obtiene en los discos con asilado sin sellado de un platillo anexo y en los discos de control.

Para validar los datos obtenidos las valoraciones microscópicas de degeneración fueron realizadas por dos observadores de manera aislada. Para determinar el grado de concordancia en los resultados obtenidos por ambos se calculó el coeficiente kappa de los mismos. El principal problema de esta medida de concordancia radica en que está pensada para clasificaciones nominales, en las que no existe un orden de graduación entre las diferentes categorías. En nuestro estudio esto no es así, no es lo mismo que el desacuerdo se produzca clasificando una muestra como grado 1 por un evaluador y 2 por otro, a que uno de ellos clasifique como 1 y otro como 5. El índice kappa únicamente tiene en consideración si hay o no acuerdo, esto es si se clasifica o no al sujeto en la misma categoría, por lo que a la hora de calcularlo pesan por igual las dos situaciones anteriormente descritas. Para eliminar parcialmente este sesgo se simplifica la clasificación de Nishimura y Mochida, de tal forma que los grados 2,3 y 4 de degeneración discal se engloban en una sola categoría. Así los resultados se engloban en las siguientes categorías:

Grado 1. apariencia levemente serpenteante con alguna rotura del anillo fibroso.

Grado 2: apariencia moderada o gravemente serpenteante, con inversión parcial o complete de la concavidad-convexidad del anillo.

Grado 3: estructura indefinida.

Se realiza el coeficiente kappa según estas categorías de observaciones y el resultado es 0,55. Este coeficiente corresponde a un grado de concordancia moderado según Landis y Koch⁸², lo cual valida la observación microscópica para determinar el grado de degeneración discal en muestras teñidas con técnica de Van Gieson según la clasificación de Nishimura.

Ver apéndice *Imágenes representativas de cada grupo de estudio – Van Gieson*, figuras 10 a 20.

3.2. Inmunohistoquímica

Los resultados semicuantitativos sobre la cantidad de colágeno VI en las muestras marcadas se recoge en la tabla 2.

Meses	2		4		6			8	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º	3º	1º	2º
Animal/ intervención									
B	++	-	++	+	++		-		++
C	+		-	++			+	+	++
D	+	++	+	+	++	-	+		++

Tabla 2. Resultados del marcado con anticuerpos de colágeno VI obtenido en varias muestras estudiadas por tipo de intervención y tiempo transcurrido entre intervención y extracción para estudio

Se analizan los resultados mediante media aritmética aplicando a los valores semicuantitativos -,+ y ++ los valores numéricos 0, 1 y 2 respectivamente. Según el tiempo transcurrido entre la intervención sobre el disco y su estudio posterior el resultado es el que sigue, y que se muestra en la figura 11:

2 meses: 1,2

4 meses: 1,16

6 meses: 1

8 meses: 1,75

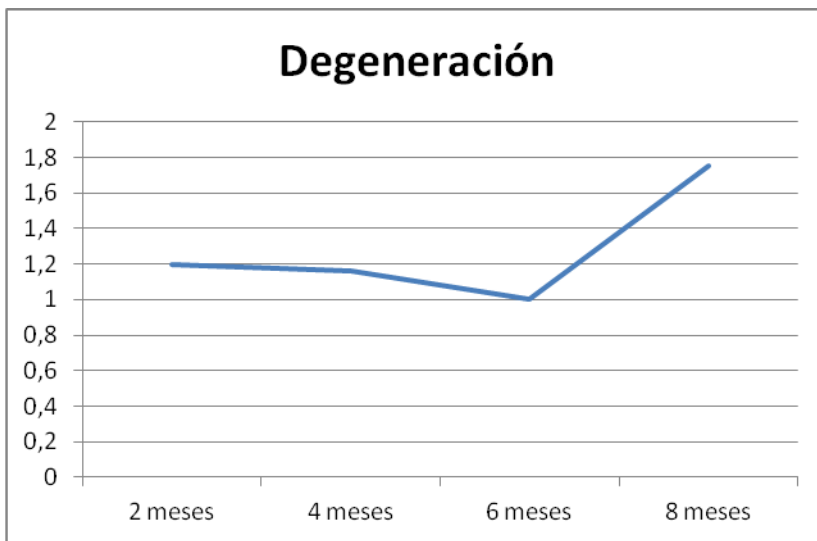


Figura 21. Promedio del grado de marcado de colágeno VI de todas las observaciones realizadas en los periodos de 2,4,6 y 8 meses.

El grado de marcado no sigue una clara progresión cronológica, puesto que a los 6 meses la presencia de colágeno VI es la mínima de los intervalos de tiempo y a los 8 meses la máxima.

Según el tipo de intervención realizada sobre el disco obtenemos los siguientes resultados de media aritmética:

B (aislado y sellado, los dos platillo vertebrales): 1,28

C (control sin intervención): 1,16

D (aislado sin sellado; los dos platillos vertebrales):1,25

El grado de marcado no difiere en gran medida entre unas intervenciones y otras, pero las escasas diferencias señalan una mayor presencia de colágeno VI en muestras de con intervención previa a su extracción que en aquellas de control sin intervención. El resultado en todo caso obedece nuevamente a la fórmula de degeneración por grupos de intervención sobre los discos que sigue (figura 12) :

$$B > D > C$$

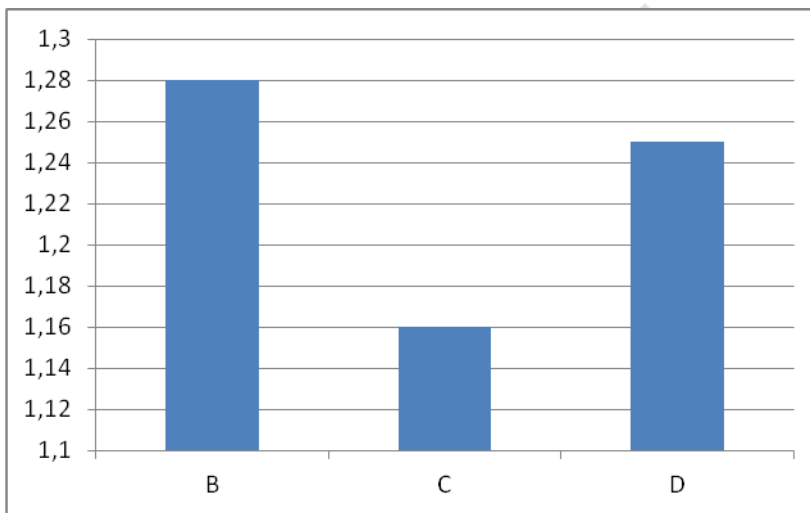


Figura 22. Intensidad de marcado con anticuerpos de colágeno VI según tipo de intervención realizada.

Ver apéndice *Imágenes representativas de cada grupo de estudio* -
Inmunohistoquímica, figuras 23 a 28.

4 DISCUSIÓN

El proceso de degeneración progresa estadísticamente hasta el grupo de 6 meses transcurridos desde la intervención que acelera la degeneración fisiológica en el estudio con Van Gieson según la clasificación de Nishimura y Mochida (hasta los 8 meses según el estudio por inmunohistoquímica de colágeno VI). A los 8 meses la degeneración media es significativamente menor, de lo que se deduce que en 6 meses se obtiene muestras de discos intervertebrales con la máxima degeneración que podemos provocar de manera artificial. También es posible que en la cola de rata se pueda producir una reversión de los cambios estructurales debidos a la degeneración, asociado al aporte vascular que suponen las partes blandas perivertebrales. Este resultado plantea la posibilidad de la reversibilidad del proceso degenerativo. Se justificaría así la necesidad de estudiar métodos terapéuticos que recuperasen la vascularización del disco desde el platillo vertebral para revertir cambios degenerativos estructurales ya establecidos.

En todos los grupos de tiempo de evolución se obtiene alguna muestra con infección, lo que descarta una asociación rígida entre tiempo desde la intervención y el riesgo de desarrollar un proceso infeccioso.

En el análisis de los resultados por tipo de intervención realizada la degeneración es mayor en los dos tipos de estudio realizado (Van Gieson e inmunohistoquímica de colágeno VI) en aquellos discos en los que la separación del platillo vertebral respecto al cuerpo vertebral es completa e irreversible, por cuanto se

interpone una sustancia inerte que asegura el total sellado de los canales vasculares a los platillos vertebrales y la imposibilidad de su reinstauración. En las muestras en que el aislamiento se realiza sin sellado con sustancia biocompatible la degeneración es significativamente menor, probablemente por la posibilidad de revascularización del disco a corto plazo.

El material empleado para el sellado del platillo vertebral en algunos discos se considera biocompatible a priori. Este hecho se corrobora en los resultados de la observación macroscópica *a posteriori*, dado que en ninguna de las muestras selladas se evidencia presencia de barreras fibrosas o macrófagos que puedan significar reacción inflamatoria debida a material empleado. Por tanto se consigue un modelo unívoco de degeneración discal: el aislamiento vascular del platillo, no alterado por reacción inflamatoria local.

La degeneración mayor de los discos proximales no se relaciona con una mayor degeneración de los discos distales, lo cual confiere más valor al diseño del estudio con distintos tipos de intervención en segmentos consecutivos del mismo animal.

Independientemente del tipo de intervención realizada (sólo aislamiento o aislamiento y sellado) el grado de degeneración obtenido es mayor en las muestras en que la intervención se realiza sobre los dos platillos vertebrales de la unidad intervertebral, lo cual da pie a pensar que ambos platillos son importantes en la difusión de nutrientes que permita mantener la homeostasis del disco intervertebral.

En el análisis de los resultados por tipo de estudio se objetiva que tanto en el estudio por tinción con Van Gieson como en el realizado por inmunohistoquímica de colágeno VI se evidencia que la degeneración discal es más avanzada en discos con aislamiento más completo de los platillos vertebrales. Si bien no existe una relación directa entre los resultados de ambos estudios en cada muestra, ambos demuestran de forma independiente que la degeneración discal es mayor cuanto más importante es la intervención realizada para aislar el aporte vascular desde el platillo vertebral. El

estudio con tinción Van Gieson lo hace de forma subjetiva, en relación al aspecto del anillo fibroso, mientras que el estudio por inmunohistoquímica lo hace de forma objetiva semicuantitativa. Esta distinción en la forma y coincidencia en el resultado global aporta validez mutua a ambos tipos de estudio y corrobora estudios previos de otros autores sobre la importancia del colágeno VI en el proceso de degeneración discal.

La discordancia respecto a la menor cantidad de colágeno VI en muestras de 6 meses desde la intervención, donde la degeneración histológica del anillo fibroso es mayor, podría explicarse por el proceso natural de acumulación de colágeno VI como consecuencia del proceso degenerativo una vez iniciado, no como causa ni como marcador cronológico fiable. Sin embargo este punto precisa estudios más amplios.

Del análisis de los gráficos de las figuras 7 y 8 se pueden inferir varias cuestiones:

- Para una misma intervención, aislado y sellado, la evolución de la degeneración es mayor en fase más precoz si se interviene un solo lado del disco (A) y más tardía si se intervienen los dos lados (B). Esto podría resultar de la mayor capacidad de inversión de los cambios degenerativos con el tiempo a expensas de la vascularización que recibe el disco mediante uno de sus platillos vertebrales.
- Para la intervención sin sellado de los platillos vertebrales la degeneración es mayor en la fase inicial. Esto está probablemente relacionado con una mayor capacidad para invertir los cambios degenerativos con el tiempo a expensas de la reorganización de los canales vasculares hasta el disco en la zona aislada pero no sellada.
- En el grupo control la degeneración es mayor hacia los 6 meses de evolución y luego disminuye, al igual que el global de muestras en conjunto. Esto concuerda con el uso de estas muestras como grupo control sin intervención, por tanto relacionado por el proceso natural de degeneración discal.

En la mitad de los animales intervenidos y en un 15% de los discos examinados aparecen signos de infección de algún tipo, desde fístulas cutáneas con emisión de pus desde el cuerpo vertebral intervenido hasta proliferación linfocítica en el tejido discal en la observación microscópica. Estas altas tasas de infección obtenidas obedecen a un riesgo inherente al modelo animal empleado por diversos motivos:

- No se puede garantizar la asepsia del proceso por no poder esterilizar el motor de brocado ni disponer de un quirófano con las condiciones de asepsia necesarias.
- No se puede preparar de la piel mediante rasurado previo ni aplicación de antiséptico, que introducido posteriormente en el cambio operatorio podría suponer un factor de confusión en el estudio, dado que puede suponer una perturbación citológica (por cito lisis), química (por inducción de respuestas celulares) o física.
- No se puede realizar cambio de curas periódico en el postoperatorio, porque es imposible conseguir que la rata no acceda a la herida quirúrgica con la boca.
- No fue posible el uso de antibióticos profilácticos.

A pesar de las infecciones provocadas en las muestras el proceso no afecta a la validez del estudio, por cuanto la media de degeneración presente en los animales con algún nivel infectado es menor (1,70) que la presente en los demás animales (1,85), de lo que se deduce que la aparición de alguna muestra infectada en un animal no conlleva una mayor degeneración en las muestras no infectadas.

Se utiliza la raza Sprague-Dawley por la fácil disponibilidad de la misma para la realización del estudio, lo que redundaría en la reproducibilidad del mismo. Es logística y técnicamente más sencillo trabajar en la cola y no en columna lumbar, donde habría más complicaciones intra y postoperatorias. El modelo seleccionado presenta un tamaño adecuado para realizar la intervención y posteriormente la extracción de discos de forma ágil, sin gran demora entre el sacrificio del animal y la fijación de los discos para su estudio microscópico. De esta forma el resultado del modelo aplicado se altera levemente por la degeneración que provoca sobre los discos intervertebrales la a vascularización completa tras su extracción del animal.

Los discos intervertebrales de animales pequeños no son los más adecuados para experimentación biomecánica³⁹, pero ésta no se realiza en el presente estudio más allá de los condicionantes biomecánicos que establecen la propia musculatura y movilidad de la rata en el estudio *in vivo*; por tanto el tamaño no supone inconveniente en ese sentido.

Trabajos previos han estudiado características geométricas macroscópicas (altura, grosor) de los discos de cola de la raza Sprague-Dawley para el estudio de la degeneración discal⁸³. En un estudio de O'Connell y col. sobre la geometría de los discos intervertebrales en distintas especies animales y en diferentes localizaciones dentro de la columna vertebral se encontró que los modelos de columna lumbar de ratón y rata presentan las mayores similitudes con los discos intervertebrales de columna lumbar humana respecto a otros animales, siendo el modelo de cola de rata el que mayor desviación presenta respecto a los parámetros geométricos identificados para el estudio⁸⁴. Este hecho se considera irrelevante en la presente investigación, dado que como se comentó anteriormente el fin de la misma no es el estudio de la respuesta biomecánica a estímulos mecánicos, si no la respuesta histológica a un proceso degenerativo provocado por el déficit de nutrientes. Por tanto los beneficios obtenidos del modelo seleccionado superan los inconvenientes derivados de una geometría diferente respecto al modelo humano. La estructura del disco se compone en todos los casos de la misma forma: anillo fibroso y núcleo pulposo entre platillos vertebrales, que se someten a fuerzas de flexión multidireccional, torsión y carga axial. Estas fuerzas en el modelo animal propuesto (cola de rata) son debidas a la acción de los músculos que movilizan la cola. Es recalable que en el estudio de O'Connell los discos de animales de mayor tamaño se estudiaron en muestras semicongeladas, mientras que en animales menores se hizo en muestras fijadas. Esta diferencia entre muestras puede suponer un factor de confusión al comparar de forma precisa ciertas variables geométricas del disco intervertebral en relación al de humanos.

El núcleo pulposo del disco intervertebral de humanos y ratas contiene células similares: unas pequeñas y poligonales y otras grandes con vacuolas^{85,86}, lo que podría traducir un similar comportamiento biológico en ambas especies en respuesta del disco intervertebral a diferentes estímulos. Diversos estudios describen hallazgos similares en los cambios degenerativos de los discos intervertebrales de humanos y ratas, en las que estos cambios se ven con más frecuencia a partir de los 18 meses de edad. La ausencia de datos precisos sobre incidencia de cambios degenerativos discales en cualquier modelo animal es un problema para predecir la evolución del proceso en relación al desarrollo fisiológico del mismo.

Otro aspecto que impide la comparación entre ambas especies es la presencia de células de la notocorda en el núcleo pulposo como vestigio embrionario. En los discos de ratas jóvenes estas células son predominantes, mientras que en discos humanos predominan las células condrocíticas, con escasas células de la notocorda hasta los doce años. Los condrocitos del platillo vertebral y anillo fibroso emigran hacia el núcleo pulposo⁴³, al tiempo que las células de la notocorda sufren apoptosis mediada por la vía de la caspasa-9 mitocondrial³⁹. Esto apoya el uso de la clasificación de cambios en el anillo fibroso propuesta por Nishimura y Mochida para analizar los resultados, dado que no incluye cambios a nivel celular ni del núcleo pulposo.

Un aspecto fundamental en este estudio es la conservación del platillo vertebral, para el desarrollo el modelo propuesto. Su conservación y ulterior manipulación determinan la naturaleza de los sucesos que queremos investigar. En un trabajo *in vitro* previo⁸⁷ se demostró que unos discos con sus platillos vertebrales, en un cultivo de órgano aislado, son capaces de mantener su estructura microscópica íntegra durante un tiempo; por lo que la difusión a través de dichos platillos vertebrales parece suficiente para mantener la viabilidad del disco.

Haschtmann y cols. propusieron en su estudio un modelo de cultivo *in vitro* de disco intervertebral como órgano sólido procedente de conejos blancos de Nueva Zelanda. Utilizaron animales de 34,6 meses de edad en los que el platillo de crecimiento

vertebral aun no está fusionado al cuerpo. Esto les sirvió como lugar de separación de la unidad vertebral en ausencia de hueso anexo para facilitar el aislamiento del platillo junto al disco intervertebral. Obtuvieron un 81% de viabilidad celular en el órgano a los 49 días de cultivo, con un 33% de actividad metabólica residual. No objetivaron un descenso significativo en el contenido en proteoglicanos del disco, pero disminuyó la transcripción del gen del agregano (un 88%) y el RNAm del colágeno tipo II (un 89% en núcleo pulposo y un 98% en anillo fibroso); el colágeno I se mantuvo en niveles normales. Concluyeron que el cultivo de discos enteros en medio adecuado se ve limitado por el tamaño del disco, dado que el coeficiente de difusión de ciertos nutrientes es deficiente⁶⁹.

Para estudiar la vascularización del platillo vertebral Lee y col. analizaron la respuesta del disco intervertebral entero a las perturbaciones mecánicas. Obtuvieron poca viabilidad celular debido a la formación de coágulos de sangre en el platillo vertebral, que impedía el paso de medio al disco. Sin embargo obtuvieron mayor viabilidad celular al cultivar durante 7 días los discos intervertebrales sin platillo vertebral (similar a la obtenida tras un día de cultivo)¹. Esto traduce la importancia del paso de nutrientes a través de los platillos vertebrales, cuya eliminación también afecta a la integridad estructural del anillo fibroso y altera la biomecánica del disco. Por ello es interesante un modelo de intervención que respete el platillo vertebral pero elimine la barrera que los coágulos en los sinusoides óseos pueden provocar.

Existe un problema en nuestro estudio relacionado con el aporte de nutrientes a través del platillo vertebral. En continuidad con el periostio que recubre los cuerpos vertebrales hay tejido conjuntivo de aspecto claramente vascularizado, tejido que apenas se altera en el proceso de intervención y que por tanto queda indemne tras el aislamiento de los discos. Los discos intervertebrales reciben nutrición por difusión periférica desde los tejidos blandos periféricos hacia las capas más externas del anillo fibroso¹⁵, y esto puede suponer una vía de escape al aislamiento nutricional que se pretende provocar en este modelo experimental de aislamiento del platillo vertebral. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el aporte nutricional derivado

de los platillos vertebrales es más importante que el que pueda proceder de este tejido conjuntivo que recubre al disco, dado que eliminando el aporte desde los platillos vertebrales los discos sufren un mayor proceso de degeneración que en muestras control, siendo en todos los casos respetado dicho tejido conjuntivo. Por tanto el tejido conjuntivo referido supondría un aporte suplementario a la viabilidad del disco, pero no el aporte principal que mantenga la homeostasis. Este podría ser un aspecto importante en la posible revascularización de discos con cambios degenerativos establecidos a largo plazo que precisaría estudios más amplios e específicamente diseñados a su investigación.

Para la investigación del proceso de degeneración del disco intervertebral existen dos tipos de estudio: *in vivo* e *in vitro*. Diversas posibilidades se manejan para el modelo de estudio *in vitro*: cultivo celular (monocapa o en tres dimensiones), cultivo tisular y el cultivo de órgano sólido. Los cultivos celulares y tisulares son más reproducibles que los de órgano sólido; particularmente en el cultivo celular en 3D se conserva la naturaleza condrocítica de las células del núcleo pulposo con una mayor producción de matriz extracelular. En cultivos tisulares los efectos de TGF- β y FGF son mayores en las células del núcleo pulposo, mientras que los de la IGF-1 sólo se aprecian en éstas, y no en las del anillo fibroso, siendo la respuesta a estas moléculas menor cuanto mayor es la edad del animal⁸⁸. El problema de los cultivos celular y tisular es que alterando el medio de desarrollo de las células se altera su comportamiento. Para estudiar la biología de las células del núcleo pulposo se exige imitar el peculiar ambiente en el que desarrolla su metabolismo en cuanto a pH y tensión de oxígeno

El cultivo de órgano sólido tiene limitaciones, pero aporta más información que el cultivo celular antes de llegar al estudio *in vivo*¹. En el cultivo celular las células cambian rápidamente sus características fenotípicas por la alteración ambiental⁶, y porque en ausencia de matriz extracelular se producen contactos directos entre células⁴³. En el órgano entero el ambiente celular permanece menos alterado, lo que evita ciertos estímulos y señales que llevan a las células a comportamientos anómalos. Una muestra de este hecho son los resultados de un estudio de Nomura sobre aloinjertos de núcleo

pulposo en discos con inducción del proceso degenerativo: este se retrasaba en mayor medida en los discos en los que se introducía núcleo pulposo intacto como tejido, frente a los que sólo recibían células del núcleo pulposo. Esto determina de la importancia de las relaciones de estas células con la matriz extracelular para el desarrollo de sus funciones, idea que soportan diversos autores^{25,54}. Los problemas asociados a los estudios sobre órgano sólido son que se pierden proteoglicanos progresivamente^{77,85} y no se tiene en cuenta el control neuromuscular alrededor del disco, lo que limita su aplicabilidad clínica (problema atribuible a todo estudio *in vitro*).

La separación de la unidad vertebral respecto a los cuerpos vertebrales en nuestro estudio previo *in vitro*⁸⁷ se realiza entre el hueso y los platillos vertebrales proximal y distal de cada disco obtenido. De esta forma se consigue mayor supervivencia celular que realizando el corte por plano óseo, dado que la sangre coagulada en los sinusoides del hueso anexo a los platillos vertebrales impide la correcta difusión de nutrientes desde estos hacia el disco⁶⁹. Si el corte no se realiza a través de hueso esponjoso la presencia de coágulos será menor y por tanto la revascularización y paso de nutrientes será posible mientras no se aplique otra barrera.

En la observación macroscópica del estudio *in vitro* no se evidencian diferencias significativas entre los discos fijados en fresco y los cultivados en medio DMEM durante 1 semana. Por tanto se puede cultivar *ex vivo*, *in vitro* un disco intervertebral de cola de rata sin que se altere su estructura a nivel de microscopía óptica. De ello deducimos que la estructura que aporta los nutrientes al interior del disco intervertebral está en el interior de la unidad funcional. Con toda probabilidad se trata del platillo vertebral.

Tenemos comprobación experimental previa de que en presencia adecuada de nutrientes se conserva la integridad histológica de los discos intervertebrales (y por tanto que alguna estructura del órgano aislado es responsable de introducir esos

nutrientes al disco intervertebral), por lo que en nuestro estudio provocamos *in vivo* el fenómeno degenerativo. Con el paso a estudio *in vivo* se persiguen tres objetivos:

a) conseguir un proceso más parecido al fisiológico.

b) evitar el factor de confusión que puede crear el hecho de que el disco intervertebral de cola de rata es más pequeño que el de humano, porque la difusión de nutrientes desde la periferia del anillo fibroso hasta el núcleo pulposo es más eficiente.

c) se añade la variable del control neuromuscular de la función del disco intervertebral durante el estudio, lo que redundará en su aplicabilidad.

El principal problema que plantea un estudio *in vivo* es que es difícil controlar el efecto de factores estresantes desconocidos que pueden afectar al proceso degenerativo, y de los que todavía se desconoce su influencia⁴³. Se tuvo en cuenta para la realización del estudio que el modelo animal fuera ético, controlable, reproducible (para que los resultados del estudio fueran comparables) y coste-efectivo³⁹ (el precio de una rata de laboratorio es 20€).

Dentro de los modelos experimentales de degeneración discal en animales se encuentran en la literatura dos variantes: los que aplican una perturbación mecánica y los que proponen alteración estructural. En el primer caso se incluyen modelos que aumentan de forma artificial las solicitudes mecánicas del animal, como torsión, distracción, compresión o flexión. En la segunda categoría se incluye la lesión directa del disco intervertebral, aspiración de contenido⁸ o la inyección de alguna sustancia química o enzimática que induzca cambios degenerativos¹⁰. En ninguno de los dos casos son modelos asimilables a las causas primeras subyacentes al proceso real de degeneración patológica.

La propuesta de modelos con perturbación mecánica tiene una gran tardanza para ofrecer resultados degenerativos, y se fundamenta en la teoría clásica de que son las solitudes mecánicas las que desencadenan el proceso, cuestión que no es probable. En el modelo con alteración estructural directa es impensable que tal desencadenante se pueda aplicar en el proceso de degeneración discal real, por cuanto una simple perforación del anillo fibroso introduce al disco en una fase ya avanzada del proceso degenerativo, sin evocar la etiopatogenia real del mismo.

La imposibilidad de extrapolación del modelo a la clínica es aplicable a estudios que añaden la inyección de sustancias químicas que modifican la citología del disco¹⁰, en tanto que en tales estudios se están aplicando dos modelos experimentales (químico y mecánico), no pudiendo discernir a cuál de los dos corresponden los cambios degenerativos provocados. Algunos autores aseguran que la intervención directa sobre el disco se puede realizar sin que se contribuya a acelerar la degeneración de forma artificial, en base a observaciones macroscópicas o radiológicas⁸⁹; pero las alteraciones microscópicas en los tejidos comienzan de forma muy sutil y a muy temprana edad, y diversos autores defienden que preservar la viabilidad del núcleo pulposo y la estructura del anillo fibroso es el principal ítem a conseguir para decelerar el proceso de degeneración discal³⁸. Estos estudios proponen reacciones químicas y enzimáticas reproducibles en el interior del disco implicadas en el desarrollo de la enfermedad degenerativa, si bien no es posible discernir en qué medida la inyección del disco causa el proceso degenerativo de forma fisiológica o patológica (aún sin introducción de sustancias).

En nuestro estudio se opta por un modelo distinto como desencadenante de la degeneración: la modificación de la difusión de nutrientes hacia el disco. Este modelo se aproxima más a recientes teorías sobre la insuficiencia de vascularización como causa de la degeneración discal, base del modelo que proponemos.

La metodología que se aplica en el modelo degenerativo propuesto es lo suficientemente sencilla como para ser reproducible, con la expectativa de obtener un modelo animal con suficiente fiabilidad. Permite la utilización de animales suplentes de manera inmediata en cuanto se descartan otros debido a *exitus* y infecciones evidentes. Las doce ratas incluidas en el estudio se mantienen vivas en periodos que llegan a los 8 meses desde la intervención en algunos casos, por lo que es interesante destacar que en estudios *in vitro* previos sobre métodos de cultivo de órgano entero *in vitro* los tiempos que se manejaron fueron de 3 a 24 semanas^{25,37,90,91,92,93}. A los 6 meses se comienzan a perder proteoglicanos y viabilidad celular, lo que altera la homeostasis del disco intervertebral⁹⁴. Este punto añade valor al presente trabajo respecto a precedentes sobre el tema por lo prolongado de los tiempos de evolución ensayados.

El modelo de degeneración discal por interrupción del flujo vascular a los platillos vertebrales en cola de rata es un modelo fisiológico. Por otro lado es oportuno, en tanto en cuanto da respuesta a la necesidad de un modelo en el que basarse para desarrollar líneas de investigación en ingeniería tisular del disco intervertebral. Se trata de un modelo original, poco perturbador del entorno en previsión de manipulaciones posteriores (investigación de líneas terapéuticas, como se mencionó anteriormente). A ello se añade que es un modelo sencillo desde el punto de vista de técnico y de logístico.

5 CONCLUSIONES

- 1) El bloqueo del aporte vascular a los platillos vertebrales produce degeneración del disco intervertebral.
- 2) Ese proceso degenerativo provocado sigue una evolución progresiva, como progresivo es lo visto en el ser humano.
- 3) Si el bloqueo es reversible, la degeneración provocada es menor.
- 4) El bloqueo parcial (un platillo) produce una degeneración menor que el cuasitotal (dos platillos), siendo el parcial reversible de un efecto poco diferenciable del grupo control.
- 5) El proceso degenerativo es mayor según avanza el tiempo

Y de todas ellas:

El modelo degenerativo de disco intervertebral en cola de rata mediante supresión del aporte vascular a los platillos vertebrales puede servir de base a futuros estudios de líneas terapéuticas para modular la degeneración del disco intervertebral.



APENDICE

Lista de imágenes representativas de cada grupo de estudio

1. Van Gieson

Figura 11. 2 meses/ Intervención A/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 3

Figura 12. 2 meses/ Intervención A/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 3

Figura 13. 6 meses/ Intervención B/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 5

Figura 14. 4. 6 meses/ Intervención B/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 5

Figura 15. 2 meses/ Intervención C/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 1

Figura 16. 2 meses/ Intervención C/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 1

Figura 17. 8 meses/ Intervención D/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 2

Figura 18. 8 meses/ Intervención D/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 2

Figura 19. 4 meses/ Intervención E/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 1

Figura 20. 4 meses/ Intervención E/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 1

2. Inmunohistoquímica colágeno IV

Figura 23. 6 meses / Intervención D/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado ++

Figura 24. 2 meses / Intervención B/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado ++

Figura 25. 4 meses / intervención D/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado +

Figura 26. 6 meses/ Intervención C/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado +

Figura 27. 2 meses / Intervención B / Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado –

Figura 28. 3 meses / Intervención C/ Inmunohistoquímica de colágeno V / marcado –

3. Infección

Figura 29. Muestra con infección. Tinción de hematoxilina-eosina. 4 aumentos

Figura 30. Muestra con infección. Tinción de hematoxilina-eosina. 10 aumentos

Imágenes representativas de cada grupo de estudio.

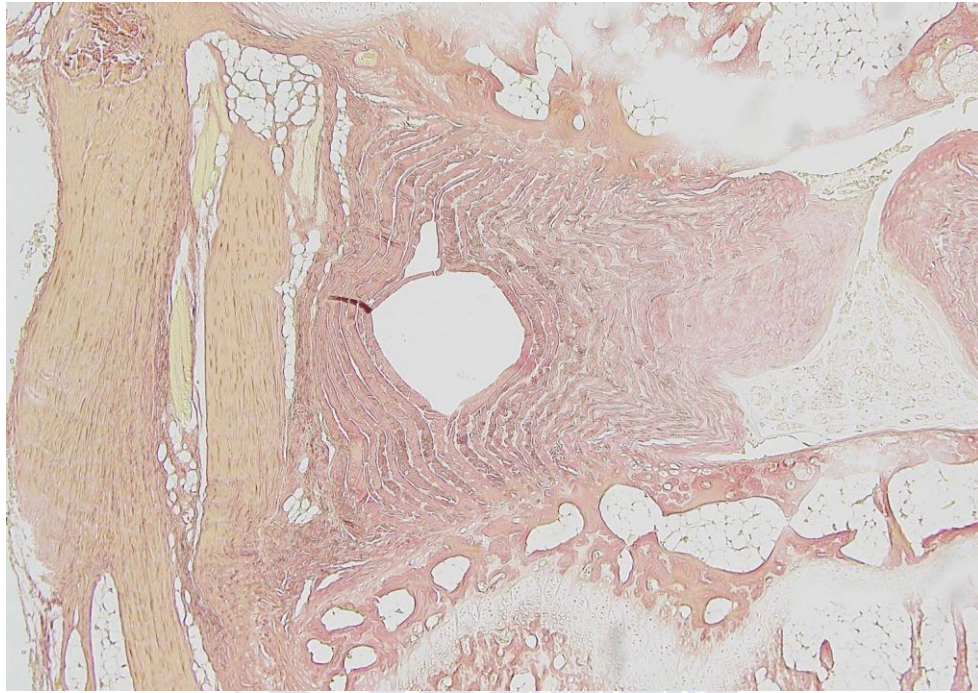


Figura 11. 2 meses/ Intervención A/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 3.

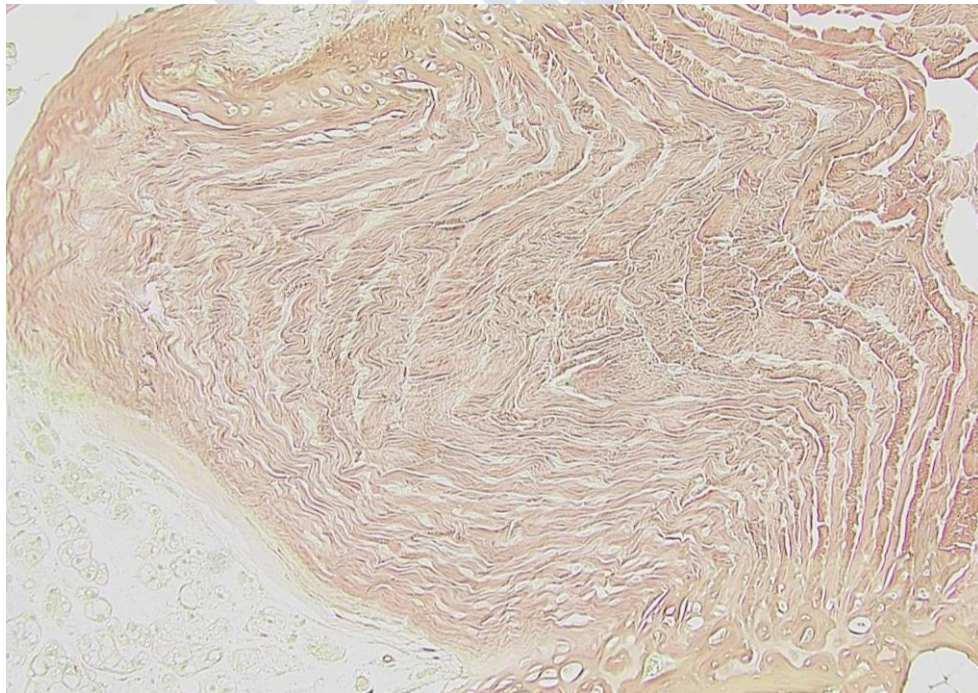


Figura 12. 2 meses/ Intervención A/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 3.



Figura 13. 6 meses/ Intervención B/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 5.



Figura 14. 6 meses/ Intervención B/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 5.

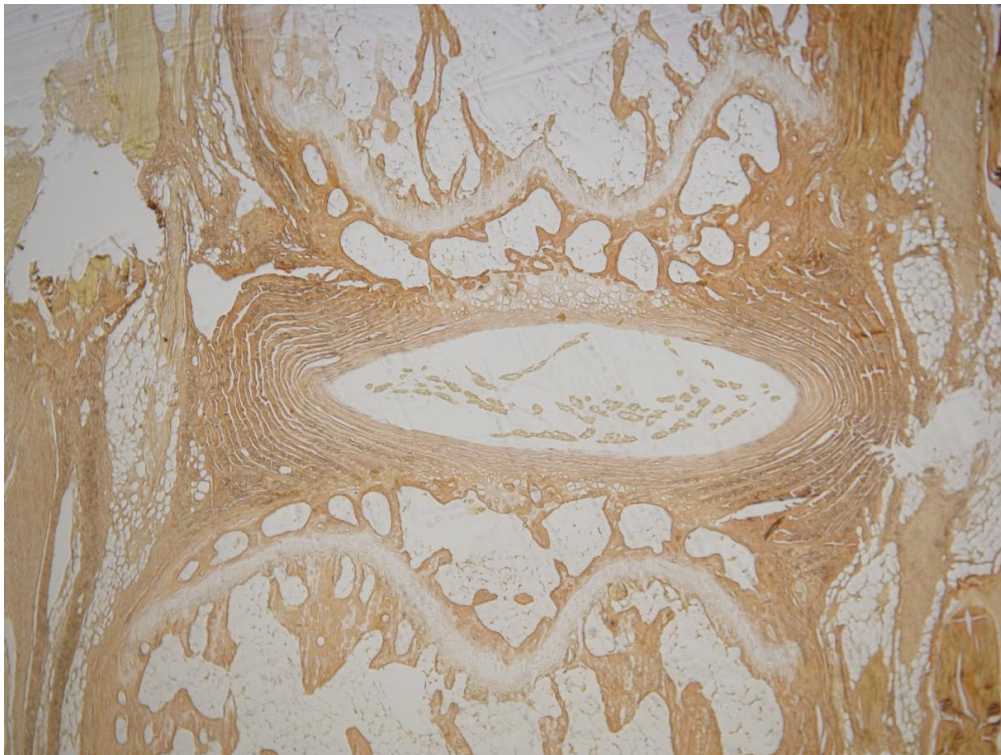


Figura 15. 2 meses/ Intervención C/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 1

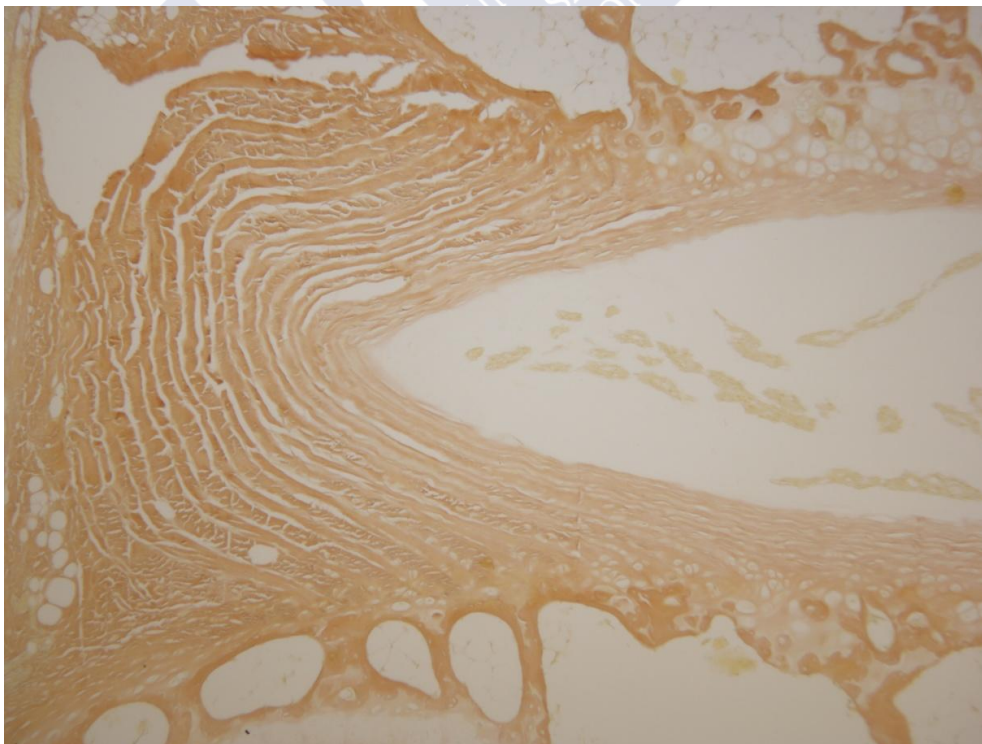


Figura 16. 2 meses/ Intervención C/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 1.

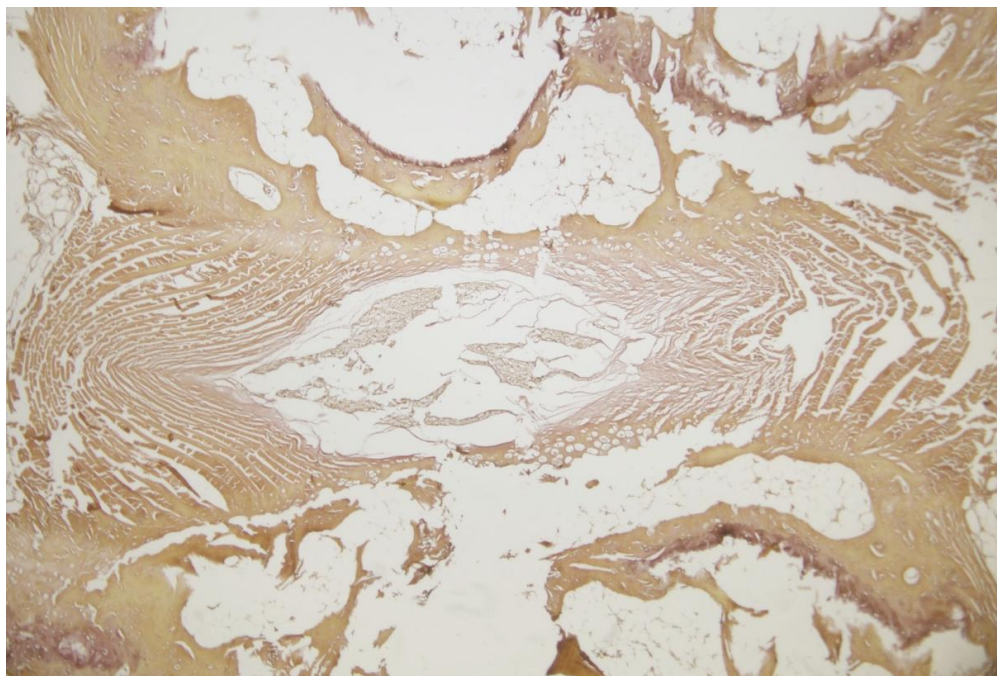


Figura 17. 8 meses/ Intervención D/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 2.

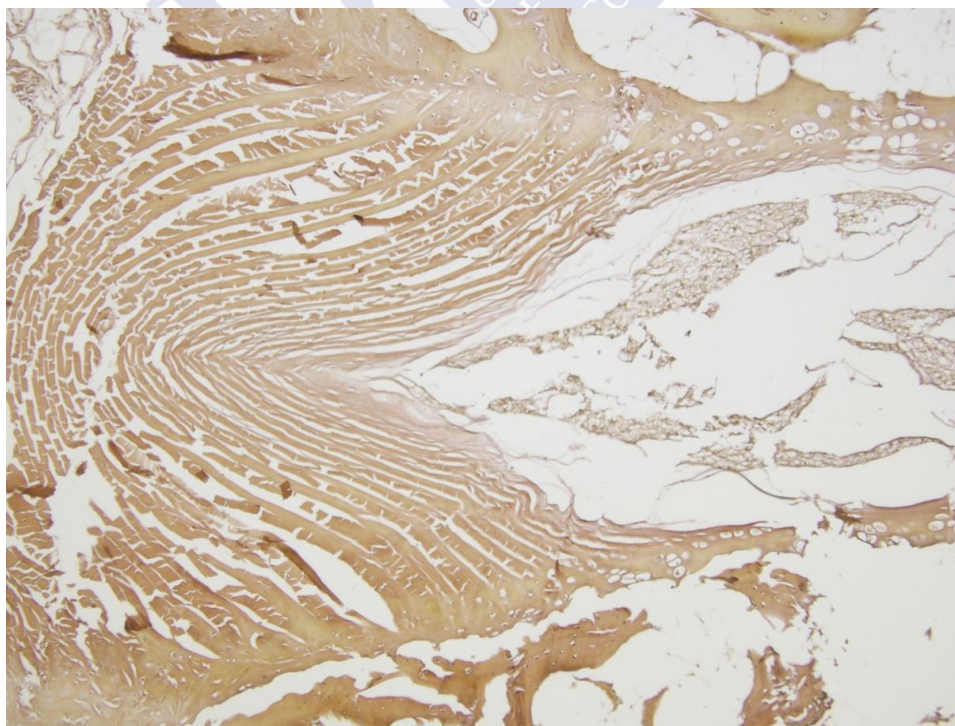


Figura 18. 8 meses/ Intervención D/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 2.



Figura 19. 4 meses/ Intervención E/ Tinción Van Gieson/ 4 aumentos/ Degeneración grado 1.

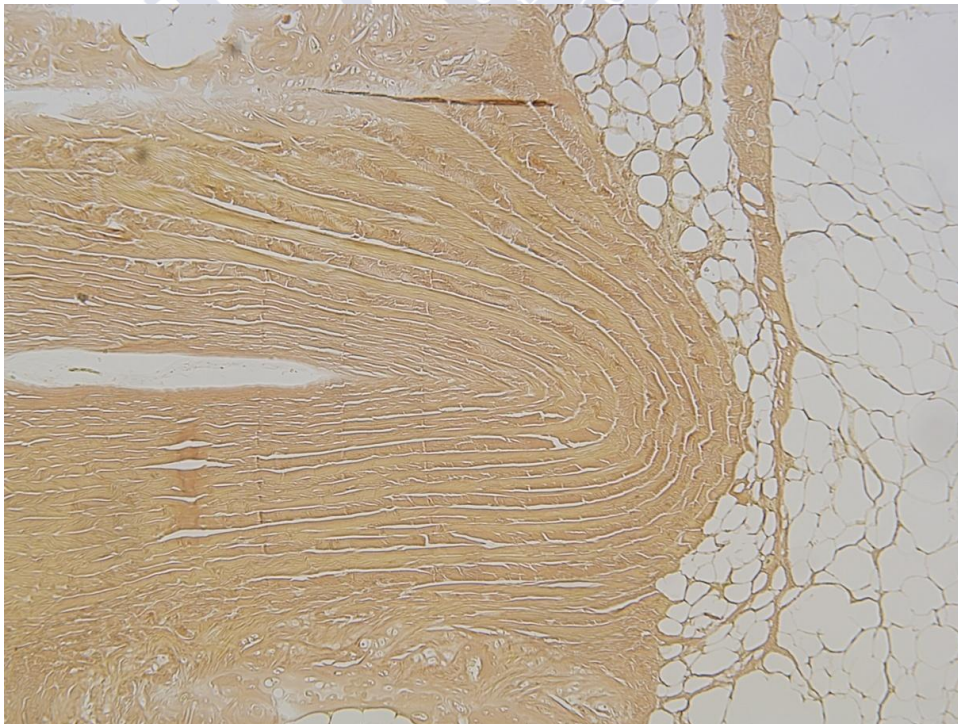


Figura 20. 4 meses/ Intervención E/ Tinción Van Gieson/ 10 aumentos/ Degeneración grado 1.

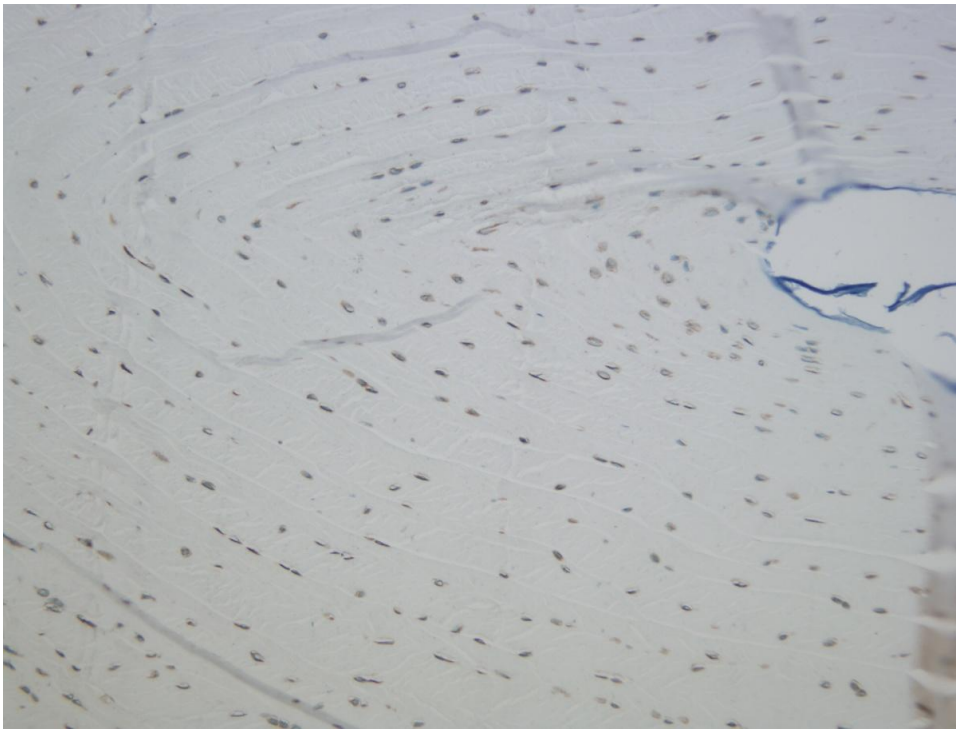


Figura 23. 6 meses / Intervención D/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado ++

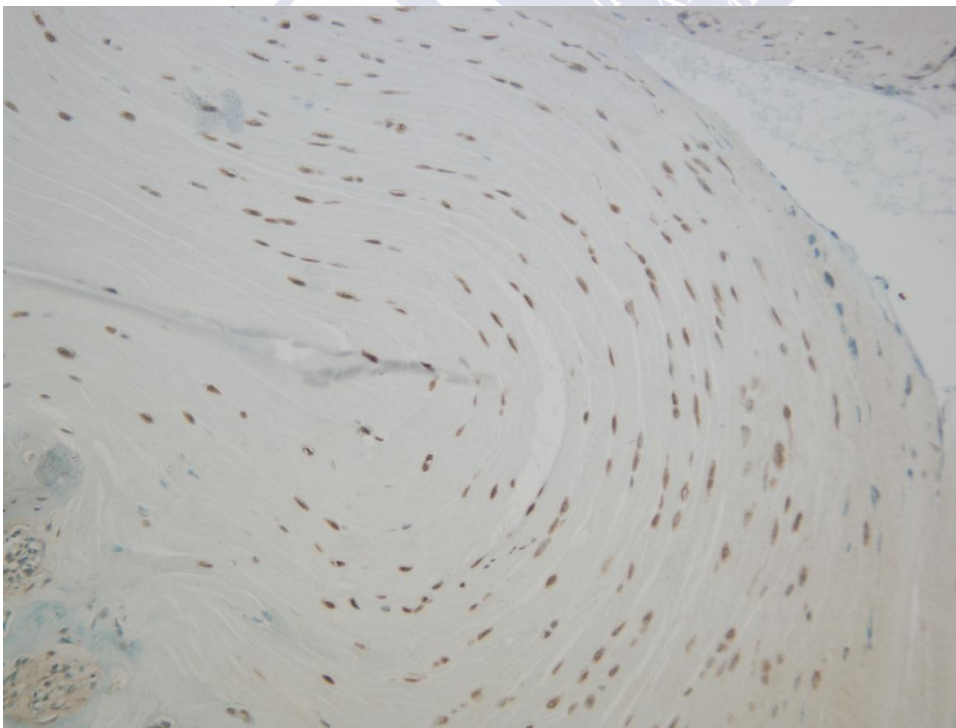


Figura 24. 2 meses / Intervención B/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado ++

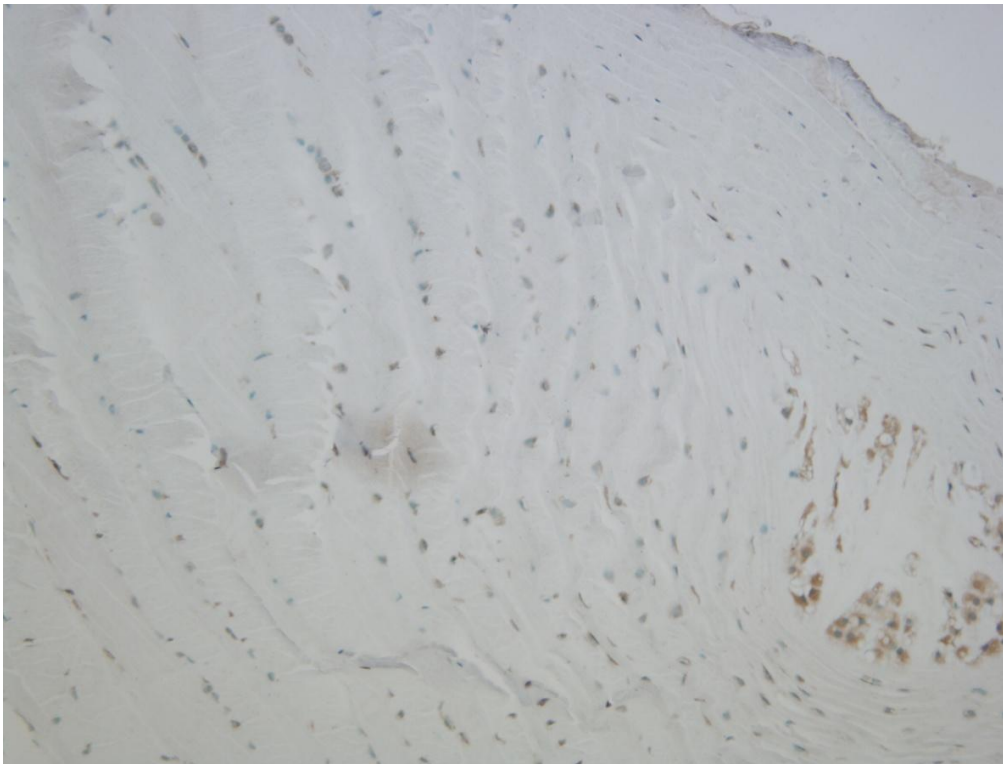


Figura 25. 4 meses / intervención D/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado +

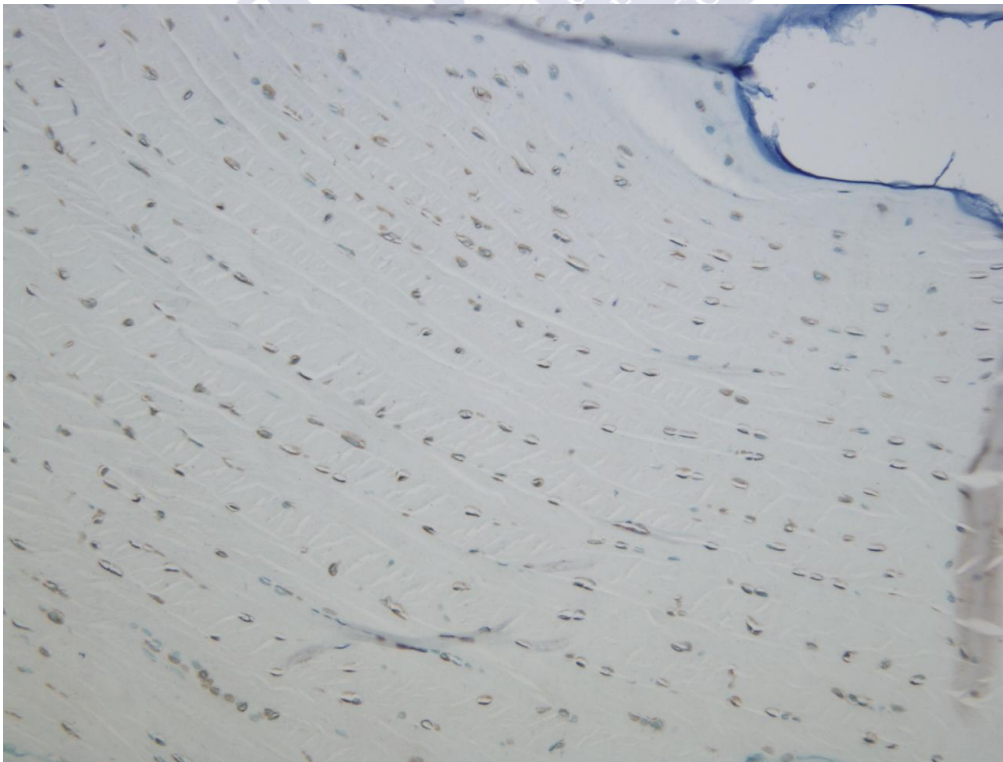


Figura 26. 6 meses/ Intervención C/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado +



Figura 27. 2 meses / Intervención B / Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado –

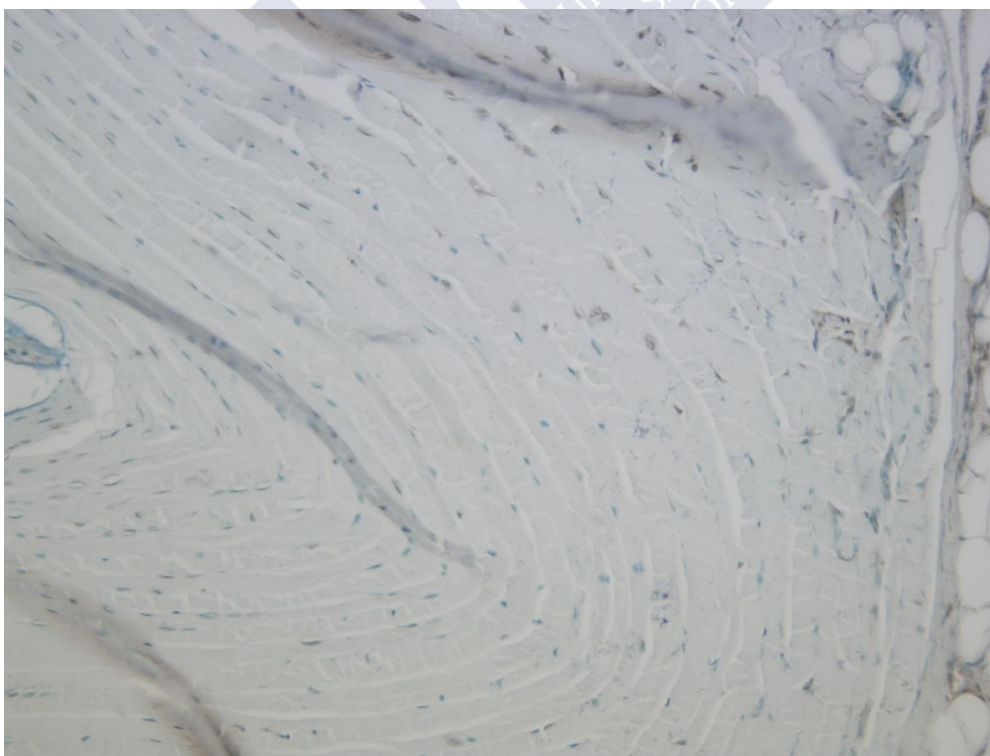


Figura 28. 3 meses / Intervención C/ Inmunohistoquímica de colágeno VI / marcado –

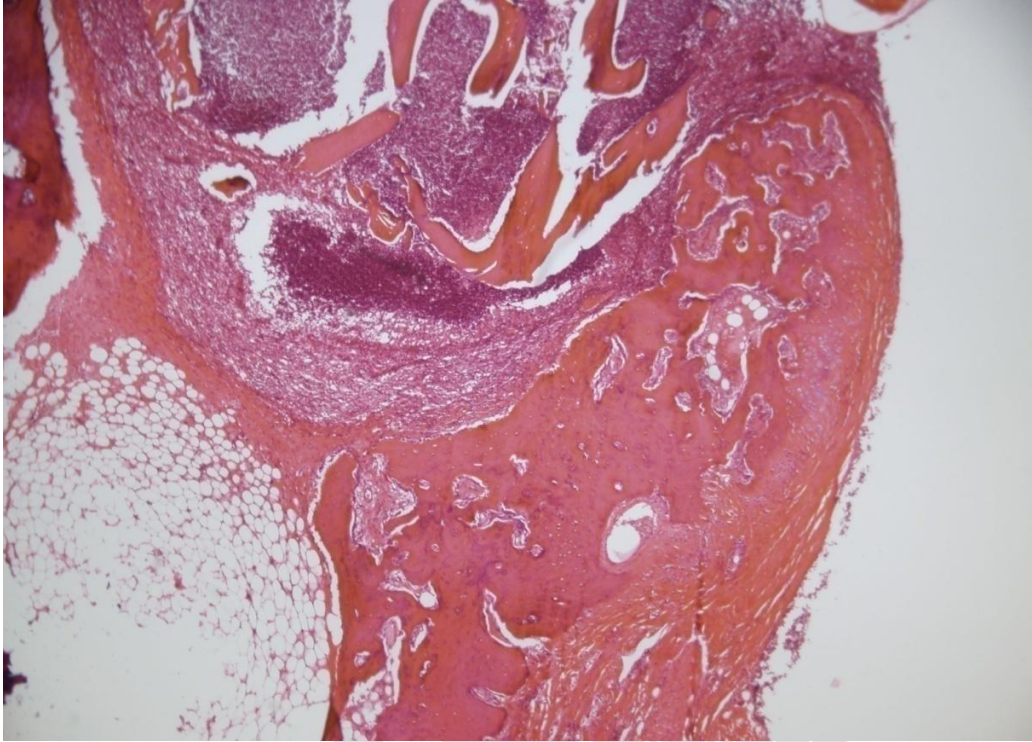


Figura 29. Muestra con infección. Tinción de hematoxilina-eosina. 4 aumentos.

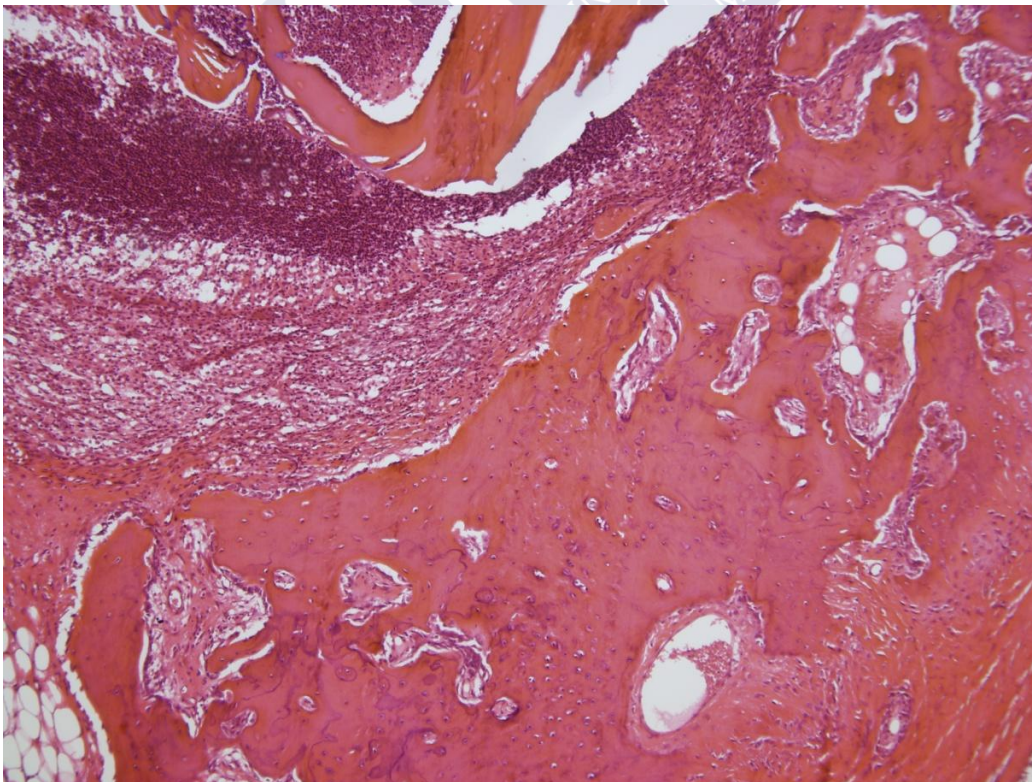


Figura 30. Muestra con infección. Tinción de hematoxilina-eosina. 10 aumentos.



BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Lee CR, Iatridis JC, Poveda L, Alini M. In Vitro organ culture of the bovine intervertebral disc. Effects of vertebral endplate and potential for mechanobiology studies. *Spine* 2006; 31: 515-522
- ² Mooney V. Where is the pain coming from?. *Spine* 1987;12:754-759
- ³ Andersson GB. Epidemiology of low back pain. *Acta Orthop Scan Suppl* 199;69:28-31
- ⁴ Peng B, Hao J, Hou S, Wu W, Jiang D, Fu X, Yang Y. Possible pathogenesis of painful intervertebral disc degeneration. *Spine* 2006; 31:560-566
- ⁵ Katz JN. Lumbar disc disorders and low back pain : socioeconomic factors and consequences. *J Bone Joint Surg* (2006) Vol 88-A – Supl 2: 21-24
- ⁶ Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine* 1997; 24:2781-2795
- ⁷ Schwarzer AC, Aprill CN, Derby R et al: The prevalence and clinical features of internal disruption in patients with chronic low back pain. *Spine* 1995. 20:1878-1883

-
- ⁸ Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Watanabe T, Nakai T, Ando K, Hotta T. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model. *Spine* 2005;30(21):2379-2387
- ⁹ Anderson JAD,. Back pain and occupation. In: Jayson MIV, ed. *The lumbar spine and back pain*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone, 1987:2-36.
- ¹⁰ Zhou H, Hou S, Shang W, Wu W, Cheng Y, Mei F, Peng B. A new in vivo animal model to create intervertebral disc degeneration characterized by MRI, radiography, CT/discogram, biochemistry and histology. *Spine* 2007;32:864-872.
- ¹¹ Kirkaldy-Willis WH, Farfan HF. Instability of the lumbar spine. *Clin Orthop Relat Res* 1982;165:110-23.
- ¹² Ulloa MAD. Degeneración discal, ingeniería tisular...el futuro. *Acta ortop Gallega* 2008;4(2):69-73
- ¹³ Kirkaldy-Willis WH, Bernard T, "Managing Low Back Pain - 4th edition; 1999
- ¹⁴ Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am*. 2006; 88:10-14
- ¹⁵ Grunhagen T, Wilde G, Soukane DM, Shirazi-Adl SA, Urban JPG. Nutrient supply and intervertebral disc metabolism. *J Bone Joint Surg* 2006;88:30-35
- ¹⁶ Akansel G, Haughton VM, Papke RA. Diffusion into intervertebral human discs studied with RM and gadoteridol. *AJNR Am J Neuroradiol* 1997;18:443-5
- ¹⁷ Nguyen-Minh C, Haughton VM, Papke RA Measuring diffusion of solutes into vertebral discs with MR imaging and paramagnetic contrast medium. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998;19:1781-4

-
- ¹⁸ Setton LA, Chen J. Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration. *J Bone Joint surg Am* 2006;88:52-57
- ¹⁹ Lee CR, Sakai D, Nakai T, Toyama K, Mochida J, Alini M, Grad S. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine J*. 2007;16:2174-85
- ²⁰ Johnstone B, Bayliss MT. The large proteoglycans of the human intervertebral disc. *Spine* 1995;20:674-84.
- ²¹ Poiraudau S, Monteiro I, Anract P, Blanchard O, Revel M, Corvol MT. Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells. *Spine* 1999; 24:837-844
- ²² Eyre DR. Biochemistry of the intervertebral disc. *International review of connective tissue research*. 1979;8:2227-91
- ²³ Roberts S, Menage J, Duance V, Wotton S, Ayad S. Collagen types around the cells of the intervertebral disc and cartilage endplate: an immunolocalisation study. *Spine* 1991;16:1030-8
- ²⁴ Kim Y, Sah RLY, Doong JH, Grodzinsky AJ. Fluorimetric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal Biochem* 1988;174:168-176
- ²⁵ Nomura T, Mochida J, Masashiko O, Nishimura K, Sakabe K. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration. *Clin Orthop Rel Res* 2001;389:94-101
- ²⁶ Crean JK, Roberts S, Jaffray DC, Eisenstein SM, Duance VC. Matrix metalloproteinases in the human intervertebral disc: role in disc degeneration and scoliosis. *Spine* 1997;22:2877-2884

-
- ²⁷ Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodelling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:728-35
- ²⁸ Murphy G, Docherty AJP. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:120-5
- ²⁹ Roberts S, Eisenstein SM, Menaje J, Evans EH, Ashton IK. Mechanorreceptors in intervertebral discs. Morphology, distribution and neuropeptides. *Spine* 1995;20:2645-51
- ³⁰ Bibby SRS, Urban JPG. Effect of nutrient deprivation on the viability of the intervertebral disc cells. *Eur Spine J*. 2004;13:695-701
- ³¹ Rajpurohit R, Risbud MV, Ducheyne P, Vresilovic EJ, Shapiro IM. Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2. *Cell Tissue Res* (2002) 308:401-407
- ³² Salminen JJ, Erkintalo MO, Pentti J. Recurrent low back pain and early disc degeneration in the young. *Spine* 1999;24:1316-21.
- ³³ Paaajanen H, Erkintalo M, Parkkola R. Age-dependent correlation of low-back pain and lumbar disc degeneration. *Arch Orthop Trauma Surg* 1997;116:106-107
- ³⁴ Lotz JC. Animal models of intervertebral disc degeneration: lessons learned. *Spine* 2004;29:2742-50.
- ³⁵ Lotz JC, Ulrich JA. Inervation, inflammation, and hypermobility may characterize pathologic disc degeneration: review of animal model data. *JBJS Am* 2006;88-A (2): 76-82.

-
- ³⁶ Mochida J, Nishimura K, Nomura T, Toh E, Chiba M. The importance of preserving disc structure in surgical approaches to lumbar disc herniation. *Spine* 1996;13:1556-1564
- ³⁷ Okuma M, Mochida J, Nishimura K. Resinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study. *J Orthop Res* 2000;18:988-997
- ³⁸ Sakai T, Okuma M, Nishimura K, Nakai T, Ando K, Hotta T. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocolagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 2003;24:3531-3541.
- ³⁹ An HS, Masuda K. relevance of in vitro and in vivo models for intervertebral disc degeneration. *J Bone Joint surg Am* 2006;88:88-94
- ⁴⁰ Bibby SR, Jones DA, Lee RB. The pathophysiology of the intervertebral dis. *J Bone Spine* 2001;68-537-42
- ⁴¹ Battié MC, Videman T, Parent E. Lumbar disc degeneration: Epidemiology and genetic influences. *Spine* 2004;29:2679-90
- ⁴² Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: Involvement of the extracellular matrix. *Spine*2004;29:2691-9
- ⁴³ Lim TH, Ramakrishnan MA, Kurriger GL, Martin JA, Stevens JW, Kim J, Mendoza SA. Rat spinal motion segment in organ culture: a cell viability study. *Spine* 2006;31:1291-1297

-
- ⁴⁴ Roberts S, Menage J, Duance V, Wotton S, Ayad S. Collagen types around the cells of the intervertebral disc and cartilage end plate: an immunolocalization study. *Spine* 1991 Sep;16(9):1030-8
- ⁴⁵ Battié MC, Videman T. Lumbar disc degeneration: epidemiology and genetics. *J bone Joint Surg* (2006) 88:3-9
- ⁴⁶ Annunen S, Paassilta P, Lohiniva J, Perala M, Pihlajamaa T, Karpinen J, Tervonen O, Kroger H, Lahde S, Vanharanta H, Ryhanen L, Goring HHH, Ott J, Prockop DJ, Ala-Kokko L, an analle of COL9A2 associated eith intervertebral disc disease. *Science* 1999; 285:409-412
- ⁴⁷ Paassilta P, Lohiniva J, Goring HHH, Perala M, Raina SS, Karpinen J, Hakala M, Palm T, Kroger H, Kaitila I, Vanharanta H, Ott J, Ala-Kokko L. Identification of a novel common genetic risk factor for lumbar disk disease. *JAMA* 2001;285:1843-1849
- ⁴⁸ Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Kizawa H, Oya T, Mio F, Mori M, Miyamoto Y, Masuda I, Tsunoda T, Kamata M, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Nakamura Y, Ikegawa S. A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nature Genet* 2005;37:607-612
- ⁴⁹ Mio F, Chiba K, Hirose Y, Kawaguchi Y, Mikami Y, Oya T, Mori M, Kamata M, Matsumoto M, Ozaki K, Tanaka T, Takahashi A, Kubo T, Kimura T, Toyama Y, Ikegawa S. A functional polymorphism in COL11A1, wich encodes the alpha-1 chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. *Am J Hum genet* 2007;81:1271-1277

-
- ⁵⁰ Kawaguchi Y, Osada R, Kanamori M, Ishihara H, Ohmori K, Matsui H, Kimura T. Association between an aggrecan gen polymorphism and lumbar disc degeneration. *Spine* 1999;24:2456-2460.
- ⁵¹ Larson III JW, Levicoff EA, Gilbertson LG, Kang JD. Biologic modification of animal models of intervertebral disc degeneration. *J Bone Joint Surg* 2006; 88:83-87
- ⁵² Natarajan RN, Williams JR, Andersson GBJ. Modeling changes in intervertebral disc mechanics with degeneration. *J bone Joint Surg* 2006; 88:36-40
- ⁵³ Pfirrmann CWA, Metzdorf A, Zanetti M, Hodler J, Boss N. Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 2001;26(17): 1873-1878
- ⁵⁴ Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. *Spine* 1998; vol 23, 14: 1531-1539.
- ⁵⁵ Osti OL, Vernon-Roberts B, Moore R. Annulus tears and intervertebral disc degeneration in the lumbar spine: a postmortem study of 135 discs. *J bone Joint Surg* 1992;74B:678-682
- ⁵⁶ Freemont AJ, Watkins A, Maitre CL. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. *J Pathol* 2002;197:286-292
- ⁵⁷ Schwarzer AC, Aprill CN, Derby R. The prevalence and clinical features of internal disc disruption in patients with chronic low back pain. *Spine* 1995;20:1878-3.
- ⁵⁸ Moneta GB, Videman T, Kaivanto K. reported pain during lumbar discography as a function of anular ruptures and disc degeneration: a re-analysis of 833 discograms. *Spine* 1994;19:1968-74

-
- ⁵⁹ Ito M, Incorvaia KM, Yu SF. Predictive signs of discogenic lumbar pain on magnetic resonance imaging with discography correlation. *Spine* 1998;23:1252-60.
- ⁶⁰ Saifuddin A, Braithwaite I, White J. The value of lumbar spine magnetic resonance imaging in the demonstration of anular tears. *Spine* 1998;23:453-7
- ⁶¹ Habetmariam A, Virri J, Ronblad M. The role of mast cells in disc herniation inflammation. *Spine* 1999;24:1516-20.
- ⁶² Ashton-Miller JA, Schultz AV,. Spine instability and segmental hipermobility biomechanics: a call for the definition and standard use of terms. *Semin Spine Surg.* 1991;3:136-48
- ⁶³ Gertzbein SD, Seligman J, Holtby R, Chan KH, Kapasouri A, Tile M, Cruikshank B. Centrode patterns and segmental instability in degenerative disc disease. *Spine* 1985;10:257-61
- ⁶⁴ McNally DS, Shackelford IM, Goodship AE, Mulholland RC. In vivo stress measurement can predict pain on discography. *Spine* 1996;21:2580-7.
- ⁶⁵ Nachemson A, Elfstrom G, Intravital dynamic pressure measurements in lumbar discs. A study of common movements, maneuvers and exercises. *Scand J Rehabil Med Suppl* 1970;1:1-40
- ⁶⁶ Adams MA, Dolan P, Hutton WC. Diurnal changes in spinal mechanics and their clinical significance. *J Bone Joint surg [BR]* 1990;72:266-70
- ⁶⁷ Iwashima T, Mochida J, Sakai D, Yamamoto Y, Miyazaki T, Ando K, Hotta T. Feasibility of using a human nucleus pulposus cell line as a cell source in cell transplantation therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine* 2006. 31: 11: 1177-1186.

-
- ⁶⁸ Yoon ST. Molecular therapy of the intervertebral disc. *Spine J* 2005;280S-286S.
- ⁶⁹ Haschtmann D, Stoyanov JV, Ettinger L, , Nolte L-P, Ferguson SJ. *Spine* 2006;31, 25:2918-2925
- ⁷⁰ Coventry MB, Ghormley RK, Kernohan JW. The intervertebral disc: its microscopic anatomy and pathology: part I. Anatomy, development and physiology. *J Bone Joint Surg Am* 1945;27:105-112
- ⁷¹ Holm S, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: acute effects of cigarette smoking. An experimental animal study. *Ups J Med Sci* 1998;93:91-9
- ⁷² Hirano N, Tsuji H, Ohshima H, Kitano S, Itoh T, Sano A. analysis of rabbit intervertebral disc physiology based on water methabolism. II. Changes in normal intervertebral discs under axial vibratory load. *Spine* 1988;13:1297-302
- ⁷³ Bibby Sr, Fairbank JC, Urban MR, Urban JP. Cell viability in scoliotic discs in relation to disc deformity and nutrient levels. *Spine* 2002;27:2220-8
- ⁷⁴ Urban MR, Fairbank JCT, Etherington PJ, Loh L, Winlove CP, Urban JPG. Electrochemical measurement of transport into scoliotic intervertebral discs in vivo using nitrous oxide as a tracer. *Spine* 2001;26:984-90
- ⁷⁵ Nachemson A, Lewin T, Maroudas A, Freeman MA. In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus of human lumbar intervertebral discs. *Acta Orthop Scand* 1970;41:589-607
- ⁷⁶ Boss N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs. *Spine* 2002;27:2631-44

-
- ⁷⁷ Urban JPG. The effect of physical factors on disk cell metabolism. In: Buckwalter JA, Goldberg Vm, Woo SLY, eds. Musculoskeletal soft-tissue aging: Impact on mobility. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeon, 1993:391-412
- ⁷⁸ Urban JPG, Holm S, Maroudas A, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disk. *Clin Orthop* 1977;129:101-14
- ⁷⁹ Boss N, Steffen T. Network research on disc degeneration and future treatment. *AoSpine Research Network. Dialogue* 3/05:34-37
- ⁸⁰ Iwahashi M, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, Wakabayashi K, Uematsu Y, Mechanism of intervertebral disc degeneration caused by nicotine in rabbits o explicate intervertebral disc disorders caused by smoking. *Spine* 2002;27:1396-13401
- ⁸¹ Battié MC, Videman T, Gibbons LE, Fisher LD, Manninen H, Gill K. Determinants of lumbar disc degeneration. A study relating lifetime exposures and magnetic resonance imaging findings in identical twins. *Spine* 1995;20:2601-12
- ⁸² Fleis J, Wiley E. *Statistical methods for rates and proportions*. New York 1981
- ⁸³ Lai A, chow DH, Siu Ws, Holmes AD, Tang FH. Reliability of radiographic intervertebral disc height measurement for in vivo rat-tail model. *Med eng Phys* 2007;29(7):814-819.
- ⁸⁴ O'Connell GD, Vresilovic EJ, Elliott DM. Comparison of animals used in disc research to human lumbar disc geometry. *Spine*. 2007 Feb 1;32(3):328-33.
- ⁸⁵ Maldonado BA, Oegema TR. Inicial characterization of the methabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. *J Orthop Res* 1992;10:677-90

-
- ⁸⁶ Ichimura K, Tsuji H, Matsui H, Mariyama N. Cell culture of the intervertebral disc of rats: Factors influencing culture, proteoglycan, collagen, and deoxyribonucleic acid synthesis. *J Spinal Discord* 1991;4:428-36.
- ⁸⁷ Pardo Seco JP, Couceiro Follente J, Díez Ulloa MA. Modelo experimental para el estudio del proceso degenerativo del disco intervertebral y su eventual modulación. Diploma de estudios avanzados. Etapa de investigación. Departamento de Cirugía. Universidad de Santiago de Compostela 2006.
- ⁸⁸ Okuda S, Myoui A, Ariga K, Nakase T, Yonenobu K, Yoshikawa H. Mechanisms of age-related decline in insuline-like growth factor-I dependent proteoglycan synthesis in rat intervertebral disc cells. *Spine* 2001;26:2421-6
- ⁸⁹ Hoogendoorn RJ, Wuisman PI, Smit TH, Everts VE, Helder MN. Experimental intervertebral disc degeneration induced by chondroitinase ABC in the goat. *Spine* 2007;32(17):1816-1825
- ⁹⁰ Risbud MV, Izzo MW, Adams CS. An organ culture system for the study of the nucleus pulposus: Description of the system and evaluation of the cells. *Spine* 2003;28:2652-8;discussion 2658-9
- ⁹¹ Takegami KMK, An H, Uchida A. A novel culture system for the intervertebral disc: An organ with endplates. *Trasn Orthop Res* 2001;47
- ⁹² Chiba K, Andersson GB, Masuda K. A new culture system to study the metabolism of the intervertebral disc in vitro. *Spine* 1998;23:1821-7;discussion 1828
- ⁹³ Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ,. Studies of human intervertebral disc cell function in a constrained in vitro tissue culture system. *Spine* 2004;29:1187-95

⁹⁴ Yoon ST. Point of view. Spine 2006;31:1298

