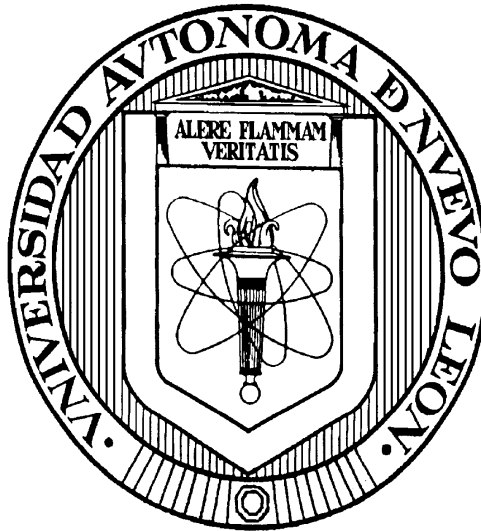


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**“EFECTO DE LA INFILTRACIÓN DEL PRP, CONDROCITOS/PRP O
CMMs/PRP EN CONEJOS CON LESION DE DISCO INTERVERTEBRAL”**

Por

DR. PEDRO MARTÍN REYES FERNÁNDEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN MEDICINA**

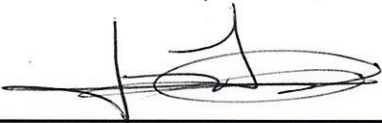
FEBRERO, 2026

**“EFECTO DE LA INFILTRACIÓN DEL PRP, CONDROCITOS/PRP O
CMMs/PRP EN CONEJOS CON LESION DE DISCO INTERVERTEBRAL”**

Aprobación de la tesis:



Dr. med. Víctor Manuel Peña Martínez
Director de Tesis



Dr. C. Jorge Lara Arias
Co-Director de Tesis



Dr. med. José Félix Vilchez Cavazos
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Carlos Alberto Acosta
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. C. Rodrigo Elizondo Omaña
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento en primer lugar al Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González y a la Facultad de Medicina de la UANL representado por el Dr. med. Óscar Vidal Gutiérrez, por la valiosa participación en toda mi formación académica, docente, asistencial e investigación que hoy culmino con mis estudios de Doctorado en Medicina, sueño de años de estudios y trabajo en equipo, que han colaborado en la realización de esta investigación que hoy nace como una nueva línea de investigación para la Ortopedia y Traumatología en especial en la patología de columna vertebral, esto representa años de trabajo constante, culminando este arduo esfuerzo y dedicación, con un gran sentir sublime del ser Humano avanzando en su evolución a una mejor vida.

A mi familia, a la Dra. Hilda Alicia Llanes Garza, mi esposa, mi socia, compañera y amiga, siempre honraré tu compañía, tanto en nuestras cirugías como en nuestros sueños, como este que hoy culmina; a mis tres hijas, Dra. Alicia Paola, Hilda Daniela y Ana Carolina Reyes Llanes, por escucharme y disfrutar de este sueño hecho realidad. Agradezco a ellas su participación y amor incondicional en todo este proceso, a mis hermanos Dra. Martha Ofelia, Juana Ma. Del Rocío y Lic. Carlos Augusto Reyes Fernández, a mis cuñados Dr. med. Bernardo Alfonso Fernández Rodarte y Roberto Vargas del Toro por su amor incondicional, paciencia y estímulo durante todo este proceso. Sin su apoyo emocional y motivación constante, no hubiera sido posible alcanzar este objetivo, y a mis padres, Pedro Reyes Flores y Martha Fernández Valdez, cuya existencia física cambió a una eterna presencia espiritual y me enseñaron lo valioso que es la vida y a disfrutarla como hasta hoy. Ellos me acompañan en mis reflexiones constantes y en cada actividad que realizo. Gracias, gracias, papá y mamá, por permitirme ser quien hoy soy, gracias a sus sabias enseñanzas y consejos. Los amo.

A mi director de Tesis, Dr. med. Víctor Manuel Peña Martínez, jefe del Departamento de Ortopedia y Traumatología, quien apoyó en cada momento a esta investigación; al Dr. C. Jorge Lara Arias, Co-director, por su apoyo constante y total en este trabajo de investigación, compartiendo también este sueño hecho hoy realidad, y MVZ. M. en C.

Gilberto Arévalo Martínez por acompañarme con su apoyo con los animales que permitieron la realización de esta investigación.

Agradezco también a los demás miembros del Comité, Dr. med. José Félix Vilches Cavazos, Dr. med. Carlos Acosta Olivo, Dr. C. Rodrigo Elizondo Omaña, por su tiempo, su interés en mi investigación y sus significativos comentarios que han enriquecido este trabajo; gracias por su amistad y acompañamiento.

Agradezco al Dr. med Santos Guzmán López rector de la UANL y al Dr. C Rodrigo Elizondo Omaña del Departamento de Anatomía macroscópica que facilitaron las instalaciones de laboratorio de Anatomía macroscópica para efectuar la intervención con los animales de laboratorio y al Dr. M en C. Viktor Romero Díaz, y al Dr. C. Jaime García Juárez que con su valiosa experiencia en cortes histológicos y pruebas moleculares conseguimos los resultados del presente estudio, con su gran apoyo, fue fundamental para nuestra intervención en el progreso de este proyecto de investigación.

A todos ustedes, gracias por haber sido parte de este viaje. Estoy profundamente agradecido por cada contribución recibida, pero lo más importante, agradezco a Dios por su eterno acompañamiento y giro las más grandes bendiciones a todos ustedes, por permitirme profundizar en el conocimiento científico, eternamente agradecido.

Dr. Pedro Martín Reyes Fernández

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESÚMEN	8
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN	9
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS	53
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS	54
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS	55
Capítulo VI	
6. RESULTADOS	74
Capítulo VII	
7. DISCUSIÓN	100
Capítulo VIII	
8. CONCLUSIÓN	105
Capítulo IX	
9. BIBLIOGRAFÍA	107

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Escala de clasificación histológica.	76
2. Calificación obtenida entre los grupos tres tratamientos empleados.....	96

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Grupos de estudios	54
2. Comparación histológica de discos intervertebrales en el Grupo A tratados con PRP.....	77
3. Grupo A que corresponde a PRP, plasma rico en plaquetas	78
4. Grafica 1 Grupo A.....	82
5. Evaluación histológica de discos intervertebrales del Grupo B	83
6. Grupo B que corresponde a PRP+Condrocitos, plasma rico en plaquetas con Condrocitos.....	84
7. Grafica 2 Grupo B (PRP/Condrocitos)	88
8. Análisis histológico de disco intervertebrales del Grupo C, tratados con PRP y CMMs.....	89
9. Grupo C que corresponde a PRP+CMMs, plasma rico en plaquetas con células madres mesenquimales	90
10. Grafica 3 Grupo C (PRP/CMMs).....	94
11. Relative Gene Expression ($2^{-\Delta\Delta C+}$)	98

Capítulo I

Resumen

La degeneración del disco intervertebral es una de las principales causas del dolor lumbar crónico, y los tratamientos actuales se centran en el control de los síntomas en lugar de en la reparación tisular. Las terapias celulares, como el plasma rico en plaquetas (PRP), los condrocitos autólogos y las células madre mesenquimales (MSC), han surgido como estrategias prometedoras para la regeneración discal. En este estudio, quince conejos blancos de Nueva Zelanda se sometieron a una punción con aguja guiada por fluoroscopia de los discos L4-L5 y fueron asignados para recibir PRP solo, PRP-condrocitos o PRP-MSC ocho semanas después, mientras que el disco L3-L4 sirvió como control interno sano. A las 16 semanas después de la lesión, la puntuación histológica reveló mejoras significativas en la integridad anular, la celularidad y la composición de la matriz en todos los grupos tratados en comparación con las lesiones no tratadas, observándose las mayores ganancias en el grupo de PRP-condrocitos, efectos intermedios con PRP-MSC y cambios más modestos con PRP solo. El análisis complementario de RT-qPCR de la expresión de COL2A1 y COL10A1 confirmó una tendencia hacia un fenotipo más regenerativo, caracterizado por un aumento de los niveles de COL2A1 y una reducción de los de COL10A1, que fue más pronunciado en el grupo tratado con PRP y condrocitos. A pesar de estos avances, ninguna de las intervenciones restauró completamente la arquitectura sana del disco, lo que subraya la complejidad de la reparación discal. Estos hallazgos respaldan el potencial de combinar PRP con condrocitos o células madre mesenquimales (CMM) para la regeneración del disco intervertebral y demuestran la necesidad de optimizar aún más las dosis celulares, las formulaciones de PRP y los protocolos de administración antes de su aplicación clínica.

CAPÍTULO II

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes Generales

2.1.1 Función del disco intervertebral.

El disco intervertebral es una estructura fibrocartilaginosa, cuya función principal es actuar como un amortiguador, transmitiendo cargas de compresión entre los cuerpos vertebrales y como una compleja unión, permitiendo los diferentes movimientos de la columna vertebral, (flexión, extensión y torsión). El disco intervertebral humano, se considera que sufre cambios degenerativos más dramáticos que cualquier otro tejido musculoesquelético en el cuerpo y se somete a estos cambios en edad más temprana. (1,2)

El disco intervertebral es la unidad funcional de la columna vertebral, conectando los cuerpos vertebrales entre sí, en el humano hay 25 discos intervertebrales, interpuestos desde el axis hasta el sacro, constituyen aproximadamente el 25% de la altura total de la columna vertebral y varían en espesor desde el disco más fino en la región torácica, al más grueso en la región lumbar. El disco intervertebral, es un componente vital del sistema de unión presente en cada nivel vertebral, que permite el rango de movimiento en cada segmento, cada disco intervertebral trabaja en conjunto con las articulaciones zigoapofisiaria dorsal para formar un complejo de tres articulaciones, la función de los componentes individuales de este complejo está íntimamente relacionados, al igual que sus efectos de uno sobre el otro durante el proceso degenerativo. (1,3)

Su forma anatómica y la microestructura se correlacionan con su papel funcional. El disco intervertebral juega un papel importante en el equilibrio de la

flexibilidad de la columna vertebral estabilizándola. El disco también es donde muchos procesos patológicos de la columna manifiestan síntomas clínicos que reflejan la alteración de su estructura y función afectando sus propiedades biomecánicas, la características de carga del disco se ven afectados por la postura y el envejecimiento, a su vez los movimientos de la columna vertebral está íntimamente relacionada con las propiedades mecánicas del disco intervertebral y la estabilidad de la columna vertebral depende en gran medida en la integridad del mismo.(4)

Procesos patológicos que ocurren en el disco intervertebral más comunes encontrados por los cirujanos de columna, son el dolor lumbar mecánico, enfermedad degenerativa del disco, hernias de disco, estenosis espinal, espondilolistesis degenerativa y otras deformidades espinales, que representan diversas manifestaciones de la estructura y la función del disco alterado. (2,4)

2.1.2 Desarrollo del disco intervertebral

La notocorda es fundamental para el desarrollo del disco intervertebral, localizada en la línea media en forma de varilla originada del mesodermo, encontrada en embriones cordados durante la gastrulación y representa al esqueleto axial primitivo, reconocida en todos los embriones vertebrados. Su desarrollo ha sido bien estudiado y descrito desde el siglo XIX, se compone de células derivadas de tejidos organizados en diferentes etapas de desarrollo. La contribución de la organización de las diferentes regiones de la notocorda a lo largo del eje anterior-posterior es compleja, en principio la notocorda anterior es formada por la convergencia directa de las células dispersas anteriores, el tronco de la notocorda formada por la convergencia de células derivadas del nodo, y la cola de la notocorda es formada por la migración posterior de las células progenitores derivadas del nodo. La notocorda es importante no solo como un centro de señalización, sino también como una estructura que da lugar al futuro núcleo pulposo. En las etapas tempranas de gestación a los 30 días en

el humano, 12 días en ratones, la notocorda está localizada adyacente a los somitas paraxiales y pueden inducir la diferenciación de la porción ventral del somita derivando en el esclerotomo, cuyas células migran y se condensa alrededor de la notocorda formando la envoltura perinotocordal. Las células forman el mesénquima pericordal no segmentado con un patrón metamérico de regiones condensadas y sin condensar, las región de condensación del mesénquima dará lugar a el anillo fibroso del disco intervertebral, mientras que la región sin condensación del mesénquima formara el futuro cuerpo vertebral, desarrollando primero como una continua columna cartilaginosa alrededor de la notocorda y como avanza el desarrollo, la notocorda se piensa que es comprimida y exprimida lejos de la región del esbozo cartilaginoso del cuerpo vertebral y se expande en la región del esbozo del disco intervertebral , dando lugar al futuro núcleo pulposo, que en alguna instancia puede ser detectados restos de la notocorda dentro del cuerpo vertebral, y con esto se piensa un posible origen de los cordomas, con esto se soportar la idea de que las células de la notocorda pueden tener propiedades progenitoras, aunque esta noción permanece controversial, el análisis de seguimiento celular de la notocorda en el ratón sugieren que eso puede ser el caso dándose con la diferenciación subsecuente durante la madurar de las células del núcleo pulposo. Hasta la fecha, no hay datos de análisis de seguimiento celular disponibles para confirmar el origen de las células del anillo fibroso, pero se piensa que se origina desde el somita. Poco es el conocimiento respecto a él origen y la formación de las células en las placas terminales cartilagnosas. Fue primero postulado que el núcleo pulposo no es derivado desde el lado del cuerpo vertebral, pero sí de células indiferenciadas, cuyos acúmulos de desarrollo temprano dan origina a una estructura organizadas bajo influencias mecánicas.

Esta hipótesis fue más tarde refinada sugiriendo la inducción desde estímulos mecánicos que debido a la acción de fuerzas comprensivas, torsionales, y estrés de cizallamiento que ocurren en el disco intervertebral, esto es similar a el estrés mecánico que induce el espesamiento y delaminación del tejido

conectivo. Así, el cartílago hialino de las placas terminales representa la interface entre el cuerpo vertebral y el disco intervertebral, y la epífisis anular del cuerpo vertebral desarrollada en la parte marginal de la placa terminal cartilaginosa. (4,5)

2.1.3 Disco intervertebral normal

Está compuesta de tres estructuras: una blanda gelatina central el Núcleo Pulposo, rodeándola por laminas en la periferia llamado Anillo Fibroso y estas dos encerrada entre dos laminas cartilaginosas las Placas Terminales en cualquier región de la columna vertebral y básicamente la función de un disco intervertebral se relaciona específicamente con la matriz extracelular formada por fibras de colágeno inmersas en un gel de agua y proteoglicanos reuniendo e interactuando las tres estructuras entre sí y con esto se mantiene la homeostasia del disco intervertebral.(4)

El anillo fibroso es un tejido laminar altamente estructurado, formado por capas anguladas concéntricas que cruzan una a otra oblicuamente y se disponen en paralelo entre ellas con una inclinación de unos 60 grados respecto al eje vertical, alternando su oblicuidad hacia la izquierda y hacia la derecha y subdividiéndose en anillo fibroso externo e interno. El anillo fibroso externo está hecho por una serie de 15 a 25 lámelas o laminas concéntricas, compuesta de células fibroblásticas que producen colágena tipo I, que corresponde aproximadamente al 90% del colágeno en el disco intervertebral, junto con pequeñas cantidades de colágeno tipo III, V y VI. El colágeno tipo III y V pueden formar fibrillas heterotópicas con el colágeno tipo I, proporcionando diversidad a las propiedades de las fibrillas, mientras que moléculas de colágeno tipo VI se ensamblan con los filamentos, esta red de fibrillas de colágena, adyacente a la lámina, trabajan cooperativamente una con otra durante la carga dinámica.

Fibras de colágena altamente orientadas en laminas paralelas con cada lámina, organizadas en una estructura ligamentosa que se insertan en el cuerpo vertebral adyacente, forma un haz de microfibrillas que son distribuidas en la matriz interterritorial y colocadas con fibras elásticas. Estas fibras elásticas, que representan solo el 2 % del peso seco del anillo fibroso, es otra red organizada de la matriz extracelular que se alinea paralelo con las lámina. Las células del anillo fibroso interno, son más como condrocitos que producen principalmente colágeno tipo II y proteoglicanos como agreganos, estos cambios dan lugar a una estructura menos fibrosa y menos organizada comparada con el anillo fibroso externo. El anillo fibroso externo consiste de una alta densidad de elastina localizado con microfibrillas, en comparación con el anillo fibroso interno, la elastina está concentrada entre la lámina y se piensa que funciona en proteger el disco de la deslaminación al igual que apoya con la recuperación de la estructura de la lámina después de la deformación bajo cargas radiales. Es de interés, una red de puentes de fibras translamelar identificados en el anillo fibroso y localizadas en el interespacio del haz de una lámina individual, conectado con las fibras de la lámina adyacente. La alineación de la red de puentes translamelar sirven para mejorar la resistencia hacia la compresión radial, la elevación, las fuerzas de torsión, y previene la disyunción de la lámina bajo fuerzas de torsión. En el anillo fibroso interno hay una transición de estructura, enriquecida por el colágeno tipo II, con gran contenido de proteoglicano como agregano, biglican, y lumican, que resulta en una estructura fibrosa menos organizada, la razón de esta transición no es clara, quizá hay necesidad de un cambio progresivo del anillo fibroso para estabilizar una función relacionada entre el anillo fibroso interno y el núcleo pulpos. Postnatalmente, el límite entre el anillo fibroso externo y el interno se distingue poco, comparándola con la interface entre el anillo fibroso interno y el núcleo pulpos que se muestra en el envejecimiento. (3,6)

En la periferia del anillo fibroso externo se encuentran haz fibrilares conocidas como fibras de Sharpey que se extienden en dirección superior e inferior para

anclar el disco intervertebral a la vértebra adyacente. El colágeno tipo II se ha demostrado que es capaz de mantener el 50 al 100 % del mayor contenido de agua, que el colágeno tipo I. Las láminas externas se componen de hasta aproximadamente 70 % colágeno tipo I y solo el 20 % de colágeno tipo II, mientras que en el anillo fibroso interno el porcentaje de colágeno tipo II aumenta a 70 %, y también hay un aumento progresivo de la concentración de proteoglicanos del 10 a 30 % cuando se mueve desde el anillo externo al anillo interno. Otros tipos de colágeno también están presentes en el anillo fibroso, como el colágeno tipo VI que constituyen hasta un 10 % del colágeno. (1,2)

Núcleo Pulposo sus células son inicialmente notocordales derivadas del endodermo, a diferencia de las demás estructuras del disco intervertebral que derivan del mesodermo, dichas células disminuyen después del nacimiento y que eventualmente se convierte en indetectable alrededor de los 4 a 10 años de edad. Se sustituyendo gradualmente durante el crecimiento por células redondeadas que asemejan a los condrocitos del cartílago articular estas células similares a los condrocitos sintetizan principalmente proteoglicanos y colágeno tipo II en respuesta a cambios en la presión hidrostática. (1,2)

El núcleo pulposo se engrandece con el crecimiento y al igual que en el cartílago hay t pequeñas cantidades de colágena tipo IX y XI. El colágeno tipo XI asociado con colágeno tipo II forma fibrillas de colágeno heterotópicas, mientras que el colágeno de tipo IX, recubre la superficie de estas fibrillas como en el cartílago. El proteoglicano condroitina sulfato, se encuentra en la superficie de las células o en la matriz extracelular desempeñando un papel importante en el desarrollo y función biológica del disco intervertebral similares al cartílago. La mayoría del proteoglicano condroitina sulfato en la matriz extracelular son agrecanos, tiene un gran núcleo proteico de 2000 aminoácidos en distintas regiones estructurales y funcionales. Además, hay 3 dominios globulares, los primero dos G1 y G2 son localizadas hacia la región N-terminal separadas por un corto dominio interglobular, el tercer dominio G3, es

localizada cerca de la región N-terminal del núcleo proteico. Entre los dominios G2 y G3 se fijan alrededor de 100 cadenas laterales de glucosaminoglicanos condroitina sulfato distribuidos a lo largo del dominio de condroitin sulfato1 y condroitin sulfato2 y más cerca del dominio G2 son fijados de lado de aproximadamente 30 cadena lateral de glucosaminoglicano keratan sulfatos que son cortos de 22 a 30 unidades de disacáridos y altamente variables. El dominio G1 media la interacción del agregano con el ácido hialurónico y se establece por un pequeño enlace proteico que tiene propiedades similares a las de dominio G1. Hasta las 100 moléculas de agregano se puede encontrar en una sola de ácido hialurónico, resultando en un enorme y alta carga de agregano con ácido hialurónico y otras moléculas de la matriz. La gran carga de las cadenas de glucosaminoglicano atrae y retiene agua en el núcleo pulposo y produce una presión de hinchamiento permitiendo resistir a la compresión desde la carga axial, en humano. El dominio del condroitin sulfato1 posee un número variable de repeticiones de tándem y resulta en una variación de la longitud del núcleo proteico de agregano en diferentes individuos, el dominio globular G3 contiene lectina tipo C, pero las demás uniones de los distintos carbohidratos no habían sido identificadas. Recientemente, ha sido demostrado que los agreganos vía este dominio puede interactuar con la matriz proteica con repeticiones del factor de crecimiento endotelial, tales como fibulina y tenasina. La fibulina es de una familia de glucoproteína secretadas, que interactúa con elastina y muchas otras matrices proteicas, como tal, la organización y el ensamble de la matriz extracelular puede ser establecidas por la cadena de agreganos y a otras matrices proteicas en el tejido. La fibulina es de una familia de glucoproteína secretadas, que interactúa con elastina y muchas otras matrices proteicas, como tal, la organización y el ensamble de la matriz extracelular puede ser establecidas por la cadena de agreganos y a otras matrices proteicas en el tejido. Pequeñas proteínas/proteoglicanos con repeticiones de leucinas, están también presentes en el núcleo pulposo, incluye los pequeños proteoglicanos del cartílago tales como fibromodulina, decorina, y lumican, estas moléculas tienen una porción central consistente de 10 o 11

repeticiones de aproximadamente 25 aminoácidos con residuos de leucina conservando su lugar, además contienen 1 o 2 cadenas adjuntas de keratan sulfatos a la unidad de repetición. Los polisacáridos pueden directamente interactuar con el colágeno y servir de cross-bridge y cross-link en las fibras de colágeno, y regular el ensamble de las fibras de colágena con decorina, dentro del núcleo proteico y también enlazar a filamentos de colágeno y de nuevo actuar de puente molecular en la matriz extracelular. Las pequeñas proteínas/proteoglicanos con repeticiones de leucinas pueden también enlazar factores de crecimiento, en particular factor de crecimiento transformador TGF- β que regula la homeostasia del tejido y otras tales como asporina y condroadherina no están contenidas en el sitio de la cadena de glucosaminoglicanos. La asporina también enlaza al colágeno dentro del dominio de repetición rico en leucina y estas moléculas contienen una extensión N-terminal con un variable número de residuos de ácido aspártico siendo una región polimórfica de los genes en la población humana, que son formados de 8 a 19 residuos de ácido aspártico continuo. La asporina también enlaza TGF- β y la variedad de D14, fue demostrado en el enlace TGF- β con una alta afinidad con el alelo común con 13 repeticiones. Una hipótesis es que la asporina puede regular la disponibilidad de TGF- β y así modular la síntesis de las moléculas de la matriz. Condroadherina no tiene una extensión N-terminal, sin embargo, como otros SLRPs interactúan con el colágeno, pero también interactúan con la integrina $\alpha 2\beta 1$, en un receptor celular de superficie que percibe su entorno y su integración se piensa que mejora la producción de la matriz. (3)

El núcleo pulposo está compuesto de 80 % de agua, con proteoglicanos que contribuye al 50 % de su peso seco y un tipo de proteoglicano conocido como agreganos que contienen proteínas con repeticiones ricas en leucina, son el tipo predominante de proteoglicanos en el núcleo pulposo. El alto contenido de proteoglicanos permite la capacidad al núcleo pulposo para mantener un aumento del estado de hidratación y crear sus propiedades viscoelásticas que son esenciales para sus capacidades de carga en la columna vertebral. (1)

El núcleo pulposo contiene en su interior fibras de colágeno tipo II, organizadas al azar y fibras de elastina dispuestas radialmente dentro de una estructura gelatinosa altamente hidratada constituida por proteoglicanos principalmente agregados o agregados de proteoglicanos de condroitin sulfato y keratan sulfato intercalados con una densidad celular de 5,000/mm³ encontrando células como condrocitos derivadas de las plataformas cartilaginosas de los cuerpos vertebrales. (6)

Placas terminales cartilaginosas. En el ser humano, la placa terminal sirve como placa de crecimiento para los cuerpos vertebrales, que tienen la estructura típica de una placa de crecimiento epifisario. En la infancia esta placa de crecimiento es demasiado gruesa y ocupa una fracción sustancial del disco intervertebral. (2)

Con el crecimiento progresivo, las placas terminales se hacen más delgadas midiendo de 0.5 a 1.5 mm, siendo delgada en el centro donde se relaciona con el núcleo pulposo y en la periferia donde están unidas al cuerpo vertebral adyacente por una delgada capa de calcio, este encontrándose ausente en las zonas donde existen numerosas perforaciones que penetran la placa terminal, permitiendo el paso a canales vasculares que atraviesan desde el cuerpo vertebral al disco intervertebral y que se vuelven progresivamente raros y eventualmente inexistente, sirviendo como barrera rígida pero porosa entre el cuerpo y el disco intervertebral permitiendo la difusión de nutrientes y el movimiento de fluidos dentro y fuera del disco intervertebral.(1)

Están compuesta de dos capas una capa ósea interna y una capa cartilaginosa externa, esta última es una delgada capa horizontal de estructura cartilaginosa articular, en total estas capas horizontales de cartílago hialino habitualmente son de menos de 1 mm de grosor.6 Limitando el cuerpo vertebral con el disco intervertebral, tienen escasos nervios y suministro de vasos sanguíneos y

actúan como fuente y regulando la difusión de nutrientes y el transporte de oxígeno desde el cuerpo vertebral.(4)

La composición bioquímica del cartílago de las placas terminales, es similar al del cartílago de las articulaciones, los componentes de la matriz extracelular del núcleo pulposo son también aplicable a las placas terminales y debe ser enfatizado que, aunque muchos de los componentes se encuentran en el núcleo pulposo estas son proteínas cartilaginosas de la matriz extracelular con relativa cantidad, muy diferente en forma y función como en el cartílago hialino.

Estas delgadas capas de cartílago a nivel del núcleo pulposo, son compuestas de red de fibras de colágeno orientadas al azar en un gel de proteoglicanos hidratados y en el cruce con el anillo fibroso interno la red de colágeno es más organizada y orientada más horizontal y paralela al cuerpo vertebral, que corren continuamente en el anillo fibroso interno. En las placas terminales cartilaginosas, la mayoría de los proteoglicanos son también agreganos, pero su relativo nivel es bajo comparado con los del núcleo pulposo. En el cartílago la longitud de las cadenas laterales de condroitin sulfato parece ser más larga y grandes en proporción, relativamente similar a las cadena lateral de keratan sulfato, que son una delgada capa horizontal posicionada en la interface entre el disco y el cuerpo vertebral adyacente, que a nivel del núcleo pulposo actúa como una barrera permeable y selectiva en que los solutos pequeños y sin carga pueden difundir atravesando fácilmente, mientras que el movimiento de aniones o grandes solutos está restringida. Sin embargo, estudios de permeabilidad sugieren que la difusión principalmente ocurre entre el espacio subcondral y la zona central del disco. El colágeno tipo X es normalmente encontrado en el cartílago hipertrófico sometido a mineralización su función en la matriz extracelular no es clara, pero se piensa que tiene un papel en la mineralización del cartílago. (3)

Las placas terminales cartilaginosas están constituidas por un 55% de agua, un 8% de proteoglicano y un 25% de colágeno, que junto con el núcleo pulposo y la capa interna del anillo fibroso se relaciona con las placas terminales cartilaginosas a través de las fibras de colágeno y por el lado opuesto están en contacto directo con el hueso cortical perforando al cuerpo vertebral, con el que también se vincula la porción externa del anillo fibroso. (6)

Las placas terminales se componen de condrocitos redondos y funcionan transmitiendo fuerzas más compresivas a través del cuerpo vertebral superior a la placa terminal para distribuirse a la placa terminal inferior, núcleo pulposo y el cuerpo vertebral. Las placas terminales y el hueso trabecular adyacente pueden experimentar una deformidad temporal cuando se aplica una carga. (2)

2.1.4 Disco intervertebral: envejecimiento y degeneración

El disco intervertebral del humano se somete muy tempranamente al envejecimiento y a la degeneración, resultando en cambios histomorfológicos y funcionales. La permeabilidad de las placas terminales y el suministro vascular disminuye a lo largo del crecimiento y envejecimiento dando origen a alteraciones del transporte de metabolitos. Los proteoglicanos comienzan a fragmentarse durante la infancia y en general el contenido de proteoglicanos disminuyen con la edad, especialmente en el núcleo pulposo. Hay un correspondiente incremento en el contenido de colágeno; las fibras de colágeno tipo I, son remplazadas por fibras de colágeno tipo II en el anillo fibroso interno y el núcleo pulposo. En adicción, la renovación existente de la matriz reduce en el disco de mayor edad, esto permite a las fibras de colágeno ser cada vez más reticulares y conduciendo a la retención de fibras dañadas con esto se reduce la fuerza del tejido. La síntesis de los componentes de la matriz extracelular disminuye continuamente durante toda la vida, y esto es en parte atribuible a la disminución de la densidad celular, aunque la tasa de síntesis por célula también disminuya. En el infante el núcleo pulposo contiene aproximadamente

90 % de agua y aparece translucido. El disco intervertebral se deshidrata lentamente con el envejecimiento y el contenido de agua en el núcleo pulposo declina alrededor del 80 % en adultos jóvenes. El núcleo pulposo también acumula pigmentos amarillos y se vuelve menos distinguible alrededor del núcleo. A medida que el contenido de agua del disco intervertebral disminuye, el núcleo se vuelve más pequeño y descomprimido y a menudo con varias condensaciones con trozos fibrosos. La deshidratación del núcleo pulposo conduce a alteraciones de las propiedades biomecánicas del disco intervertebral, forzando al anillo fibroso a actuar como un sólido tejido fibroso que resiste la compresión directamente. El contenido de proteoglicano del anillo fibroso también disminuye con el envejecimiento y el anillo fibroso se vuelve más rígido y más débil, resistiendo la compresión de manera casual. (2,7)

2.1.5 Degeneración.

La degeneración del disco intervertebral imita los cambios relacionados con la edad, pero el proceso ocurre prematuramente o a una proporción acelerada y usualmente resulta en síntomas. No hay definición ampliamente aceptada de la degeneración discal en la literatura, lo que refleja la dificultad en distinguir la degeneración discal de los procesos fisiológicos del crecimiento, envejecimiento y remodelación. La definición más reciente describe a la degeneración como una respuesta aberrante, mediada por células, responsable del progresivo daño, con fallo estructural combinado y signos acelerados y avanzados de envejecimiento. Esta definición propuesta, sugiere que la estructura intacta del disco intervertebral con los acelerados cambios relacionados con la edad es clasificada como degeneración discal temprana, mientras que el término de enfermedad degenerativa discal debe ser aplicado si el disco es también doloroso. Aunque el mecanismo exacto de la degeneración discal no se ha determinado, se conoce que se involucran un complejo de factores que interactúan, incluyendo cambios de macromoléculas de la matriz extracelular, disminución del contenido de agua, alteración de la actividad enzimática,

disminución de la permeabilidad de las placas terminales cartilaginosas, daño en el transporte de metabolitos, fracaso estructural, envejecimiento celular y muerte, y factores genéticos. Estos factores biológicos y biomecánicos causan extensos cambios histomorfologicos del disco intervertebral dando lugar a desorganización del anillo fibroso, solidificación del núcleo pulposo y adelgazamiento junto con calcificación de las placas terminales cartilaginosa. (2,7)

2.1.6 Cambios de macromoléculas en la matriz extracelular

Los cambios más importantes fisiológicos de la degeneración discal inician en el núcleo pulposo. Los cambios tempranos incluyen aumento de la degradación de agreganos y otros agregados que se acoplan con los proteoglicanos y un incremento en la concentración de los no agregados de proteoglicanos. La acumulación de proteoglicanos degradados deteriora aún más la difusión de nutrientes y oxígeno a través del disco. Un cambio en la proporción de los glucosaminoglicanos condroitin sulfato, heparan sulfato, y keratan sulfato también ocurren, con incremento en la cantidad de heparan sulfato y keratan sulfato con la progresión de la degeneración. Estos cambios disminuyen aún más las propiedades hidrosópicas de la matriz extracelular, resultando en disminución del contenido de agua y la disminución de la habilidad de embeber agua. La pérdida de proteoglicanos y glucosaminoglicanos da lugar a la disminución de la presión de hinchazón, pérdida de la hidratación, y pérdida de la altura del disco intervertebral. Los cambios resultan en alteración de la respuesta a aplicar cargas biomecánicas, y en última instancia conduce a las características estructurales de la degeneración. La degeneración del disco intervertebral también resulta en desorganización y destrucción de las redes de colágena y en general la disminución de proteoglicanos y del contenido de agua con un correspondiente incremento en el contenido de colágeno. El colágeno tipo I es remplazado por colágeno tipo II en el anillo fibroso interno y el núcleo pulposo y hay una tendencia que las fibrillas de colágeno tipo I que atraviesan

el disco y se convierten en más gruesas. Las fibras de colágeno altamente organizadas dispuestas en el anillo fibroso son rotas, y las redes de colágeno y la elastina son más casuales. Cuando las redes de colágeno son dañadas, la biomecánica del disco intervertebral está notablemente alterada, e incrementa el potencial de daño estructural. El incremento en los niveles de citocinas, como se discuten posteriormente, conduce a una mayor producción de proteinasas, causando alteración en otras colágenas tales como VI, IX, y X. La colágena tipo IX degradada el microambiente pericelular, lo que permite la expansión local de este microambiente durante la degeneración. El colágeno tipo IX disminuye similarmente al colágeno tipo II, implicando un estado avanzado de degeneración y fibrosis del núcleo pulposo. La síntesis de colágeno tipo VI aumenta con la progresión de la degeneración y funciona juntos para mantener la proliferación celular. El contenido total de la matriz extracelular en el núcleo pulposo está en equilibrio bien controlado entre las vías de degradación y síntesis, involucrando numerosas proteínas. En la degeneración discal, hay un desbalance entre la vía de degradación y síntesis y una predominante actividad enzimática catabólica. Proteinasas de la matriz metaloproteinaseas y la familia ADAMTS se adhieren al colágeno y a otras macromoléculas y han sido implicadas en la ruptura de la matriz extracelular. Las enzimas de degradación, la matriz metaloproteinaseas-3 y matriz metaloproteinaseas-13 y colagenasa 3 han sido encontradas en niveles incrementados en el disco humano degenerados. La regulación de la producción de la matriz metaloproteinaseas y ADAMTS y la producción de macromoléculas de la matriz extracelular se consigue mediante numerosas citocinas y factores de crecimiento. De particular importancia en la homeostasia de la matriz extracelular del disco intervertebral, los miembros de la familia de las interleucinas (catabólicas) y factores de crecimiento transformante- β (anabolismo). Mediadores de la inflamación tales como óxido nítrico y prostaglandinas E₂ y las citocinas IL-1 y IL-6 eran encontrados en niveles aumentados en discos degenerados. La capacidad de síntesis de las células del núcleo pulposo es incapaz de mantener niveles apropiados de producción de agregados y colágeno en la fase de este

incremento de catabolismo que contribuye a una mayor degeneración del disco intervertebral. (2,7)

2.1.7 Cambios celulares.

Durante mucho tiempo se ha reconocido que hay una pérdida lentamente progresiva de las células durante la degeneración del disco intervertebral, que conduce a una mayor pérdida de la matriz extracelular. Un organismo creciente de la literatura ha demostrado que la apoptosis, o la muerte celular programada puede ser responsable de muchas de las características de la degeneración.

Más recientemente la literatura, también ha demostrado un aumento de lagunas que contienen grupos de células posiblemente causando un aumento del número total de células, con la cual la degeneración del disco progresa. Este aumento de la proliferación celular puede ser un intento de compensar la destrucción progresiva y pérdida de la matriz extracelular. Una razón para el aumento de la celularidad puede ser el aumento focal en el suministro de nutrientes debido al crecimiento interno de los vasos sanguíneos en los discos degenerados. Grupos de células se han descubierto en las zonas adyacentes a los vasos sanguíneos recién formados dentro de los discos degenerados. Las células en esta área tienen acceso suministro de nutrientes y a factores de crecimiento y se someten a la proliferación. Los cambios celulares de los discos degenerados se asemejan a la osteoartritis, donde también se han encontrado remodelaciones del microambiente pericelular con la proliferación de condrocitos y formación de agrupaciones. En última instancia los intentos de reparación celular se vuelven ineficaces cuando la degeneración discal avanza porque el entorno mecánico local de las células se ha convertido en anormal. (2,7)

2.1.8 Cambios estructurales.

La hidratación del disco intervertebral disminuye y la distinción entre el anillo fibroso y el núcleo se vuelve menos definido y la altura del disco disminuye. En etapas posteriores, los cambios tisulares son cada vez más evidentes, incluyendo la pérdida de la organización de las láminas, figuración del anillo fibroso, y la decoloración y la solidificación del núcleo pulposo, desgarros del anillo fibroso radial y circunferencial son a menudo evidentes, a veces se extiende hasta la periferia del disco. Estos cambios se acompañan de crecimiento hacia el interior de nervios y vasos sanguíneos en el disco intervertebral y la deposición de tejido de granulación y calcificación dentro de las placas terminales cartilaginosas. Estos cambios estructurales en última instancia conducen a alterar las propiedades biomecánicas normales del disco intervertebral. El daño a un área del disco intervertebral aumenta el soporte de carga para el tejido adyacente, lo que es más probable que el daño se propague. Aunque un disco intervertebral sano, se igualan su presión en su interior, disminuyendo la capacidad de absorción al choque y en el núcleo pulposos descomprimido conduce a altas tensiones de compresión en el anillo fibroso. Otros cambios morfológicos gruesos de la degeneración discal incluyen protrusiones discales, estrechamiento del espacio discal, irregularidades de las placas terminales cartilaginosas, y formación de osteofitos y artritis. (2,7)

2.1.9 Neovascularización y crecimiento interno de nervios sensoriales.

El disco intervertebral es en gran parte vascular en el adulto, con vasos sanguíneos normalmente restringido únicamente a la capa externa del anillo fibroso. Del mismo modo, solo el exterior del anillo fibroso de 1 a 2 mm del anillo fibroso está inervado en el disco intervertebral del humano. El nuevo crecimiento de vasos sanguíneos y nervios sensoriales es una característica importante de los discos degenerados, sin embargo, y parece ser asociado con dolor. El crecimiento interno de capilares se facilita por la pérdida de la presión hidrostática en la región interna del disco, que normalmente colapsa pequeños vasos. Esta reciente formación de microvasos liberan factor de crecimiento

neurotrófico tales como factor de crecimiento del nervio, lo que permite el crecimiento interno de fibras nerviosas amielínicas. Se ha planteado la hipótesis de que el dolor discogénico surge porque estas fibras nerviosas nociceptivas crecen en el área del disco que previamente no tenía neuronas. (2,7)

Un papel del colágeno tipo IX es mantener la integridad del disco intervertebral, es implicado a dos genes relacionados con el colágeno tipo IX que son el COL9A2 y COL9A3 son asociados con la degeneración discal, y es significativo que en el disco intervertebral de pacientes que tengan el alelo de riesgo el Trp2 en el gen COL9A2 se encuentren alterados mecánicamente, con las propiedades de retención de agua reducidas y la resistencia a la compresión afectada. (3)

Presentando cambios macroscópicos e histológicos y Cambios bioquímicos afectando la capacidad total del disco para funcionar con eficacia y en última instancia, ambos contribuyen al fracaso del disco intervertebral progresivamente. (8)

En la degeneración del disco intervertebral, la tasa de anabolismo de la matriz extracelular disminuye mientras que el catabolismo de esta misma incrementa, esto genera diversos cambios. El contenido de proteoglicanos en el núcleo pulposo desciende significativamente y con esto la habilidad de la matriz extracelular de atraer y retener agua. Macroscópicamente, el tejido fibroso formado en el núcleo pulposo, resulta en una pérdida en las características de su forma de gel y finalmente llevando a una pérdida en la diferenciación entre el núcleo pulposo y el anillo fibroso. Se ha implicado a las cargas mecánicas repetidas y la disminución de los nutrientes como factores críticos en la degeneración. La sobrecarga mecánica del disco intervertebral ha demostrado inducir una actividad catabólica asociada a degeneración. La nutrición insuficiente, disminuye el anabolismo de la matriz extracelular. Debido a que el disco es avascular, este debe recibir sus nutrientes a través de difusión. Los

vasos sanguíneos terminan en la placa terminal y los nutrientes se movilizan a través de esta y la matriz extracelular para alcanzar las células que ahí se encuentran. Cuando la nutrición del disco se ha alterado ocurre una disrupción de la matriz extracelular y muerte celular. (9)

En lugar de un proceso pasivo de desgaste, la degeneración del disco es una respuesta aberrante, mediada por células, un fallo estructural progresivo debido al envejecimiento y otros factores ambientales tales como el estrés mecánico anormal. Con el envejecimiento y la degeneración, las células del disco experimentan cambios biológicos sustancialmente, incluyendo alternancia del tipo de células en el núcleo pulposo, aumento de la densidad celular, pero disminución del número de células viables como resultado a el aumento de la muerte celular y al aumento de la proliferación celular, aumentando la senectud de la célula, y alterando su fenotipo que se caracteriza por la capacidad comprometida de la síntesis de componentes de la matriz extracelular en forma correcta y por el metabolismo catabólico mejorado.(10)

En la actualidad se han realizado diferentes modelos degenerativos del disco intervertebral en animales que proporcionan datos científicos básicos en relación con la mecanobiología como la redistribución del estrés secundario a una despresurización del núcleo, que puede causar metaplasia celular y remodelación tisular. Al generar una perturbación moderada, se observa producción de factores pro-inflamatorios, proliferación celular y síntesis de matriz, mientras que la perturbación severa causa cambios arquitectónicos consistentes con la degeneración discal del humano, en conclusión, estos modelos sugieren que hay dos etapas de remodelación: Adaptación temprana a la carga por gravedad seguida por la curación significativa, restableciendo la estabilidad biomecánica que es desacelerada por el tejido avascular. Actualmente los modelos animales se encuentran limitados por los resultados directamente relacionados con factores clínicos importantes como es el dolor y la discapacidad. (11)

En la actualidad el Gold standard para el tratamiento de la degeneración discal, así como las consecuencias de la alteración mecánica por la pérdida de la estructura de un disco intervertebral como son el dolor discogénico, la inestabilidad axial, traslacional y angular, hernias de disco o la disminución del canal raquídeo, sigue siendo la fusión espinal con o sin fijación y/o laminectomía lo que corresponde al análisis de que si no hay disco no hay dolor. Existen tratamientos que se han ideado para preservar el movimiento del segmento como son las prótesis discales o dispositivos dinámicos. (12)

También se han desarrollado técnicas con mínima invasión que tienen el propósito de una recuperación más rápida para evitar una complicación dural tardías, todas estas técnicas de tratamiento resultan tener éxito de manera moderada y la tasa de reparaciones es relativamente alta debido a que el principal cambio en la estructura del disco es la pérdida de la naturaleza, debido a que se sustituye con tejido cicatrizal fibroso que conlleva a otras complicaciones. (13)

Debido a los altos costos de este padecimiento y al discomfort que produce, se han explorado nuevas modalidades de tratamiento desde el punto de vista celular controlando la homeostasis interna y recuperando la matriz extracelular. (14)

2.2 Antecedentes Directos:

2.2.1 Célula Madre Mesenquimales.

Las células madres mesenquimales, células indiferenciadas encontrados en varios tejidos del adulto, con naturaleza pluripotencial, fue demostrada por

Pittenger y colaboradores, demostrando que son células pluripotenciales presentes en la médula ósea del adulto, que pueden replicarse a células indiferenciadas y que tienen el potencial de diferenciarse a linajes de células de tejido mesenquimales, incluyendo hueso, cartílago, grasa, tendón, músculo y médula estroma. Las células que tienen las características de las células madres mesenquimales se aislaron a partir de aspirados de médula de donadores voluntarios. Estas células muestran un fenotipo estable y se mantuvieron como una monocapa in vitro, demostrando que las células madres adultas podrían ser inducidas a diferenciarse exclusivamente en los linajes adipocitos, condrocitos, y osteocitos, estas células individuales cuando se expanden en colonias retuvieron su potencial multilinaje. (15,16)

A nivel del disco intervertebral numerosos estudios in vivo han examinado el uso de las células madres mesenquimales para demostrar el proceso degenerativo del disco intervertebral y la regeneración de la matriz extracelular, en el 2003 Sakait y colaboradores condujeron el primer estudio explorando el uso de las células madres mesenquimales para reparar la degeneración de un disco intervertebral in vivo en un modelo en conejos. Utilizando células madre mesenquimales autólogas incrustada en un gel atelocolágenos fueron trasplantadas en los discos de conejos que habían sido sometidos a un procedimiento probado para inducir degeneración, los resultados sugirieron que el trasplante de células madre mesenquimales es eficaz para desacelerar la degeneración del disco intervertebral en un modelo experimental y proporciona nuevas esperanzas para el tratamiento de la enfermedad degenerativa del disco en los seres humanos. El gel de atelocolágenos sirvió, como un importante portador de las células madre mesenquimales en el trasplante, lo que permite la proliferación, la síntesis de la matriz y la diferenciación de las células madre mesenquimales. Este estudio refuerza la eficacia viable de aplicación práctica de las células madre mesenquimales en el tratamiento de la enfermedad del disco intervertebral. (15,17)

En otros estudios se trasplantaron células madres mesenquimales en discos intervertebrales de conejos maduros, demostraron la diferenciación en células que expresan algunos de los principales fenotipos del núcleo pulposos y algunas células similares a los condrocitos del núcleo pulposos. (18)

En otros estudios, se menciona que la ingeniería de tejidos basados en células son alternativas realistas para la regeneración de tejidos, sin embargo, uno de los principales problemas para esta estrategia es la generación de una población adecuada de células, llevándose a cabo co-cultivos para determinar si las células del núcleo pulposos humano pueden iniciar la diferenciación de células madres mesenquimales humanas célula-célula. Esto se permite el examen de la población de células individuales, demostrando que las células del núcleo pulposos humano en contacto con células madre mesenquimales en co-cultivo es un método viable para la generación de una población diferenciada que se podría utilizar en las terapias de ingeniería de tejido basados en células para la regeneración del disco intervertebral degenerado. (19)

En otros estudios se encuentran bajo estudios diferentes biomateriales o hidrogeles, cuyo enfoque es la sustitución biológica del disco intervertebral para la reparación del disco intervertebral los cuales son biocompatibles e inductoras de las células progenitoras desarrolladas de las células madres mesenquimales. (20)

En otros estudios, se evaluó la eficacia de la jalea de Wharton (WJ) de los cordones umbilicales humanos como fuente de células madre mesenquimales (MSC), en ácido hialurónico como andamio, esto de acuerdo a sus niveles de expresión de los receptores del factor β de crecimiento transformador I / receptores de activina kinasa 5 (T β RI / ALK5) y T β RII para la regeneración del disco intervertebral en un modelo en conejo. A las 12 semanas después del trasplante, se analizaron bajo RMN en T2 mostrando la restauración significativa del contenido de agua en los discos de conejo tratados con ácido

hialurónico como andamio cargado con células madre mesenquimales con alto contenido de TR, comparado con los conejos tratados con ácido hialurónico como andamio cargados de células madre mesenquimales con bajo contenido de TR. El análisis morfológico e histológico revelaron que la regeneración del disco intervertebral fue mayor en conejos trasplantado con ácido hialurónico como andamio cargado de células madre mesenquimales con alto contenido de TR con esto se apoya el potencial de regeneración de WJ-MSC. (21)

Estudios recientes sugieren que la terapia celular es una manera eficaz para reparar la degeneración del disco intervertebral, utilizando al TGF- β 1 como un fuerte supresor inmunológico, que ha demostrado inhibir la inflamación eficazmente. El objetivo de un estudio fue explorar los efectos TGF- β 1 durante la terapia de células madre mesenquimales de médula ósea para la degeneración del disco intervertebral, realizándose un ensayo in vitro demostrando que el co-cultivo de células del núcleo pulposo con células madre mesenquimales de la médula ósea se encontró niveles significativamente más altos de secreción de TGF- β 1, revelando en un modelo de conejos. El análisis de Resonancia magnética, se encontró recuperación significativa de la intensidad de la señal en los discos degenerados de conejos que recibieron trasplantes de células con la presencia del inhibidor de TGF- β 1, estos hallazgos indican que el aumento de la producción de este, recuperó la degeneración del disco intervertebral, y que las tinciones inmunohistoquímicas detectaron mejoría de la expresión del colágeno II en los conejos tratados con el trasplante de células. Sin embargo, las células positivas de NF- κ B fue significativamente menor, por lo tanto, la terapia celular promovió la expresión de TGF- β 1 en el núcleo pulposo, resultando en efecto anti-inflamatorio a través de la inhibición de NF- κ B, y la mejora de la degradación del disco debido al aumento de la expresión de colágeno II y agrecano en la degeneración del disco intervertebral. (22)

El desarrollo de andamios en ingeniería de tejidos formados por KLD-12 polipéptidos / TGF- β 1 gel de nanofibras para la inducción de células madre mesenquimales diferenciándose en células del núcleo pulposo, demostró ser capaz de formar matriz extracelular y tener el potencial para servir de andamio de apoyo tridimensional para llenar las primeras cavidades residuales postquirúrgicas y para el tratamiento de la degeneración del disco intervertebral. (23)

Se investigó el efecto de una mezcla de células madre mesenquimales de médula ósea y células del anillo fibroso en la reparación de los discos degenerados de conejos. Para proporcionar una base experimental para su aplicación clínica, y que después del trasplante de células, la altura del disco intervertebral se recuperara. Las células trasplantadas sobrevivieron en los discos, proliferaron después del trasplante y produjeron matriz extracelular. Se realizaron evaluaciones macroscópicas e histológicas confirmando la conservación estructural y nuclear en discos en donde se realizó el trasplante de células encontrándose estadísticamente significativamente superior la secreción y expresión de colágeno tipo II y glucosaminoglicanos. Concluyendo que el trasplante de mezclas de células madre mesenquimales de médulas ósea y células del anillo fibroso puede restaurar la matriz extracelular, haciendo de este enfoque superior al trasplante de células madre mesenquimales de médula ósea solo, lo que puede ser beneficioso para la terapia de la degeneración del disco intervertebral. (24)

Basados en estudios experimentales que demuestran la importancia del núcleo pulposo en la preservación de la estructura del disco, se ha demostrado que la reinserción de las células del núcleo pulposo, desaceleró aún más la degeneración del disco y que el contacto de cultivos célula a células con células madre mesenquimales regularon significativamente la viabilidad de las células del núcleo pulposo en estudios básicos y preclínicos, in vitro e in vivo utilizando modelos animales y células humanas. (25)

Estudios han encontrado células madres en ligamentos amarillos humanos, y utilizadas en cultivos. Las células madres de ligamento amarillo en humanos con células del núcleo pulposo bajo normoxia e hipoxia, concluyendo que estas dos células en cultivos se diferenciaron con éxito en células del núcleo pulposo bajo hipoxia esto potencialmente proporciona nuevas células para la medicina regenerativa basada en células y la ingeniería de tejidos. (26)

En las últimas décadas la aplicación de biorreactores ha evolucionado en el concepto de cultivos de tejidos y órganos que requieren una carga mecánica. Las investigaciones del disco intervertebral, junto con los esfuerzos de colaboradores en ingeniería biomédica, la biología y la mecatrónica, han innovado nuevos dispositivos de carga que pueden mantener la viabilidad del disco intervertebral en animales grandes y cadáveres humanos, con adecuado entorno nutricional y mecánico bien definido con precisión, y con la capacidad de mantener durante tiempo prolongado a los cultivos. Sobre todo, en la columna vertebral y en las investigaciones del disco intervertebral, estos modelos de cultivos de órganos ofrecen alternativas atractivas para los modelos animales bípedos que cuyo origen natural de la degeneración del disco intervertebral y el fondo genético no existen similar a la condición humana. En últimas investigaciones han demostrado conceptos importantes, incluyendo el potencial de homing de las células madre mesenquimales en el disco intervertebral nutricional o mecánicamente estresados y el potencial regenerativo de los biomateriales inteligentes para el núcleo o reparación del anillo fibroso. La limitación son ciertos aspectos de evaluación de la respuesta inmunológica y el dolor que no pueden abordarse con los sistemas ex vivo. (27)

El seguimiento de las células madre mesenquimales con nanopartículas de óxido de hierro y la resonancia magnética nuclear proporciona una oportunidad para desarrollar la comprensión a fondo de la supervivencia de las células madre, la diferenciación y su migración, lo que permite optimización el

tratamiento con células madre, ofreciendo un posible enfoque regenerativo de la enfermedad del disco intervertebral. las investigaciones preclínicas han demostrado prometer tanto bioquímica, histológica y resultados radiográficos, en la restauración de la degeneración del disco intervertebral. (28)

En otras, se investigó el crecimiento y la diferenciación de cultivos de células madre mesenquimales en andamios de colágena biodegradable, con el fin de obtener una suspensión inyectable. En estos microsoportes, las recién aisladas células madre mesenquimales tuvieron menor tasa de proliferación y potencial de diferenciación condrogenica en comparación con los primeros pasajes de células madre mesenquimales. Concluyendo que los microsoportes a base de colágeno son soportes adecuados para el crecimiento in vitro de células madre mesenquimales y su condrogénesis, especialmente cuando se cultivan a niveles de oxígeno de 5 %. (29)

Se han aislado y caracterizado una subpoblación de células de anillos fibrosos de conejos que forman colonias in vitro y pueden auto-renovarse. Estas células mostraron expresión génica de las moléculas de antígenos de superficie típicas que caracterizan a las células madre mesenquimales, incluyendo CD29, CD44 y CD166. Mientras tanto, no expresan marcadores negativos de las células madre mesenquimales tales como CD4, CD8, CD14, además también expresaron Oct-4, nucleostemin y SSEA-4 proteínas. Al inducir la diferenciarse mostraron osteogénesis típica, condrogénesis, y el potencial de la adipogénesis. En conjunto, estas células formadoras de colonias derivadas del anillo fibroso poseen clonogenicidad, auto-auto-renovación, y la capacidad de diferenciación potencial múltiple, son tres criterios que caracterizan a las células madre mesenquimales, tales células derivan del anillo fibroso y pueden potencialmente ser un candidato ideal para el tratamiento de la enfermedad degenerativa discal utilizando terapia celular o enfoque de ingeniería de tejidos. (30)

El número de células discales responsables de la estimulación de factores de crecimiento disminuye durante la degeneración. Introduciendo células capaces de regenerar el tejido discal puede potencialmente revertir la degeneración asociada con la disrupción interna del disco. Fuentes autólogas para terapia biológica incluyen células nativas del disco y células madre mesenquimales formadas en la médula ósea. (31)

Estudios recientes sugieren que las células de la notocorda están involucradas en la homeostasia del disco intervertebral, un papel explotable para contrarrestar la degeneración de la matriz extracelular como se ha observado durante la degeneración. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial de las células de la notocorda para promover la producción de la matriz extracelular por las células del núcleo pulposo y compararla con la propuesta actual de las células del estroma de la médula ósea las que corresponde a las células madre mesenquimales. (32)

Las células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical del humano contiene células madre que poseen la capacidad de regenerar discos intervertebrales degenerados. Basándose en los resultados de los experimentos anteriores in vitro y en animales, se realizó un estudio preliminar para probar la viabilidad y la seguridad con el propósito de obtener una indicación temprana para el valor terapéutico de las células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical del humano, trasplantados en pacientes con dolor lumbar discogénico crónico. Los resultados después del trasplante fue que el dolor y la función mejoraron inmediatamente y los valores de la escala visual análoga y el índice de incapacidad de Oswestry disminuyeron durante el periodo de seguimiento de 2 años, el inconveniente de este estudio es que se trata de un estudio preliminar con pocos pacientes pero concluyeron que los resultados clínicos indicaron que el trasplante de células madre mesenquimales derivadas del cordón umbilical del humano es un

método alternativo favorable para el tratamiento del dolor lumbar discogénico crónico.(33)

Con respecto a la seguridad y eficacia de las células madre mesenquimales para el tratamiento de la degeneración del disco intervertebral, se ha demostrado que en estudio animales se presentó una tasa baja de incidencia de complicaciones y son eficaces para detener la progresión de la degeneración del disco intervertebral o el aumento de la altura del disco intervertebral. Las células madre mesenquimales ofrecen una opción de tratamiento para la degeneración del disco intervertebral, por lo que los ensayos clínicos publicados y estudios piloto demuestran la capacidad de las células madre mesenquimales para inhibir la degeneración del disco intervertebral. Sin embargo, no se han reportado ensayos clínicos aleatorios en los seres humanos. (34)

Se han desarrollado técnicas para realizar el abordaje para introducir células madre mesenquimales en los modelos animales en forma mínimamente invasiva y precisa, para aumentar el núcleo pulposo en los discos intervertebrales dañados, creando en un modelo de conejo un daño en discos contiguos a nivel de L4-L5 tratándose con células madre mesenquimales en hidrogel de hialuronato, estos introducidos a los discos intervertebrales por fluoroscopia. Concluyendo que los resultados demuestran que la administración mínimamente invasiva de las células madre mesenquimales en hidrogel de hialuronato aumentó la reparación del núcleo pulposo en los discos intervertebrales dañados. (35)

2.2.2 Condrocitos.

Con respecto a la regeneración del disco intervertebral, los condrocitos autólogos articulares, pueden servir como fuente, debido a que estos son fenotípicamente similares a las células discales y pueden ser recolectadas de

áreas que no soportan carga en la rodilla. Defectos articulares se han reparado utilizando condrocitos autólogos, sugiriendo que estas células pueden sobrevivir al trasplante y ayudar a la reparación tisular. (31)

Hay nuevas opciones atractivas que aparentemente crean una gran esperanza para el futuro. Actualmente la ingeniería tisular se ha enfocado a un reemplazo biológico del disco intervertebral, el cual se puede dividir dependiendo del tejido involucrado a reemplazar, ya sea el anillo fibroso o el núcleo pulposo. Por ejemplo, la reparación tisular mediante la implantación de células vivas utilizando cultivos de condrocitos parece un buen enfoque para inducir la sustitución de la matriz extracelular funcional del disco intervertebral. (36)

En un artículo de revisión de terapia basadas en células usadas para el tratamiento de la enfermedad degenerativa del disco intervertebral lumbar, revisando diferentes buscadores de literatura, se dividieron la información en cuatro grupos, uno de ellos en los que se utilizaron trasplante de condrocitos obtenidos de tejidos de discos intervertebrales u otros cartílagos, donde se valoraron la capacidad de los condrocitos derivados de discos y de células no discales en la regeneración del disco intervertebral fueron trasplantadas con el fin de reemplazar la población de células agotadas o que comienzan a envejecer, es un enfoque razonable para la reparación del disco. Los condrocitos del disco intervertebral, tales como células del núcleo pulposo, se han aislado con éxito apartar de tejidos del disco intervertebral, en cultivos expandidos, se han utilizado como medio para tratar la degeneración discal, reportando resultados favorables de estas células en discos degenerados. Demostrando la mejoría de las evaluaciones de la morfología e histología, al igual del incremento de los proteoglicanos contenidos en el núcleo pulposo, estos hallazgos consistentes en la disco seguida del trasplante de condrocitos, preservando la altura del disco, el aumento de la señal en T2 de la resonancia magnética nuclear y la reconstrucción de la matriz extracelular del disco intervertebral. (37)

En otros estudios fundamentado en la ingeniería de tejidos favoreciendo el trasplante de condrocitos autólogos se realizó un implante libre de celular consistente en ácido poliglicólico y ácido hialurónico, fue inmerso en un suero alogénico e implantado en los defectos de discos después de la discectomía en conejos blancos de Nueva Zelanda indujo a la regeneración, resultando en la mejoría del contenido de agua en el disco y la preservación de la altura del disco después de 6 semanas del procedimiento.(38)

Una respuesta autoinmune en las hernias del núcleo pulposo se ha sugerido que desempeña un papel importante en la iniciación de la radiculopatía , la interleucina-17 es una citoquina asociada con la inflamación y la autoinmunidad, sin embargo, aún no se ha llevado a cabo una extensa investigación en la expresión de la interleucina -17 en las diferentes patologías del disco intervertebral, pero se concluye que la inflamación local y la activación inmune autorreactivas pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de la hernia de disco lumbar y estos resultados también sugieren un papel de los condrocitos en la reparación de hernia del disco intervertebral.(39)

La ingeniería de tejidos tiene como objetivo proporcionar la biomimética recapitulación de tejidos nativos. Dispositivos termoplásticos biocompatibles para la impresión en 3D pueden generar estructuras de alta resolución que asemejan a la matriz extracelular tejido, utilizando impresoras 3D en andamios de poros grandes de acrylonitrile butadiene styrene y polylactic acid se compararon para el crecimiento celular, la viabilidad y la generación de tejido. Condrocitos articulares primarios y células del núcleo pulposo se cultivaron en estos andamios durante tres semanas. Ambas células proliferaron bien, mostrando una alta viabilidad, y producción de grandes cantidades de proteoglicanos y colágeno tipo II en ambos andamios, demostrándose la reparación del disco intervertebral in vivo. (40)

Por otra parte, las células del disco intervertebral siendo las más importante los condrocitos, obtenidos a partir de fragmentos de disco secuestrado o prolapso, que son discos cuyas células puede efectuar mediante el proceso degenerativo y ser dañados, pueden ser inadecuados para la regeneración del cartílago debido a la heterogeneidad del tejido recogido y con baja viabilidad de las células contenidas dentro de estos tejidos. (41)

En hernias de disco tratadas por discectomía, resultan en una pérdida significativa del material del núcleo pulposo y la altura del disco intervertebral. La restauración biológica mediante el uso de trasplante autólogo de condrocitos al disco intervertebral, ofrece un potencial para lograr la integración funcional del metabolismo y la mecánica del disco intervertebral. (42)

A pesar de muchas investigaciones que se centran en el núcleo pulposo, se han creado múltiples consensos entre la comunidad científica para definir el fenotipo de células del núcleo pulposo. En la Spine Research Interest Group en el 2014 en el Annual ORS Meeting en New Orleans, convocada con la tarea de compilar una definición del fenotipo de células de núcleo pulposo con la esperanza de que dicho consenso impulsará la investigación disco. En base a dicha evaluación de los estudios recientes que describen marcadores característicos del núcleo pulposo y su relación fisiológica, haciendo las recomendaciones de los siguientes marcadores fenotípicos del Núcleo pulposo saludable, estableciendo la expresión del HIF-1 α , GLUT-1. Relación Aggrecan/collagen II> 20, Shh, Brachyury, KRT 18/19, CA12 y CD24. (43)

La inducción de tamoxifeno en un modelo de ratón cuya meta fue que los condrocitos específicos expresar CreERT2 que es un impulsor para promover el colágeno tipo II (Col2CreERT2). La fusión de la proteína se expresa y se transloca en el núcleo tras la administración de tamoxifeno, que a su vez desencadena la recombinación de genes específicos. Desde entonces este modelo animal se ha convertido en una poderosa herramienta para estudiar el

mecanismo molecular del desarrollo del esqueleto y de las enfermedades degenerativas del cartílago, incluyendo la osteoartritis de rodilla, la osteoartritis de la articulación temporomandibular, y la degeneración del disco intervertebral. (44)

La degeneración del disco intervertebral se caracteriza por cambios en el estado de proteoglicanos, a la pérdida de moléculas de agua unidas, y a la disminución de la presión osmótica del tejido resultando en una falla mecánica del disco intervertebral. Este espectro de cambios es similar al del cartílago articular artrótico. Cuando está sano, las células residentes en estos tejidos esqueléticos responden a las cargas mecánicas aplicadas mediante la regulación de su propio estado osmótico y la hidratación de la matriz extracelular. La transcripción del factor de tonicidad responsable del enhancer binding proteína (TonEBP o NFAT5) es conocido como el que media la respuesta osmoadaptativa en estos y otros tejidos. Mientras que la base molecular de cómo la homeostasis osmótica de la matriz controla las cargas, no se entiende totalmente, la TonEBP regula la expresión de aggrecan y β 1,3 glucuronosyltransferase en células del núcleo pulposo, además de permitir la supervivencia bajo estrés hipertónico. Por otra parte, en los condrocitos, la TonEBP controlan la expresión de varios subtipos de colágeno y Sox9, un regulador maestro de la expresión de aggrecan y colágeno II. Por lo tanto, la regulación mediada por TonEBP de la composición de la matriz permite que las células del disco intervertebral y los condrocitos modifiquen su estado osmótico extracelular propio. (45)

Los condrocitos en el cartílago articular están rodeados por una matriz pericelular estrecha (PCM) que es a la vez bioquímicamente y biomecánicamente distintas de la matriz extracelular (ECM) del tejido. Mientras que la PCM se observó por primera vez hace casi un siglo, su papel esta todavía bajo investigación. En apoyo de las primeras hipótesis sobre su función, el aumento de la evidencia indica que el PCM sirve como un transductor de

señales bioquímicas y biomecánicas a los condrocitos, desempeñando un papel crítico en el control del entorno mecánico y mecanobiología de las células en el cartílago y otros tejidos cartilaginosos, tales como el menisco o disco intervertebral. (46)

La mayoría del dolor lumbar crónico es el resultado de la degeneración del disco intervertebral lumbar. Ligustrazine, un alcaloide de Chuanxiong, según los informes, es capaz de aliviar el dolor, suprimir la inflamación y tratar la osteoartritis y tiene el efecto protector sobre el cartílago y los condrocitos. Para determinar el efecto de ligustrazine en la degeneración del disco, se aplicó un modelo de rata e induciendo la degeneración del disco intervertebral por la prolongada postura erguida. Encontrando que el pretratamiento con ligustrazine durante 1 mes recupero la distorsión estructural del disco intervertebral degenerado, inhibiendo la expresión de colágeno tipo X, Metaloproteinasas de la matriz (MMP)-13 y MMP3; tipo sobre regulados de colágeno II y la disminución de IL-1 β , la ciclooxigenasa (COX)-2 y la expresión del óxido nítrico sintetasa inducible(iNOS). (47)

Las propiedades de las células progenitoras en el anillo fibroso utilizándose in vitro e in vivo, aumenta la expresión de colágeno y agregano bajo estímulo condrogénico, y bajo condiciones osteogénicas mostraron un aumento de la mineralización y la expresión de genes osteopontina, Runx2 y BMP2. Los resultados sugieren que las células del anillo fibroso tienen características de células progenitoras y bajo estímulos apropiados, son capaces de diferenciarse en condrocitos y osteoblastos in vitro, así como in vivo. (48)

Los cambios Modic 1 se caracterizan por edema, vascularización, y la inflamación que conducen a la degeneración del disco intervertebral. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina proinflamatoria estrechamente relacionada con las citoquinas inflamatorias detectadas en los tejidos del disco intervertebral degenerados. Sin embargo, la existencia y el

papel del MIF y su receptor CD74 en la degeneración del disco intervertebral no se han dilucidado, preguntándose si el MIF y su receptor CD74 se expresan en placas terminales cartilaginosas con cambios modic tipo 1, encontrándose expresado en placas terminales cartilaginosas de tejidos humanos y condrocitos. Los condrocitos en las placas terminales cartilaginosas con cambios modic 1 expresan MIF y su receptor CD74, promoviendo la respuesta inflamatoria a través de CD74. Apareciendo la liberación de citoquinas inducidas por el MIF para ser suprimidas por ISO-1 y CD74Ab podría inducir la liberación de citocinas. La vía del MIF/CD74 representa un objetivo fundamental para el tratamiento de la degeneración del disco ya que la inhibición de la función de MIF con su antagonista ISO-1 reduce la inflamación inducida por el MIF y ejerce efectos terapéuticos potentes. (49)

Las intensas investigaciones se centran ahora en la promoción de la matriz del disco intervertebral. El Péptido N-terminal de proteínas enlace (LPP) es un fragmento proteolítico de la proteína de enlace, un importante agente de reticulación y un estabilizador de los principales componentes estructurales del cartílago, aggrecan e hialurónico. Investigando la acción de LPP en las células de conejo del disco intervertebral primero cultivadas ex vivo en un matriz de alginato tridimensional, demostrándose que promueve la producción de matriz extracelular del disco, que se evidencia por el aumento de expresión del factor de transcripción SOX9-condrocito específico y las macromoléculas de la matriz extracelular aggrecan y colágeno II. (50)

Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea representan una fuente de células autólogas para el núcleo pulposo, la ingeniería de tejidos y la regeneración. Aunque los estudios han demostrado la capacidad de las células madre mesenquimales a diferenciarse para el núcleo pulposo como son las células condrocíticas. Poco han estudiado comparativamente la síntesis de la matriz y la composición del tejido cartilaginoso formado in vitro a partir de ambas células, particularmente con respecto a la expresión de la membrana

basal de las moléculas. Evaluando la condrogénesis y la expresión de moléculas de membrana basal, laminin y colágeno tipo IV, en monocapa y en cultivo de pellets de células y MSCsNP caprina, ambos demostraron niveles comparables de condrogénesis indicado por el porcentaje de células condrocitos y la cantidad de colágeno Tipo II y glicosaminoglicano. (51)

La activación de proteína Kinase C δ (PKC) se ha demostrado es un paso que limita la velocidad principal en la producción de enzimas degradante de la matriz en los condrocitos articulares humano, evaluando su papel de la PKC específicamente PKC δ en la homeostasis tisular del disco intervertebral. Concluyendo con la supresión de la vía PKC puede ser beneficioso en la prevención y/o tratamiento de la degeneración del disco, los resultados de esto proporcionan pruebas de un papel potencial terapéutico de los inhibidores vía específica de la cascada de PKC en el futuro. (52)

Estudios se han realizado para investigar la asociación de células del núcleo pulposo con proteínas específicas de la superficie celular que difieren de las proteínas en tipos de células estrechamente relacionadas, es decir, células del disco intervertebral del anillo fibroso y el cartílago articular condrocitos a fin de identificar superficie molecular potenciales para la administración dirigida de agentes terapéuticos. Encontrando que la anhidrasa carbónica XII CAXII puede ser considerada para la detención o la orientación de las células del disco en la degeneración. Además, el CAXII puede estar implicada en la regulación del pH de las células del Núcleo pulposo. Su potencial para la entrega dirigida de factores regenerativos y su papel funcional en la homeostasia del Núcleo pulposo ordena mayores investigaciones. (53)

El núcleo pulposo del disco intervertebral funciona proporcionando soporte de carga de compresión en la columna vertebral y el contenido de células desempeña un papel crítico en la generación y el mantenimiento de este tejido. La población de células del núcleo pulposo sufre cambios morfológicos y

fenotípicos significativos durante la maduración y el envejecimiento encontrándose transiciones grandes, células vacuolada inmaduras dispuestas en grupos de células a una escasa población de células similares a condrocitos más pequeños y aisladas. Estos cambios morfológicos y de organización parecen correlacionarse con los primeros signos de cambios degenerativos dentro del disco intervertebral. La matriz extracelular de los núcleos pulposos inmaduros es un material suave, gelatinoso que contiene múltiples isoformas de láminas, características que son únicas en el núcleo pulposo en relación con otras regiones del disco que cambian con el envejecimiento y la degeneración. Basándose en este conocimiento, la hipótesis de que un ambiente suave, laminar rica en matriz extracelular promovería la interacciones célula-célula en el núcleo pulposo y fenotipos similares a los encontrados en los tejidos del núcleo pulposo inmaduros. (54)

Las células madre mesenquimales derivadas de tejidos adultos son un candidato importante para la terapia celular y medicina regenerativa debido a su capacidad de diferenciación multipotenciales. Las células madre mesenquimales han sido identificadas en muchos tejidos adultos, pero no han reportado en las placas terminales cartilaginosas del disco intervertebral humano. Con esto se determinó la existencia de células madre mesenquimales en las placas terminales del cartílago del disco intervertebral humano degenerado. Estos resultados pueden mejorar nuestra comprensión de las fisiopatologías y el proceso degenerativo del disco intervertebral y podrían proporcionar candidatos de células para la medicina regenerativa basada en células y la ingeniería de tejidos. (55)

Los mecanismos moleculares que subyacen a diferenciación de los condrocitos de vértebra humana siguen sin estar claros. Recientemente hemos demostrado que la proteína de membrana epitelial 1 (EMP1) es altamente expresada en los discos intervertebrales degenerativos. La EMP1 está implicada en la diferenciación de múltiples tipos de células incluyendo las células

progenitoras/pre-B, neuronas y podocitos. Por lo tanto, la hipótesis de que EMP1 podrá participar en la diferenciación de los condrocitos de la columna vertebral. Identificándose que la EMP1 no se expresa en el centro de osificación de las vértebras, pero es altamente expresado en las placas de crecimiento del núcleo pulposo, en donde los condrocitos son inmaduros y no se han producido la osificación endocondrala. Estos resultados sugieren que la EMP1 inhibe la diferenciación de los condrocitos vertebrales humanos. (56)

Los condrocitos humanos y las células del anillo fibroso del disco intervertebral expresan la osteoprotegerina (OPG), pero el efecto de la OPG en la patogénesis de la degeneración del disco intervertebral sigue siendo desconocida, evaluándose el cambio de fenotipo del disco intervertebral en OPG en ratones. La proteína OPG expresa en las células de las placas terminales cartilaginosas y en el anillo fibroso en el disco intervertebrales de ratones. Concluyendo que la OPG en el disco intervertebral desempeña un papel importante para mantener la integridad del cartílago durante el envejecimiento de la placa terminales mediante la prevención de cartílago de las placas terminales de la resorción mediada por los osteoclastos. (57)

La expresión ectópica de Sox-9 puede inducir a las células madre derivadas de tejido adiposo para funcionar las células del núcleo pulposo como real in vitro.este nuevo enfoque puede proporcionar un sistema viable para una diferenciación sencilla y rápida de las células madre derivadas del tejido adiposo en células similares a condrocitos que pueden utilizarse potencialmente como una herramienta terapéutica basada en células madre para el tratamiento de enfermedades degenerativas del disco intervertebral.(58)

Se determinar la posible de formar in vitro una construcción trifásica que consta de núcleo pulposo (NP), placa terminal de cartílago (CEP) y un sustituto óseo poroso de polifosfato de calcio (CPP). Se colocaron condrocitos articulares bovinos en la superficie superior de una construcción de CPP porosa y se les

permitió formar cartílago in vitro. Luego se colocaron células del núcleo pulposo sobre el cartílago hialino formado in vitro. A las 24 horas, la microscopía electrónica de barrido demostró que las células NP mantenían su morfología redondeada, similar a las células NP colocadas directamente sobre CPP poroso. A las 8 semanas, el examen histológico de las construcciones trifásicas mediante microscopía óptica mostró que se había formado una capa continua de tejido NP y estaba fusionada al tejido cartilaginoso subyacente, que a su vez estaba integrado con el CPP poroso. La incorporación de la capa de cartílago fue beneficiosa para la construcción al mejorar la unión del tejido al CPP, como lo demuestra el aumento de la carga máxima y el aumento de la energía requerida para la falla durante la carga de corte en comparación con una construcción bifásica compuesta solo de sustituto óseo de núcleo pulposo. Este estudio demuestra que es posible generar una construcción de múltiples componentes con la incorporación de una capa similar a CEP, lo que da como resultado características mejoradas de la interfaz de sustituto óseo a tejido IVD. (59)

Por otra parte, el factor de crecimiento transformante β , tiene una versátil función en el metabolismo de las células del disco intervertebral, lo que sugiere que la regulación de la señalización de este factor de crecimiento transformante β , tiene importancia en la degeneración del disco intervertebral. (60)

2.2.3 Plasma rico en plaquetas.

Por otra parte, el plasma rico en plaqueta (PRP) contiene gran cantidad de factores de crecimiento y citocinas que puede promover la migración y la proliferación de muchas células, promoviendo un buen microambiente de reparación y regeneración de diferentes tejidos musculoesquelético, Demostrándose en estudios in vitro que en discos intervertebrales en modelos animales, promueven efectivamente la proliferación de células y el metabolismo de matriz extracelular, además en un modelo en conejo puncionando el anillo

fibroso el PRP se encontró que puede inducir la reparación del defecto, afectando la degeneración en discos intervertebrales, sin embargo los efectos del PRP en el disco intervertebral in vivo son todavía escasos.(61)

Los productos liberados de las plaquetas en el PRP están demostrados que estimula el metabolismo celular del disco intervertebral in vitro, pero in vivo permanece desconocido. En un estudio se indujo a degeneración discal en conejos blancos de Nueva Zelanda, recibiendo puntura los discos a estudiar y aplicándose plasma rico en plaqueta y plasma pobre en plaqueta, encontrándose histológicamente que las células parecidas a condrocitos fueron significativamente mayores en los discos inyectados con PRP que en los discos inyectados con plasma pobre en plaqueta, encontrándose que indujo los efectos de reparación en los discos intervertebrales de los conejos. (62)

La activación del plasma rico en plaqueta conduce a la liberación de factores de crecimiento a partir de los gránulos alfa localizados en el citoplasma de las plaquetas, estos se han asociado con el inicio de una cascada de curación, que conduce a la quimiotaxis celular, la angiogénesis, la síntesis de matriz de colágena y la proliferación celular. (63)

En un estudio controlado, aleatorizado, doble ciego, y prospectivo, se determinó si las inyecciones individuales de plasma rico en plaquetas autólogas, inyectado en discos intervertebrales degenerados y sintomáticos mejoran en cuanto el dolor y la función en los participantes: adultos con dolor lumbar discogénico crónico de moderado a grave, que no respondía al tratamiento conservador por 6 meses. Se asignaron al azar para recibir intradiscal PRP o medio de contraste después de la discografía provocativa recogiendo datos sobre el dolor, la función física y la satisfacción de los participantes a 1 semana, 4 semanas, 6 meses y 1 año. Resultando que, a más de 8 semanas de seguimiento, hubo mejorías estadísticamente significativas en los participantes que recibieron PRP intradiscal con respecto al dolor, función y la satisfacción del paciente en

comparación con los controles. No se informaron eventos adversos del espacio del disco como infección, lesión neurológica, o hernia progresiva tras la inyección de PRP. Concluyendo que los que recibieron PRP mantuvieron mejoras significativas a través de al menos 1 año de seguimiento. (64)

El efecto anti-inflamatorio del plasma rico en plaquetas (PRP) con matriz de colágeno en las células del núcleo pulposo humano, en respuesta a citocinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-1 (IL-1), se investigó en células del núcleo pulposo de los discos humanos cultivando en una monocapa y manteniéndose en la matriz de colágeno antes de la adición de IL-1 humana recombinante y TNF- α . La exposición consecutiva de PRP recuperó significativamente la expresión del gen regulador de la baja de colágeno tipo II y de los aggrecan y redujo significativamente el aumento de la expresión del gen MMP-3 y la COX-2 en comparación con el control y las citocinas pro-inflamatorias. La administración de PRP con la matriz de colágeno suprimen marcadamente a las enzimas degradantes pro-inflamatorias inducida por citocinas y mediadores en las células del núcleo pulposo. También se rescató la expresión génica en relación con la síntesis de la matriz, estabilizando de este modo la diferenciación celular del núcleo pulposo. (65)

El plasma rico en plaquetas (PRP) contiene factores de crecimiento y crea una estructura 3D sobre el coágulo, por esto el PRP o lisado de plaquetas es considerado para la reparación del anillo fibroso. Encontrando que preparaciones de plasma rico en plaquetas incrementan la producción de la matriz extracelular y el número de células promoviendo así la reparación del anillo fibroso. (66)

En un ensayo controlado aleatorizado animal, efectuado para analizar los efectos de la inyección de plasma rico en plaquetas en fase temprana y tardía, en y alrededor del disco intervertebral dañado usando un modelo animal,

evaluando la técnica de punción con aguja en la creación de un modelo degenerativo del disco intervertebral. Concluyendo que la técnica de punción con aguja percutánea es un método eficaz para la creación de un modelo degenerativo del disco sin desestabilización posterior de la columna vertebral, y que la administración de PRP tiene un efecto protector sobre los discos dañados en las configuraciones agudas y retardadas de la inyección que representan el tratamiento clínico con PRP del proceso degenerativo en etapas tempranas o tardías. Parece ser que la intervención temprana en el proceso de la enfermedad sería más beneficioso que el tratamiento con PRP en discos ya gravemente degenerados. (67)

2.2.4 Células madre mesenquimales y plasma rico en plaquetas en disco intervertebral.

Un sistema de cultivo de órganos ex vivo del disco intervertebral degenerativo se estableció para el cribado de agentes de regeneración del disco. Su aplicación se demostró mediante un enfoque terapéutico basado en el crecimiento de factor de células madre para mejora del disco intervertebral. Utilizando quimopapaína para digerir parcialmente el tejido del núcleo pulposo imitando la degeneración del disco intervertebral humano. Este sistema fue utilizado para la evaluación de diferentes regímenes terapéuticos que incluyen: células madre mesenquimales derivadas de eGFP-transgénico porcino (MSC-GFP), plasma rico en plaquetas (PRP) y tratamiento con PRP combinado con MSC-GFP, y se confirmó en in vivo en un modelo animal. Productos génicos específicos condrogénico incluyendo Col II y aggrecan se encontraron aumentados y la deposición de matriz condrogénica se incrementó, como es evidente por señales fluorescentes sostenidos de más de 4 semanas, en el grupo implantado MSC-GFP. Anteriormente, hemos demostrado in vitro condrogénesis etapa específica de MSC por el compromiso condrocito. Estas mismas moléculas aumentadas para la condrogénesis también se observaron en el grupo de MSC-GFP. PRP que se ha demostrado promueve al núcleo

pulposo a regeneración produjeron un aumento de niveles significativos de ARNm implicados en la condrogénesis y matrices de acumulación. Los discos intervertebrales in vivo resultaron la regeneración, repitiendo y apoyándose por un sistema in vivo degenerativo porcino. Por otra parte, el índice de la altura del disco fue significativamente mayor tanto in vivo MSC-GFP y PRP grupos de regeneración. Inesperadamente, la terapia de MSC-GFP / PRP combinado demostró una inclinación hacia la osteogénesis en un sistema ex vivo. El sistema de cultivo de disco intervertebral degenerativa ex vivo se describe en este estudio servir como un modelo alternativo y más accesible sobre modelo animal de gran tamaño. Este sistema también proporciona una plataforma de alto rendimiento para el cribado de agentes terapéuticos para la regeneración del disco intervertebral. (68)

Los efectos biológicos de la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) sobre células madre mesenquimales de la médula ósea (BMSC) en ser diferenciadas en células similares a condrocitos en un gel de plasma rico en plaquetas (PRP) in vitro. Además, también se evaluó la eficacia de BMSCs BMP2 transducidas en combinación con gel de PRP para reparar el disco intervertebral degenerado en un modelo de conejo. Estudios anteriores han demostrado que la ingeniería de tejidos proporciona muchas ventajas prometedoras para el tratamiento de la degeneración del disco y puede revertir el proceso patológico de la degeneración del disco. Las expresiones de colágeno tipos I, II y X, aggrecan y Sox9 de las BMSCs BMP2 transducidas en monocapa o gel PRP fueron examinados por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Sesenta conejos blancos de Nueva Zelanda se dividieron en cinco grupos: 12 controles normales; 12 de punción operado solamente con la degeneración del disco siendo inducida; 12 animales con trasplante de PRP, 12 animales con trasplante con BMSC y PRP, 12 animales trasplantados con BMSCs BMP2 y transducidas en PRP. El efecto de BMSCs BMP2 transducidas en discos degenerados fueron evaluados por imagen de resonancia magnética (IRM), histología, inmunohistoquímica y análisis de transferencia Western.

BMP2 podría facilitar la diferenciación condrogénica de BMSCs en monocapa o gel de PRP. Los discos tratados con BMSCs BMP2 transducidas exhibieron relativamente bien conservado la estructura del núcleo pulposos. Significativamente mayor intensidad de la señal en T2 y una mayor cantidad de matriz extracelular se observaron en el grupo de BMSC BMP2 transducidas en comparación con otros grupos. Además, se identificaron las presencias de BMSCs BMP2 transducidas en la semana 12 después de la operación in vivo. BMSCs BMP2 transducidas pueden mantener el fenotipo similar a condrocitos en gel de PRP in vitro, y el uso combinado de estos dos agentes puede promover significativamente la reparación de los discos degenerados in vivo. (69)

La generación de un núcleo pulposos en sustitución biológica por ingeniería de tejidos parece ser un enfoque prometedor para la terapia de las primeras etapas de la degeneración del disco intervertebral. De esta manera, las células madre mesenquimales autólogas (MSC) representan una fuente de células atractivas en comparación con células de la NP que ya están alterados en su fenotipo debido a los procesos degenerativos. Compara la influencia de la cultura pellet 3D y perlas de alginato, así como la de las composiciones de medios diferentes, por la adición de plasma humano rico en plaquetas (PRP) o factor de crecimiento transformante (TGF- β 1) en interacción con la presión hidrostática en condrogénica diferenciación de MSC humanas en comparación con las células NP. Hemos encontrado que la expresión de genes de los marcadores condrogénicos agregano, colágeno tipo 2 y el colágeno tipo 1 y Sox9 fue considerablemente menor en las células cultivadas con PRP en comparación con TGF- β 1. Inmunohistología confirmó este resultado a nivel de proteína en el cultivo de pellets. Además, el sistema de cultivo de sedimento se encontró que era más adecuado que las perlas de alginato. Una influencia positiva de la presión hidrostática solamente se pudo demostrar en los donantes individuales. En resumen, en comparación con el TGF- β 1, PRP humano no indujo la diferenciación condrogénica adecuada para ambos sistemas de cultivo y de

tipos de células utilizadas. La mezcla de factores de crecimiento en PRP promovió la proliferación en vez de diferenciación condrogénica. Basándose en estos resultados, una aplicación de PRP en los enfoques de ingeniería de tejidos humanos del núcleo pulposos no puede ser recomendado. (70)

2.2.5 Condrocitos y plasma rico en plaquetas en disco intervertebral.

Con estos términos se realiza una búsqueda de información resultando solo un artículo relacionado el cual corresponde a: En que la administración de PRP autólogo y sus productos liberado fue eficaz en la restauración de la altura del disco y el aumento de las células condrocíticas en el disco intervertebral en un modelo de la degeneración del disco intervertebral por medio de una punción anular en conejo. Es importante destacar que la PRP y sus productos liberado se preparan a partir de PRP autólogo y que se activa sin necesidad de utilizar productos sanguíneos alogénicos o xenogénicos. Los resultados de este estudio muestran que la aplicación de PRP autólogo y sus productos liberado son eficaz para el tratamiento IVD podría proporcionar información valiosa para la consideración de PRP para una aplicación clínica. (62)

2.3 Originalidad y contribución del proyecto:

La originalidad del presente estudio, se basa en que en la actualidad existen reportes del uso del PRP y de células madre mesenquimales en lesiones del disco intervertebral. Sin embargo, no hay reportes de la aplicación de estas células en combinación con PRP ni tampoco se ha descrito el uso de condrocitos infiltrados al núcleo pulposos de discos intervertebrales lesionados, ya sea en algún medio de transporte o en PRP como vehículo.

Esto último basado en una búsqueda realizada en el PubMed durante el período comprendido entre Noviembre y Diciembre del 2015, seleccionando los últimos 5 años y en texto libre completo, con las siguientes palabras clave:

1. Células madre mesenquimales y plasma rico en plaquetas en disco intervertebral, encontrándose tres artículos relacionados.
2. Condrocitos y plasma rico en plaquetas en disco intervertebral, encontrándose solo un artículo relacionado.

Debido a que contiene factores condrogénicos, consideramos que el PRP actúa como estimulante en la síntesis de matriz extracelular al ser administrado solo, pero al combinarse con CMMs, podría jugar un papel importante en la diferenciación de las CMMs hacia condrocitos. Sin embargo, al no requerir diferenciación, los condrocitos emplearán los factores condrogénicos para la síntesis de matriz extracelular, lo que nos hace suponer, que este último tratamiento será más eficaz que el PRP o las CMMs/PRP infiltrados en los discos intervertebrales dañados obtenidos del modelo animal descrito por Masuda y colaboradores en el 2005. (71)

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo:

La infiltración de condrocitos en combinación con PRP, estimulará una mejor regeneración tisular que los tratamientos basados con PRP o CMMs/PRP, en el modelo animal de lesión de disco intervertebral.

CAPÍTULO IV

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo primario

Analizar el efecto terapéutico del PRP administrado solo o en combinación con condrocitos o CMMs en un modelo animal con lesión del disco intervertebral.

4.2 Objetivos secundarios

1. Reproducir el modelo animal de enfermedad discal en conejos de la raza Nueva Zelanda.
2. Reproducir la técnica para la preparación del PRP e infiltrarlo a los conejos sujetos de estudio.
3. Extraer, cultivar e infiltrar condrocitos en combinación con el PRP en los conejos sujetos a estudio.
4. Extraer, cultivar e infiltrar células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en combinación con el PRP en los conejos sujetos a estudio.
5. Cuantificar mediante PCR en tiempo real, la expresión de proteínas y enzimas catabólicas características de la matriz extracelular.
6. Analizar mediante tinciones histológicas el disco intervertebral enfermo y con los diferentes tratamientos administrados a los conejos sujetos de estudio.

CAPÍTULO V

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño metodológico del estudio:

Estudio comparativo, prospectivo, no ciego, experimental y longitudinal

5.2 Tipo de estudio:

Ensayo Clínico Controlado

5.3 Población de Estudios:

5.3.1 Modelos experimentales

5.3.2 Número de sujetos por incluir y fundamento del cálculo:

Considerando el modelo del estudio propuesto en el presente estudio, se determinó un tamaño de muestra entre los grupos de conejos a estudiar, basándonos en estudios previos determinamos que nuestros grupos estarán conformados de 5 animales en cada grupo en total 15 animales, lo que permitirá un manejo adecuado de los ejemplares sujetos a estudio. Estos grupos se conformarán en animales tratados:

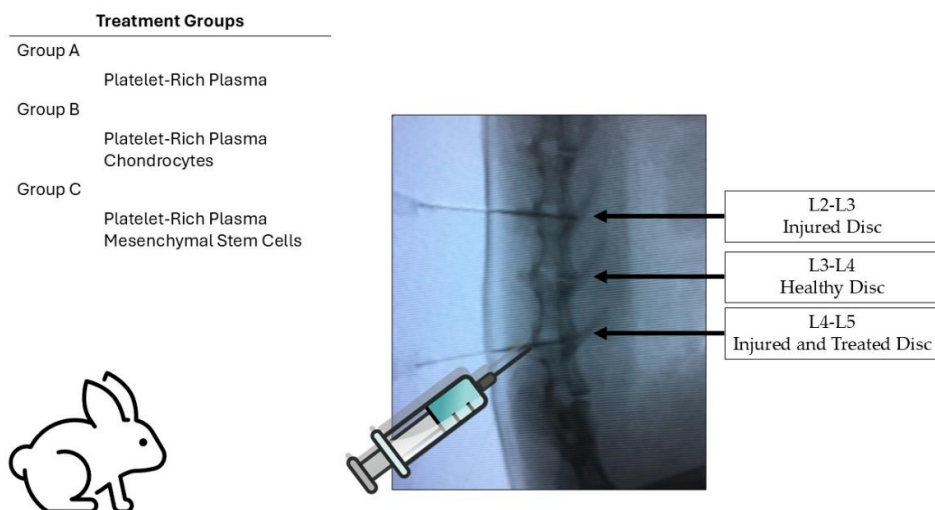
5.3.3 Se formarán los siguientes grupos de estudio:

Grupo tratado con PRP: Conejos que recibirán como tratamiento plasma rico en plaquetas cuatro semanas posteriores a la lesión en L2-L3 y L4-L5.

Conformándose por 5 conejos de la raza Nueva Zelanda, en donde el disco intervertebral L2-L3 lesionado será el control positivo, el disco intervertebral L3-L4 será el control interno sano y el disco intervertebral de L4-L5 será el disco lesionado el cual se infiltrará PRP.

Grupo tratado con células madre: Conejos que recibirán como tratamiento células madre derivadas del tejido adiposo y plasma rico en plaquetas, cuatro semanas posteriores a la lesión de L2-L3 y L4-L5. Conformándose por 5 conejos de la raza Nueva Zelanda, en donde el disco intervertebral L2-L3 lesionado será el control positivo, el disco intervertebral L3-L4 será el control interno sano y el disco intervertebral de L4-L5 será el disco lesionado el cual se infiltrará CMMs más PRP.

Grupo tratado con condrocitos autólogos: Conejos que recibirán como tratamiento condrocitos y plasma rico en plaquetas, cuatro semanas posteriores a la lesión de L2-L3 y L4-L5. Conformándose por 5 conejos de la raza Nueva Zelanda, en donde el disco intervertebral L2-L3 lesionado será el control positivo, el disco intervertebral L3-L4 será el control interno sano y el disco intervertebral de L4-L5 será el disco lesionado el cual se infiltrará Condrocitos más PRP.



Cada grupo de conejos realizara un disco control positivo el cual corresponde al disco intervertebral con lesión a nivel de L2-L3 como grupo control positivo y en el otro disco intervertebral L3-L4 se utilizara como control interno sano y el disco intervertebral se utilizara para realizar la infiltración y/o tratamiento , esto con la finalidad que al finalizar el estudio se valorara en forma comparativa en cada animal los tres discos, el disco intervertebral lesionado control positivo, el control interno sano y el efecto en el otro disco también lesionado e infiltrado ya sea con PRP, PRP y CMMs y PRP y condrocitos autólogos.

Para establecer el tamaño de muestra se consideró un valor de nivel de confianza de 95%.

De Acuerdo a Charan J KHantaria (72):

$$E = \text{Total number of animals} - \text{Total number of groups}$$

Que considera un valor de tamaño de muestra adecuado entre 10 y 20 animales, por tal motivo nuestra muestra fue:

$$E = 5 \times 3 = 15 \text{ animales, justificándose con } E = 15 - 3 = 12 \text{ como una muestra adecuada.}$$

Por lo cual el tamaño de la muestra de cada grupo será 5 animales, de acuerdo a estos los resultados estadísticos esperados tendrán un nivel de significancia.

Utilizando la recomendación del CICUAL para establecer el tamaño de la muestra, en estudios con animales de laboratorio, con el propósito de utilizar el mínimo necesario de animales con el que encontrara una diferencia estadísticamente significativa para el efecto en cada grupo de nuestro estudio.

5.3.4 Características de la población: Estudio experimental en conejos

A.- Criterios de inclusión: Conejos machos de raza Nueva Zelanda con una madurez esquelética que corresponde a 4-5 meses de edad con un peso promedio entre 3-3.5 kg.

B.- Criterios de exclusión:

C.- Criterios de eliminación: Fallecimiento del animal

D.- Lugar de referencia y método de reclutamiento: Bioterio del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UANL.

5.4 Descripción del Diseño

(describir la metodología a realizar para cada uno de los objetivos particulares)

Experimental, longitudinal, comparativo, prospectivo, no cegado.

5.4.1 Objetivo particular

1. Reproducir el modelo animal de enfermedad discal en conejos de la raza Nueva Zelanda.

15 conejos blancos de la raza Nueva Zelanda conejos blancos (4-5 meses de edad y un peso de aproximadamente 3-3,5 kg cada uno) se someterán a punción lumbar de discos. El modelo de la degeneración de disco se establece mediante una aguja para angiografía de calibre 18 por la técnica de punción percutánea anular desarrollada por Masuda y colaboradores.⁷¹ Cada conejo será anestesiado mediante inyección intramuscular de xilazina (5 mg / kg) y ketamina (35 mg / kg), el pelo será afeitado desde el centro de la espalda y el

costado derecho. Después de la anestesia, los conejos se colocarán en una posición pronación oblicua lateral. Se identificará el disco L2-L3 y L4-L5 por palpación manual de la porción del espacio interespinoso y apoyándose con fluoroscopia. Después de la confirmación de la exacta del nivel, se insertará la aguja 18G (angiografía), 3-4 cm ventral de la línea media, en el espacio discal bajo control fluoroscopia.

La correcta colocación de la aguja en el centro del espacio discal se verificará desde puntos de vista tanto anteroposterior y lateral. En cada conejo se puncionará las regiones correspondientes a L2-L3 y L4-L5 IVD. El nivel L3-L4 no será perforado y se utilizará como control interno sano. Se tendrá especial cuidado para minimizar el contacto con el periostio los tejidos de las vértebras, debido a que esto podría causar hipertrofia de los tejidos blandos y las estructuras óseas alrededor de los discos. Se vigilarán a los conejos para determinar si se presentan síntomas neurológicos después de la cirugía.

2. Reproducir la técnica para la preparación del PRP e infiltrarlo a los conejos sujetos de estudio.

Previo sepsia y antisepsia, se obtendrán 3cc de sangre total de la vena auricular del mismo conejo donador de la raza Nueva Zelanda estabulados en el bioterio del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se emplearán aguja de insulina para recolectar la sangre y posteriormente se verterá un tubo vacutainer con citrato de sodio al 3.8% usado como anticoagulante y se invertirán ligeramente los tubos hasta obtener una mezcla homogénea.

Las muestras serán centrifugadas a 2400 rpm por 15 minutos en una centrífuga (Heraeus Megafuge 1.0R de Thermo Electron Corporation) hasta observar 3

capas: 1- Eritrocítica (inferior) 2- Blanca (células) 3- Amarilla (plasma rico y pobre en factores de crecimiento). Con pipetas automáticas Corning de 1000µl se extraerá el PRP (capa amarilla), colocándolo en tubos Falcon de 15 ml, se obtendrá 250 µl del plasma y se agregará 0.05µl gluconato de calcio por mililitro de PRP que se obtenga. Se invertirán las muestras hasta tener una mezcla homogénea y se dejarán incubar por 10 minutos para formar el gel o coágulo de PRP, que será inoculado en el disco L4-L5.

3. Extraer, cultivar e infiltrar condrocitos en combinación con el PRP en los conejos sujetos a estudio.

Se tomarán las biopsias de cartílago de los cóndilos femorales de las rodillas del mismo conejo de la raza Nueva Zelanda estabulados en el bioterio del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para este objetivo se realizará una artrotomía con un abordaje parapatelar lateral, luxando la patela hacia el lado medial. Utilizando una cucharilla quirúrgica, se tomará una muestra de cartílago articular del surco intercondíleo, zona que normalmente no está sometida a carga. La biopsia se transportará en un tubo Falcon de 50 ml que contendrá 30 ml de PBS más gentamicina y anfotericina B, el tubo se protegerá de la luz cubriéndolo con papel aluminio y se procesará en el laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología de la Facultad de Medicina de la UANL, mediante digestiones enzimáticas con colagenasa tipo II durante 60 minutos. Se centrifugará a 1500 rpm por 10 minutos y el botón celular será cultivado empleando como medio de cultivo OptiMem y SBF al 10% más gentamicina 0.05 mg. El cultivo se mantendrá por dos semanas y se prepararán las dosis celulares de 5×10^5 .

Cuatro semanas después de la punción inicial, la degeneración de los discos perforados será identificada por la observación de una disminución del espacio intervertebral utilizando una proyección lateral de rayos X.

Se inocularán 5×10^5 células que serán resuspendidas en 250 μ l de PRP y se inyectarán en la zona de la lesión provocada en los conejos sujetos de estudio, en el disco L4-L5.

4. Extraer, cultivar e infiltrar células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en combinación con el PRP en los conejos sujetos a estudio.

Las células madre mesenquimales serán obtenidas a partir del tejido adiposo procedente del mismo conejo de la raza Nueva Zelanda estabulados en el bioterio del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se disecarán de 4 a 5 gramos de grasa de la zona abdominal y se colocará en un tubo Falcon de 50 ml que contendrá 30 ml de PBS más gentamicina y anfotericina B. Para su transporte, la grasa se mantendrá en un ambiente fresco hasta llegar al laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología de la Facultad de Medicina de la UANL donde será procesada.

La muestra de tejido adiposo con el medio de transporte se manipulará dentro de una campana de flujo laminar, se procederá a macerarla para facilitar el efecto de la collagenasa tipo I. El tejido adiposo se lavará 3 veces con PBS y posteriormente, la muestra se procesará a 37 °C por treinta minutos con collagenasa tipo I al 0.075%. Posteriormente, se centrifugará a 1200 rpm por 10 minutos, descartando luego el sobrenadante para obtener el botón celular. Se decantará el sobrenadante y el botón celular será resuspendido en 10ml de

medio de cultivo Optimem I con 10% suero fetal bovino (SFB) y 0.05 mg de gentamicina, las células se cultivarán por dos semanas. El botón celular obtenido se conoce como fracción estromal vascular (FEV) y se procederá a contar el número de las células viables contenidas para preparar las dosis a inocular, estimada en 5×10^5 .

Cuatro semanas después de la punción inicial, la degeneración de los discos perforados será identificada por la observación de una disminución del espacio intervertebral utilizando una proyección lateral de rayos X.

Se inocularán 5×10^5 células que serán resuspendidos en 250 μ l de PRP y se inyectarán en la zona de la lesión provocada en los conejos sujetos a estudio, en el disco L4-L5.

5. Cuantificar mediante PCR en tiempo real, la expresión de proteínas y enzimas catabólicas características de la matriz extracelular.

Para analizar los cambios en la expresión génica en el tejido del disco, se extraerá el RNA a partir de tres discos (L2-L3, L3-L4, y L4-L5) de cada animal. El disco L3-L4 se utilizará como un control normal no inyectado. Para cada disco, el núcleo pulposo se retirará cuidadosamente desde el anillo fibroso y se almacenarán a -80° C. Se seleccionaron proteínas de la matriz extracelular (agrecano, colágeno II y colágeno I) y una enzima catabólica, la metaloproteasa de matriz-13 (MMP-13), como genes marcadores. El RNA se extraerá utilizando la técnica del Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La expresión génica se analizará por PCR en tiempo real usando un ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Para cada muestra, los niveles de expresión génica serán normalizados utilizando un gen de endógeno expresado constitutivamente, el gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para cuantificar expresión de los genes, se utilizará el método comparativo Ct.

6. Analizar mediante tinciones histológicas el disco intervertebral enfermo y con los diferentes tratamientos administrados a los conejos sujetos de estudio.

Los discos inyectados (L2-L3 y L4-L5) y el control de disco normal (L3-L4) de los conejos serán cortados junto con el cuerpo vertebral adyacente usando una sierra. Los tejidos se fijarán en formalina al 10% durante 48 horas, posteriormente se descalcificará durante 3 días y se procesará para su inclusión en parafina. Se realizarán secciones sagitales de 4 micras de espesor usando un micrótopo. Las secciones serán teñidas con hematoxilina y eosina (H & E) para determinar la forma y el número de los componentes celulares, así como la cantidad de matriz extracelular y después se analizará cuantitativamente con un microscopio óptico. Para cuantificar el grado histológico, se utilizará una escala de calificación previamente establecido en conejos por Masuda y colaboradores.⁷¹ Un observador que no conocerá el experimento a realizar, evaluará las secciones sagitales. La escala se diseñó para evaluar la forma del anillo fibroso, la frontera entre el anillo fibroso y el núcleo pulposo, la celularidad y la matriz del núcleo pulposo. Los grados van desde 4 a 12. A un grado de tejido normal se asignará 1 punto para cada una de las cuatro categorías, para un total de 4 puntos. EL valor máximo para cada parámetro es de 3 puntos para un total de 12 puntos que corresponde a una degeneración severa. Los discos tratados serán comparados con el disco de control normal dentro del mismo animal para evaluar los cambios y serán clasificados numéricamente.

Se realizará la técnica de Safranina O para observar los glucosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular.

5.5 Cálculo del tamaño de muestra:

Para establecer el tamaño de muestra se consideró un valor de nivel de confianza de 95%.

De Acuerdo a Charan J KHantaria (72):

$$E = \text{Total number of animals} - \text{Total number of groups}$$

Que considera un valor de tamaño de muestra adecuado entre 10 y 20 animales, por tal motivo nuestra muestra fue:

$$E = 5 \times 3 = 15 \text{ animales, justificándose con } E = 15 - 3 = 12 \text{ como una muestra adecuada.}$$

Por lo cual el tamaño de la muestra de cada grupo será 5 animales, de acuerdo a estos los resultados estadísticos esperados tendrán un nivel de significancia.

Utilizando la recomendación del CICUAL para establecer el tamaño de la muestra, en estudios con animales de laboratorio, con el propósito de utilizar el mínimo necesario de animales con el que encontrara una diferencia estadísticamente significativa para el efecto en cada grupo de nuestro estudio.

5.6 Definir el evento de interés y diferentes variables:

Para estudios terapéuticos:

1 Criterios de éxito: Regeneración de la lesión como resultado del estímulo de los tratamientos aplicados.

2 Criterios de fracaso: El progreso de la enfermedad discal, no observar signos de regeneración a pesar de los tratamientos aplicados.

5.7 Métodos de evaluación:

5.7.1 Descripción de los métodos principales

Establecimiento de la lesión en el modelo de degeneración de disco.

15 conejos blancos de la raza Nueva Zelanda conejos blancos (4-5 meses de edad y un peso de aproximadamente 3-3,5 kg cada uno) se someterán a punción lumbar de discos. El modelo de la degeneración de disco se establece mediante una aguja para angiografía de calibre 18 por la técnica de punción percutánea anular desarrollada por Masuda y colaboradores.⁷¹ Cada conejo será anestesiado mediante inyección intramuscular de xilazina (5 mg / kg) y ketamina (35 mg / kg), el pelo será afeitado desde el centro de la espalda y el costado derecho. Después de la anestesia, los conejos se colocarán en una posición pronación oblicua lateral. Se identificará el disco L2-L3 y L4-L5 por palpación manual de la porción del espacio interespinoso y apoyándose con fluoroscopia. Después de la confirmación de la exacta del nivel, se insertará la aguja 18G (angiografía), 3-4 cm ventral de la línea media, en el espacio discal bajo control fluoroscopia.

La correcta colocación de la aguja en el centro del espacio discal se verificará desde puntos de vista tanto anteroposterior y lateral. En cada conejo se puncionará las regiones correspondientes a L2-L3 y L4-L5 IVD. El nivel L3-L4 no será perforado y se utilizará como control interno sano. Se tendrá especial cuidado para minimizar el contacto con el periostio los tejidos de las vértebras, debido a que esto podría causar hipertrofia de los tejidos blandos y las estructuras óseas alrededor de los discos. Se vigilarán a los conejos para determinar si se presentan síntomas neurológicos después de la cirugía.

Obtención de las células madre mesenquimales.

Las células madre mesenquimales serán obtenidas a partir del tejido adiposo procedente del mismo conejo de la raza Nueva Zelanda establecidos en el

bioterio del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se disecarán de 4 a 5 gramos de grasa de la zona abdominal y se colocará en un tubo Falcon de 50 ml que contendrá 30 ml de PBS más gentamicina y anfotericina B. Para su transporte, la grasa se mantendrá en un ambiente fresco hasta llegar al laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología de la Facultad de Medicina de la UANL donde será procesada.

La muestra de tejido adiposo con el medio de transporte se manipulará dentro de una campana de flujo laminar, se procederá a macerarla para facilitar el efecto de la collagenasa tipo I. El tejido adiposo se lavará 3 veces con PBS y posteriormente, la muestra se procesará a 37 °C por treinta minutos con collagenasa tipo I al 0.075%. Posteriormente, se centrifugará a 1200 rpm por 10 minutos, descartando luego el sobrenadante para obtener el botón celular. Se decantará el sobrenadante y el botón celular será resuspendido en 10ml de medio de cultivo Optimem I con 10% suero fetal bovino (SFB) y 0.05 mg de gentamicina, las células se cultivarán por dos semanas. El botón celular obtenido se conoce como fracción estromal vascular (FEV) y se procederá a contar el número de las células viables contenidas para preparar las dosis a inocular, estimada en 5×10^5 .

Cuatro semanas después de la punción inicial, la degeneración de los discos perforados será identificada por la observación de una disminución del espacio intervertebral utilizando una proyección lateral de rayos X.

Se inocularán 5×10^5 células que serán resuspendidos en 250 µl de PRP y se inyectarán en la zona de la lesión provocada en los conejos sujetos a estudio, en el disco L4-L5.

Obtención de los condrocitos.

Se tomarán las biopsias de cartílago de los cóndilos femorales de las rodillas del mismo conejo de la raza Nueva Zelanda estabulados en el bioterio del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para este objetivo se realizará una artrotomía con un abordaje parapatelar lateral, luxando la patela hacia el lado medial. Utilizando una cucharilla quirúrgica, se tomará una muestra de cartílago articular del surco intercondíleo, zona que normalmente no está sometida a carga. La biopsia se transportará en un tubo Falcon de 50 ml que contendrá 30 ml de PBS más gentamicina y anfotericina B, el tubo se protegerá de la luz cubriéndolo con papel aluminio y se procesará en el laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología de la Facultad de Medicina de la UANL, mediante digestiones enzimáticas con colagenasa tipo II durante 60 minutos. Se centrifugará a 1500 rpm por 10 minutos y el botón celular será cultivado empleando como medio de cultivo Optimem y SBF al 10% más gentamicina 0.05 mg. El cultivo se mantendrá por dos semanas y se prepararán las dosis celulares de 5×10^5 .

Cuatro semanas después de la punción inicial, la degeneración de los discos perforados será identificada por la observación de una disminución del espacio intervertebral utilizando una proyección lateral de rayos X.

Se inocularán 5×10^5 células que serán resuspendidas en 250 μ l de PRP y se inyectarán en la zona de la lesión provocada en los conejos sujetos de estudio, en el disco L4-L5.

Preparación del Plasma Rico en Plaquetas.

Previa sepsia y antisepsia, se obtendrán 3cc de sangre total de la vena auricular del mismo conejo donador de la raza Nueva Zelanda estabulados en el bioterio del departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se emplearán aguja de insulina para recolectar la sangre y posteriormente se verterá un tubo vacutainer con citrato de sodio al 3.8% usado como anticoagulante y se invertirán ligeramente los tubos hasta obtener una mezcla homogénea.

Las muestras serán centrifugadas a 2400 rpm por 15 minutos en una centrífuga (Heraeus Megafuge 1.0R de Thermo Electron Corporation) hasta observar 3 capas: 1- Eritrocítica (inferior) 2- Blanca (células) 3- Amarilla (plasma rico y pobre en factores de crecimiento). Con pipetas automáticas Corning de 1000µl se extraerá el PRP (capa amarilla), colocándolo en tubos Falcon de 15 ml, se obtendrá 250 µl del plasma y se agregará 0.05µl gluconato de calcio por mililitro de PRP que se obtenga. Se invertirán las muestras hasta tener una mezcla homogénea y se dejarán incubar por 10 minutos para formar el gel o coágulo de PRP, que será inoculado en el disco L4-L5.

Previa sepsia y antisepsia, se obtendrán 3cc de sangre total de la vena auricular de conejos Nueva Zelanda sujetos a estudio, se emplearán agujas con dispensador vacutainer bañado con citrato de sodio al 3.8% usado como anticoagulante y se invertirán ligeramente los tubos hasta que se obtener una mezcla homogénea.

Las muestras Serán centrifugadas a 2400 rpm por 15 minutos en una centrífuga (Heraeus Megafuge 1.0R de Thermo Electron Corporation) hasta observar 3 capas: 1- Eritrocítica (inferior) 2- Blanca (células) 3- Amarilla (plasma rico y pobre en factores de crecimiento). Con pipetas automáticas Corning de 1000µl se extraerá el PRP (capa amarilla), colocándolo en tubos Falcon de 15 ml, con

este plasma, se resuspenderá el botón celular que se obtendrá del cultivo celular previamente establecido (células madre y condrocitos) y se agregará 0.05µl gluconato de calcio por mililitro de PRP que se obtenga. Se invertirán las muestras hasta tener una mezcla homogénea y se dejarán incubar por 10 minutos para formar el gel o coágulo de PRP, que será inoculado.

Inoculación de la fracción estromal vascular.

Cuatro semanas después de la punción inicial, la degeneración de los discos perforados será identificada por la observación de una disminución del espacio intervertebral utilizando una proyección lateral de rayos X.

Se inocularán 5×10^5 células que serán resuspendidos en 250 µl de PRP y se inyectarán en la zona de la lesión provocada en los conejos sujetos a estudio, en los niveles L4-L5.

Inoculación de los condrocitos.

Cuatro semanas después de la punción inicial, la degeneración de los discos perforados será identificada por la observación de una disminución del espacio intervertebral utilizando una proyección lateral de rayos X.

Se inocularán 5×10^5 células que serán resuspendidos en 250 µl de PRP y se inyectarán en la zona de la lesión provocada en los conejos sujetos a estudio, en los niveles L4-L5.

Análisis bioquímico.

Para analizar los cambios en la expresión génica en el tejido del disco, se extraerá el RNA a partir de tres discos (L2-L3, L3-L4, y L4-L5) de cada animal. El disco L3-L4 se utilizará como un control normal no inyectado. Para cada

disco, el núcleo pulposo se retirará cuidadosamente desde el anillo fibroso y se almacenarán a -80 ° C. Se realizará la reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa en tiempo real (RT-PCR). Se seleccionaron proteínas de la matriz extracelular (agrecano, colágeno II y colágeno I) y una enzima catabólica, la metaloproteasa de matriz-13 (MMP-13), como genes marcadores.

El RNA se extraerá utilizando la técnica del Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). La expresión génica se analizará por RT-PCR en tiempo real usando un ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Para cada muestra, los niveles de expresión génica serán normalizados utilizando un gen de endógeno expresado constitutivamente, el gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para cuantificar expresión de los genes, se utilizará el método comparativo Ct.

Análisis histopatológico

Los discos inyectados (L2-L3 y L4-L5) y el control de disco normal (L3-L4) de los conejos serán cortados junto con el cuerpo vertebral adyacente usando una sierra. Los tejidos se fijarán en formalina al 10% durante 48 horas, posteriormente se descalcificará durante 3 días y se procesará para su inclusión en parafina. Se realizarán secciones sagitales de 4 micras de espesor usando un micrótopo. Las secciones serán teñidas con hematoxilina y eosina (H & E) para determinar la forma y el número de los componentes celulares, así como la cantidad de matriz extracelular y después se analizará cuantitativamente con un microscopio óptico. Para cuantificar el grado histológico, se utilizará una escala de calificación previamente establecido en conejos por Masuda y colaboradores.⁹

Un observador que no conocerá el experimento a realizar, evaluará las secciones sagitales. La escala se diseñó para evaluar la forma del anillo fibroso, la frontera entre el anillo fibroso y el núcleo pulposo, la celularidad y la matriz del núcleo pulposo. Los grados van desde 4 a 12. A un grado de tejido normal

se asignará 1 punto para cada una de las cuatro categorías, para un total de 4 puntos. EL valor máximo para cada parámetro es de 3 puntos para un total de 12 puntos que corresponde a una degeneración severa. Los discos tratados serán comparados con el disco de control normal dentro del mismo animal para evaluar los cambios y serán clasificados numéricamente.

Se realizará la técnica de Safranina O para observar los glucosaminoglicanos presentes en la matriz extracelular.

Síntesis de ADNc

Una alícuota de 500 ng de ARN se trató con DNasa I (incluida en el kit RecoverAll™) y se transcribió de forma inversa en una reacción de 20 µL utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Thermo Fisher Scientific) en las siguientes condiciones: 10 min a 25 °C, 120 min a 37 °C y 5 min a 85 °C.

PCR cuantitativa en tiempo real

Las reacciones se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) utilizando la mezcla maestra PowerUp™ SYBR™ Green (Thermo Fisher Scientific). Cada mezcla de reacción de 20 µL contenía 10 µL de Master Mix, 0,5 µM de cada cebador y 2 µL de una dilución 1:10 de ADNc. Los parámetros de termociclado fueron 95 °C durante 2 min; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 60 s; seguido de un análisis de la curva de fusión de 60 °C a 95 °C. Los cebadores se adoptaron de Huang et al. [32]: para COL2A1, el cebador directo fue 5'-GGGTCCTTTGGCTGTTTCAGA-3' y el cebador inverso fue 5'-TTCTCCCCAGAAACACACCG-3'; Para COL10A1, el cebador directo fue 5'-GGCTTCCCAGTGGCTGATAG-3' y el cebador inverso fue 5'-TTTTGCTCTCTCTGGGTGGC-3'.

Se utilizó β -actina como control endógeno, con el cebador directo 5'-AGACCACCTTCAACTCGATCAT-3' y el cebador inverso 5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3'. Cada muestra se analizó por triplicado técnico y la especificidad se confirmó mediante un único pico en la curva de fusión y la ausencia de dímeros de cebador. Los valores del umbral de ciclo (Ct) se obtuvieron mediante el software QuantStudio 5. La expresión relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizado a β -actina, y utilizando el control de lesión (L2-L3) de cada animal para la calibración. Los datos se presentan como media $\pm$ DE (n = 5). Los análisis estadísticos se realizaron con IBM SPSS Statistics para Windows, versión 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.), incluyendo ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Tukey (p < 0,05).

Reproducibilidad

Se aplicará la misma dosis celular en el mismo tipo de lesión y disco intervertebral.

Variabilidad inter ensayo

Se cuantificará la expresión de genes de proteínas relacionadas a la matriz extracelular, así como de enzimas relacionadas con la destrucción celular.

Método nuevo o ya establecido

Método de experimentación nuevo.

Frecuencia de las evaluaciones

Los animales serán sacrificados a las 12 semanas post tratamiento y se procederá a realizar las evaluaciones correspondientes.

Evaluaciones cegadas o no cegadas

Análisis de expresión de genes no segado. Análisis histológico cegado.

5.8 Análisis estadístico:

Para variables paramétricas, se utilizará la prueba de t de student, mientras que para variables no paramétricas utilizaremos la prueba de chi cuadrada.

5.9 Actividades del estudiante de Doctorado en la realización de este trabajo de Investigación:

- a) Generación de la lesión en los discos intervertebrales.
- b) Monitoreo de los animales sujetos a estudio.
- c) Toma de biopsias de cartílago y tejido adiposo.
- d) Inoculación de las dosis celulares.
- e) Revisión de literatura actualizada.
- f) Escritura de tesis.
- g) Escritura de un artículo científico.

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

Se estudiaron 15 Conejos blancos machos de raza Nueva Zelanda con una madurez esquelética que corresponde a 4-5 meses de edad con un peso promedió entre 3-3.5 kg, puncionándose el disco de L2-L3 y L4-L5 de cada conejo, permaneciendo como control sano el de L3-L4, con la técnica de punción percutánea anular desarrollada por Masuda y col.¹⁵ esto se realiza bajo control fluoroscopio con la introducción de la aguja calibre 18 al centro de los disco de L2-L3 y L4-L5 dejándose evolucionar la lesión de los discos postpuncionados, por el termino de 8 semanas, posterior a este periodo se realiza la infiltración bajo punción directa realizando una incisión de 1 cm de lumbotomía en cada conejo para infiltrar el disco de L4-L5 previamente lesionado, basándose en los tres grupos de trabajo que son Plasma rico en plaqueta PRP, plasma rico en plaqueta más células madres mesénquimas PRP+CMMs y Plasma rico en plaquetas más condrocitos PRP+Condrocitos y se conservan posterior a infiltración por un término de 8 semanas para posterior ser sacrificados y realizando el retiro de la columna lumbar de cada conejo tomando en bloque un disco sano superior e inferior (L1-L2 disco límite superior L2-L3 Lesionado, L3-L4 Sano, L4-L5 Lesionado y Tratado, L5-S1 disco límite inferior) conservando y transportándose, en frascos de vidrio con tapa rosca de plástico y suspendidos en solución paraformaldehído al 4%, para posterior trabajar en laboratorio de CIDICS en la Unidad de Terapias Experimentales, se realiza la descalcificación de cada uno de los bloques tomando en cuenta los tres grupos (PRP, PRP+CMMs, PRP+Condrocitos) realizándose la descalcificación por grupos separados, la muestra se incubaron durante 15 días a 37 grados y en agitación bajo la técnica (pendiente), posterior se realizan piezas del bloque anatómico de cada disco a estudiar (L2-

L3, L3-L4,L4-L5) tomándose una pieza de 3 mm de hueso el disco en todo su espesor trasversal para colocarse en un cassette y suspenderse en parafina y realizar los cortes con micrótopo (pendiente el tipo) realizando cortes histológicos de 5 micras del centro del bloque en parafina para posterior colocación en laminillas y realizando tinciones de Hematoxilina-eosina para su estudio histológico en el departamento de histología de la facultad de medicina UANL a visión de 4x, 10x y 40x realizándose la descripción de los Hallazgos histológicos y sometiéndose a la escala de clasificación histológicos utilizada en el estudio de Masuda y col.¹⁵ describiendo el grado del anillo fibroso, límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposo grado, celularidad del núcleo pulposo grado y matriz del núcleo pulposo, realizándose a cada disco, tipo de disco (L2-L3 Lesionado, L3-L4 Sano, L4-L5 Lesionado y Tratado) y por grupos separados, esta escala de clasificación histológica, basada en 4 categorías de cambios degenerativos con puntajes que van desde un disco normal con 4 puntos (1 punto en cada categoría) hasta un disco severamente degenerado con 12 puntos (3 puntos en cada categoría), para medir el grado de degeneración del disco L2-L3 lesionado y el grado de sano del disco L3-L4 como control sano y el grado de recuperación de proceso degenerativo establecido por la lesión y posterior tratado en los tres grupos (PRP, PRP+CMMs, PRP+Condrocitos) y estudiados por grupos.

Escala de clasificación histológica.
I. Grado del anillo fibroso: 1. Patrón normal de láminas de fibrocartilago (en forma de U en la cara posterior y ligeramente convexa en la cara anterior) sin fibras rotas y sin aspecto serpentino en ninguna parte del anillo 2. Fibras rotas o serpenteadas en menos del 30% del anillo 3. Fibras rotas o serpenteadas en más del 30% del anillo
II. Límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposo Grado: 1. normales 2. Mínimamente interrumpido 3. Interrupción moderada/grave
III. Celularidad del núcleo pulposo Grado: 1. Celularidad normal con grandes vacuolas en la estructura gelatinosa de la matriz 2. Ligera disminución en el número de células y menos vacuolas. 3. Disminución moderada/grave (50%) del número de células y sin vacuolas.
IV. Matriz del núcleo pulposo: Calificación: 1. Aspecto gelatinoso normal 2. Ligera condensación de la matriz extracelular 3. Condensación moderada/grave de la matriz extracelular
Escala de clasificación histológica basada en 4 categorías de cambios degenerativos con puntajes que van desde un disco normal con 4 puntos (1 punto en cada categoría) hasta un disco severamente degenerado con 12 puntos (3 puntos en cada categoría).

6.1 GRUPO A PRP

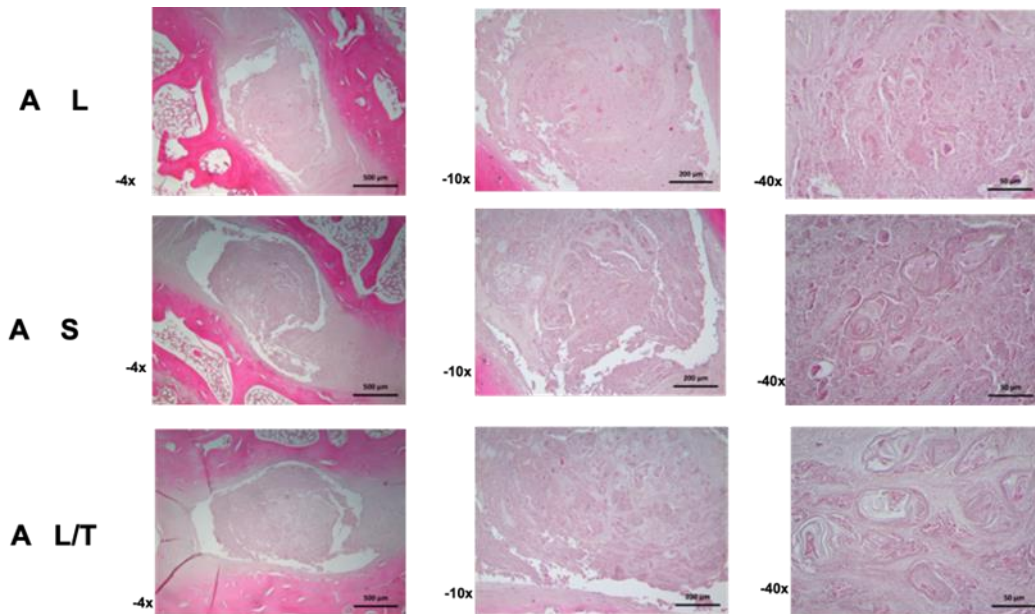


Figura 1. Comparación histológica de discos intervertebrales en el Grupo A tratados con PRP.

De izquierda a derecha y de arriba abajo: Discos L2-L3 lesionados (4x, 10x), donde el anillo fibroso varía en espesor y el núcleo pulposo presenta una matriz extracelular mixta; a 40x, se destacan las irregularidades celulares, con algunos fenotipos condroides y otros en proceso atrófico o necrótico. Discos L3-L4 sanos (4x, 10x), con haces de colágeno bien alineados en el anillo fibroso y una matriz amorfa en el núcleo pulposo, con células de tamaño irregular; a 40x, se observan lagunas cartilaginosas hipertróficas con células hipercromáticas, rodeadas de material granular fino. Discos L4-L5 lesionados y tratados con PRP (4x, 10x), presentan un anillo fibroso de estructura normal y núcleo pulposo rico en nidos celulares; a 40x, se aprecian estas estructuras celulares rodeadas por una matriz extracelular heterogénea. (L: Lesionado, S: Sano, L/T: Lesionado y Tratado) Tinción H&E.

	L2-3 Disco lesionado					L3-4 Disco sano					L4-5 Disco lesionado y riado				
	A11	A21	A31	A41	A51	A12	A22	A32	A42	A52	A13	A23	A33	A43	A53
I. Grado del anillo fibroso:															
1. Patrón normal de láminas de fibrocartilago en forma de U en la cara posterior y ligamento con las caras anteriores en láminas rotas y sin aspecto serpenteado en ninguna parte del anillo						1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2. Fibras rotas o serpenteadas en menos del 30% del anillo	2			2	2										
3. Fibras rotas o serpenteadas en más del 30% del anillo		3	3												
II. Límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposos															
Grado:	A11	A21	A31	A41	A51	A12	A22	A32	A42	A52	A13	A23	A33	A43	A53
1. Normales						1				1	1	1			
2. Mínimamente interrumpido	2			2	2		2	2	2				2	2	2
3. Interrupción moderada/grave		3	3												
III. Calidad del núcleo pulposos	A11	A21	A31	A41	A51	A12	A22	A32	A42	A52	A13	A23	A33	A43	A53
1. Calidad normal con grandes vacuolas en la sustancia gelatinosa de la matriz						1	1	1	1	1				1	1
2. Línea discontinua en el número de láminas y menos vacuolas		2		2							2				
3. Discontinua moderada/grave (50%) de número de láminas y sin vacuolas		3	3		3							3	3		
IV. Matriz del núcleo pulposos:	A11	A21	A31	A41	A51	A12	A22	A32	A42	A52	A13	A23	A33	A43	A53
1. Aspecto gelatinoso normal						1	1	1	1	1					
2. Línea condensación de la matriz extracelular				2	2							2	2		2
3. Condensación moderada/grave de la matriz extracelular	3	3	3								3			3	
	10	11	12	8	9	4	5	5	4	4	7	8	8	7	6

Grupo A que corresponde a PRP, plasma rico en plaquetas.

6.1.1 El disco de L2-L3 lesionado bajo punción dirigida por fluoroscopia, sometido a desarrollar el proceso degenerativo, de acuerdo con la escala de clasificación histológica determinándose las categorías:

I.- que corresponde al grado del anillo fibroso, predominio en **tres discos** el **patrón 2.** de fibras rotas o serpenteadas en menos del 30 % del anillo y en **dos discos** predominio el **patrón 3.** de fibras rotas o serpenteadas en más del 30 % del anillo.

II.- que corresponde al límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposos grado, se presentó en **3 discos** el **grado 2.** que corresponde a mínimamente interrumpido y en **2 discos** el **grado 3.** que corresponde a interrupción moderada/grave.

III.- que corresponde a la celularidad del núcleo pulpos grado, se presentó en 2 discos el grado 2. que corresponde a ligera disminución en el número de células y menos vacuolas y en **3 discos el grado 3**. que corresponde a disminución moderada/grave (50 %) del número de células y sin vacuolas.

IV.- que corresponde a la matriz del núcleo pulpos clasificación, se presentó en **2 discos la clasificación 2**. Que corresponde a ligera condensación de la matriz extracelular y en **3 discos la clasificación 3**. Que corresponde a condensación moderada/grave de la matriz extracelular.

Determinando que la intervención desarrolló un **grado importante de degeneración** de los discos del **Grupo A 1 L2-L3 L**, encontrándose una suma muy variable, correspondiendo en **un disco 12 puntos** (3 puntos en las 4 categoría) correspondiendo a un disco severamente degenerado, **otro disco 11** (3 puntos en 3 categorías I,II,IV y 2 puntos en 1 categoría III) **otro disco 10** (3 puntos en 2 categoría III,IV y 2 puntos en 2 categorías I,II) **otro disco 9** (3 puntos en 1 categoría III y 2 puntos en 3 categorías I,II,IV) y **otro disco 8** (2 puntos en las 4 categorías I,II,III,IV).

6.1.2 El disco de L3-L4 sano, conservándose como control no puncionado, de acuerdo con la escala de clasificación histológica determinando por categorías:

I.- que corresponde al grado del anillo fibroso, predominio en los **5 discos el patrón 1**. Que corresponde al patrón normal de láminas de fibrocartílago (en forma U en la cara posterior y ligeramente convexa en la cara anterior) sin fibras rotas y sin aspecto serpentino en ninguna parte del anillo.

II.- que corresponde al límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulpos grado, se presentó en **3 discos el grado 1**. que corresponde grado normal y en **2 discos el grado 2**. que corresponde a mínimamente interrumpido.

III.- que corresponde a la celularidad del núcleo pulposo grado, se presentó en los **5 discos el grado 1**. que corresponde a celularidad normal con grandes vacuolas en la estructura gelatinosa de la matriz.

IV.- que corresponde a la matriz del núcleo pulposo clasificación, se presentó en los **5 discos la clasificación 1**. Que corresponde al aspecto gelatinoso normal.

Determinando que el disco sin intervención **mantuvo características normales** en los discos del **Grupo A 2 S**, encontrándose una suma muy constante, correspondiendo en **3 disco 4 puntos** (1 puntos en las 4 categoría) correspondiendo a un disco normal, otros **2 discos 5 puntos** (1 puntos en 3 categorías I, III, IV y 2 puntos en 1 categoría II).

6.1.3 El disco de L4-L5 disco lesionado/ tratado, que corresponde al disco que se puncionó y a las 8 semanas se infiltró con PRP y a las 8 semanas se obtiene la pieza para su estudio histológico, de acuerdo con la escala de clasificación histológica determinando por categorías:

I.- que corresponde al grado del anillo fibroso, predominio en los **5 discos el patrón 1**. que corresponde al patrón normal de láminas de fibrocartílago (en forma U en la cara posterior y ligeramente convexa en la cara anterior) sin fibras rotas y sin aspecto serpentino en ninguna parte del anillo.

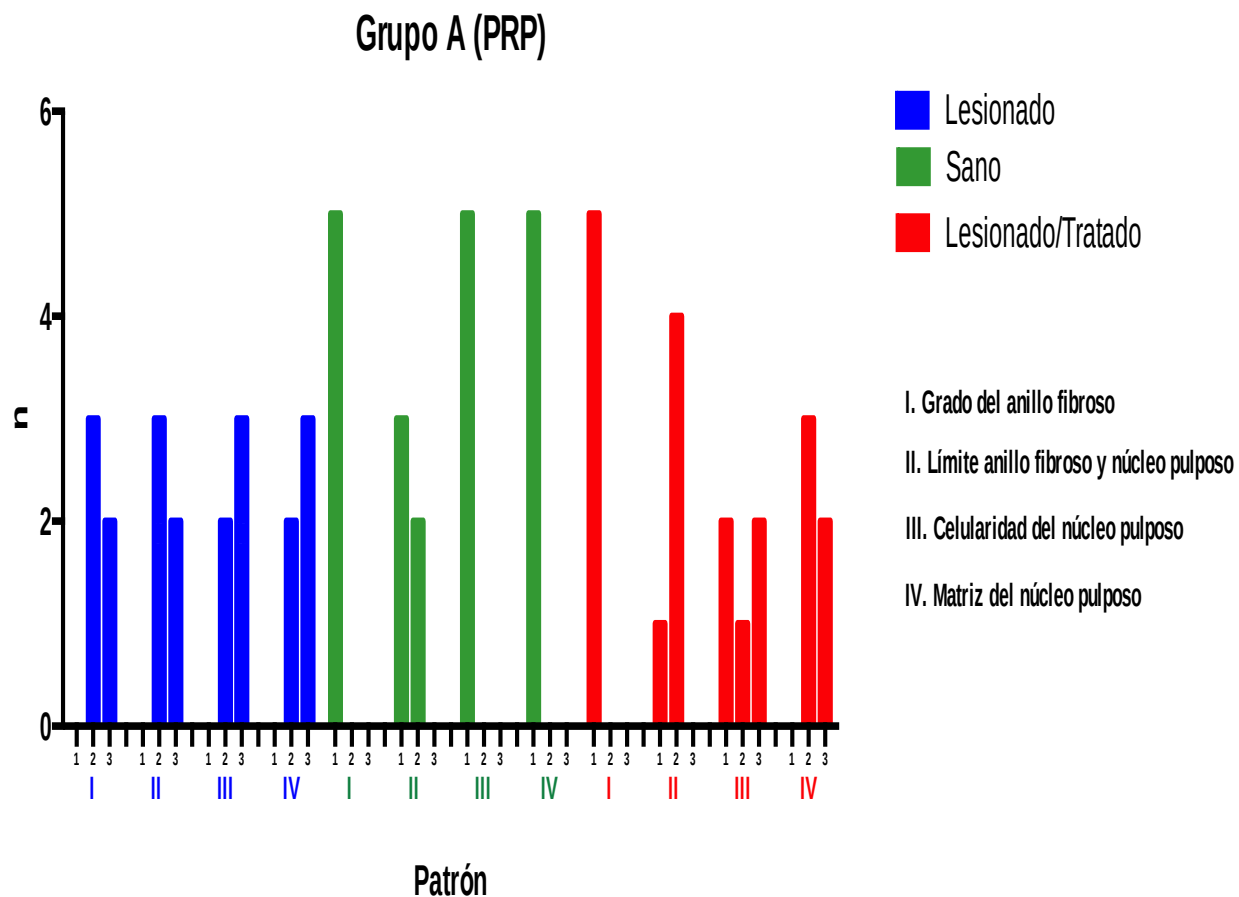
II.- que corresponde al límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposo grado, se presentó en **1 disco el grado 1**. que corresponde grado normal y en **4 discos el grado 2**. que corresponde a mínimamente interrumpido.

III.- que corresponde a la celularidad del núcleo pulposo grado, se presentó en los **2 discos el grado 1**. que corresponde a celularidad normal con grandes vacuolas en la estructura gelatinosa de la matriz y en **1 disco el grado 2**. que

corresponde a mínimamente interrumpido y **2 discos el grado 3.** que corresponde a disminución moderada/grave (50 %) del número de células y sin vacuolas.

IV.- que corresponde a la matriz del núcleo pulposo clasificación, se presentó en los **3 discos la clasificación 2.** que corresponde a ligera condensación de la matriz extracelular y **2 discos el grado 3** que corresponde a condensación moderada/grave de la matriz extracelular.

Determinando que el disco lesionado/tratado con intervención e infiltrado con PRP mantuvo característica muy **variables tendiendo a conservar características de proceso degenerativo** en los discos del **Grupo A 3 L/T** encontrándose una suma muy constante, correspondiendo en **1 disco 6 puntos** (1 puntos en 2 categoría I,III y 2 puntos en 2 categorías II,IV), otros **2 discos 7 puntos** (1 disco 1 puntos en 2 categorías I,III y 2 puntos en 1 categoría II y 3 en 1 categoría IV y 1 disco 1 punto en 2 categoría I,II y 2 puntos en 1 categoría III y 3 puntos en 1 categoría IV) en el **2 disco** (1 punto en 1 categorías I y 2 puntos en 2 categorías II,IV y 3 puntos en 1 categoría III), encontrándose pobre efecto regenerativo en esta intervención.



Grafica 1 L2-L3 L una degeneración moderada a severa con una puntuación que va 8 – 12 puntos. **L3-L4 S** conservó características normales con un puntaje de 4 en todo estado normal. **L4-L5 L/T** mejoría respecto con el disco L/no T, pero sin alcanzar la normalidad del tejido discal con puntuación entre 6-7 puntos.

6.2 GRUPO B PRP/ CONDROCITOS

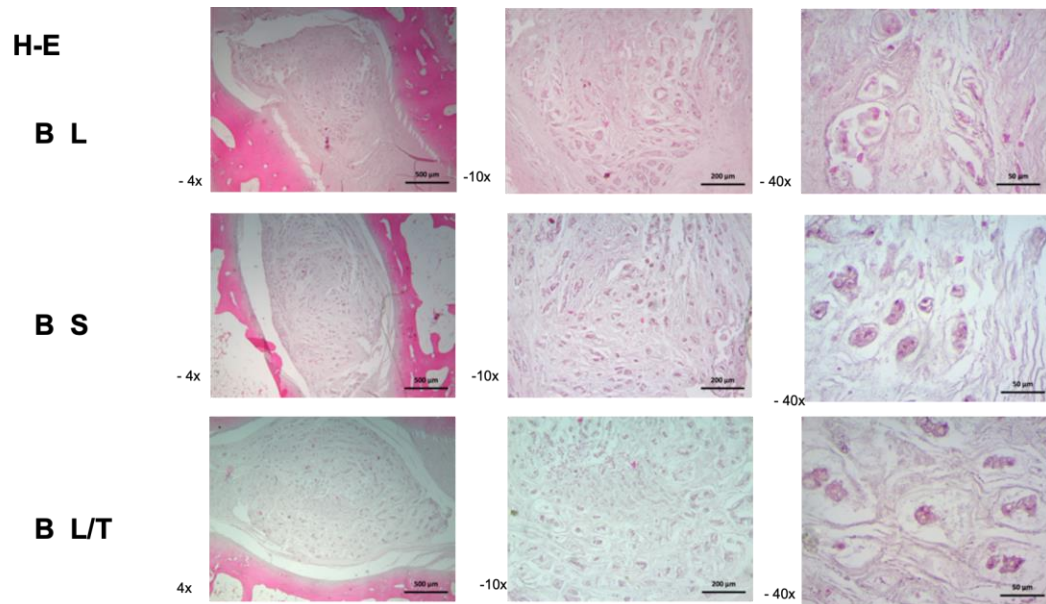


Figura 2. Evaluación histológica de discos intervertebrales del Grupo B. Las imágenes capturan la arquitectura del tejido en diferentes grados de aumento (4x, 10x, 40x), resaltando la diversidad en la morfología y estructura celular tanto en los discos lesionados como en los sanos y aquellos tratados con PRP y condrocitos. Se observan variaciones en la integridad del anillo fibroso, irregularidades en las lagunas cartilaginosas y alteraciones en la matriz extracelular, evidenciando los efectos combinados de la lesión y el tratamiento subsiguiente. (L: Lesionado, S: Sano, L/T: Lesionado y Tratado) Tinción H&E.

	L2-L3 Disco lesionado					L3-L4 Disco sano					L4-L5 Disco lesionado y tratado				
I. Grado del anillo fibroso:	B1.1	B2.1	B3.1	B4.1	B5.1	B1.2	B2.2	B3.2	B4.2	B5.2	B1.3	B2.3	B3.3	B4.3	B5.3
1. Patrón normal de fibras se fibrocartilago (en forma de U en la cara posterior y ligeramente convexa en la cara anterior) sin fibras rotas y sin aspecto serpenteo en ninguna parte del anillo						1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2. Fibras rotas o serpenteadas en menos del 30% del anillo			2												
3. Fibras rotas o serpenteadas en más del 30% del anillo		3		3	3	3									
II. Límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposo Grado:	B1.1	B2.1	B3.1	B4.1	B5.1	B1.2	B2.2	B3.2	B4.2	B5.2	B1.3	B2.3	B3.3	B4.3	B5.3
1. normales									1	1	1	1			1
2. Mínimamente remojado				2		2	2	2	2				2	2	
3. Interrupción moderada grave	3	3			3										
III. Celularidad del núcleo pulposo Grado:	B1.1	B2.1	B3.1	B4.1	B5.1	B1.2	B2.2	B3.2	B4.2	B5.2	B1.3	B2.3	B3.3	B4.3	B5.3
1. Celularidad normal con grandes vacuolas en la estructura gelatinosa de la matriz						1	1		1	1					
2. Ligera disminución en el número de células y menos vacuolas		2	2		2			2			2	2	2	2	2
3. Disminución moderada grave (50%) del número de células y sin vacuolas				3		3									
IV. Matriz del núcleo pulposo:	B1.1	B2.1	B3.1	B4.1	B5.1	B1.2	B2.2	B3.2	B4.2	B5.2	B1.3	B2.3	B3.3	B4.3	B5.3
1. Aspecto gelatinoso normal						1	1	1	1	1					
2. Ligera condensación de la matriz extracelular											2	2	2	2	2
3. Condensación moderada grave de la matriz extracelular	3	3	3	3	3										
	11	10	11	11	11	5	5	6	4	4	6	6	7	7	6

Grupo B que corresponde a PRP+Condrocitos, plasma rico en plaquetas con condrocitos.

6.2.1 El disco de L2-L3 disco lesionado bajo punción dirigida por fluoroscopia, sometido a desarrollar el proceso degenerativo, de acuerdo con la escala de clasificación histológica determinándose las categorías:

I.- que corresponde al grado del anillo fibroso, predominio en 1 disco el patrón 2. de fibras rotas o serpenteadas en menos del 30 % del anillo y en **4 discos predominio el patrón 3.** de fibras rotas o serpenteadas en más del 30 % del anillo.

II.- que corresponde al límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulpos grado, se presentó en **2 discos el grado 2.** que corresponde a mínimamente

interrumpido y en **3 discos el grado 3.** que corresponde a interrupción moderada/grave.

III.- que corresponde a la celularidad del núcleo pulposo grado, se presentó en **3 discos el grado 2.** que corresponde a ligera disminución en el número de células y menos vacuolas y en **2 discos el grado 3.** que corresponde a disminución moderada/grave (50 %) del número de células y sin vacuolas.

IV.- que corresponde a la matriz del núcleo pulposo clasificación, se presentó en los **5 discos la clasificación 3.** Que corresponde a condensación moderada/grave de la matriz extracelular.

Determinando que la intervención desarrolló un **grado importante de degeneración** de los discos del Grupo B 1 L encontrándose una suma muy constante, correspondiendo a **4 disco 11 puntos** (2 discos 3 puntos en 3 categoría I,II,IV y 2 puntos en 1 categoría III y 2 discos 3 puntos en 3 categorías I,III,IV y 2 puntos en 1 categoría II), y **1 disco 10** (3 puntos en 2 categorías II,IV y 2 puntos en 2 categoría I,III) correspondiendo a uno **discos severamente degenerados.**

6.2.2 El disco de L3-L4 disco sano, conservándose como control no puncionado, de acuerdo con la escala de clasificación histológica determinando por categorías:

I.- que corresponde al grado del anillo fibroso, predominio en los **5 discos el patrón 1.** Que corresponde al patrón normal de láminas de fibrocartílago (en forma U en la cara posterior y ligeramente convexa en la cara anterior) sin fibras rotas y sin aspecto serpentino en ninguna parte del anillo.

II.- que corresponde al límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposos grado, se presentó en **1 disco el grado 1**. que corresponde grado normal y en **4 discos el grado 2**. que corresponde a mínimamente interrumpido.

III.- que corresponde a la celularidad del núcleo pulposos grado, se presentó en los **4 discos el grado 1**. que corresponde a celularidad normal con grandes vacuolas en la estructura gelatinosa de la matriz y en **1 disco el grado 2** que corresponde a ligera disminución en el número de células y menos vacuolas

IV.- que corresponde a la matriz del núcleo pulposos clasificación, se presentó en los **5 discos la clasificación 1**. Que corresponde al aspecto gelatinoso normal.

Determinando que el disco sin intervención **mantuvo características normales** en los discos del Grupo B 2 S encontrándose una suma muy constante, correspondiendo en **2 disco 4 puntos** (1 puntos en las 4 categorías) correspondiendo a un disco normal, y **2 discos 5 puntos** (1 puntos en 3 categorías I,III,IV y 2 puntos en 1 categoría II) y **1 disco 6 puntos** (1 punto 2 categorías I,IV y 2 puntos 2 categorías II,III) **tendiendo a conservar características normales** en estos últimos discos.

6.2.3 El disco de L4-L5 disco lesionado/ tratado, que corresponde al disco que se puncionó y a las 8 semanas se infiltró con PRP+condrocitos y a las 8 semanas se obtiene la pieza para su estudio histológico, de acuerdo con la escala de clasificación histológica determinando por categorías:

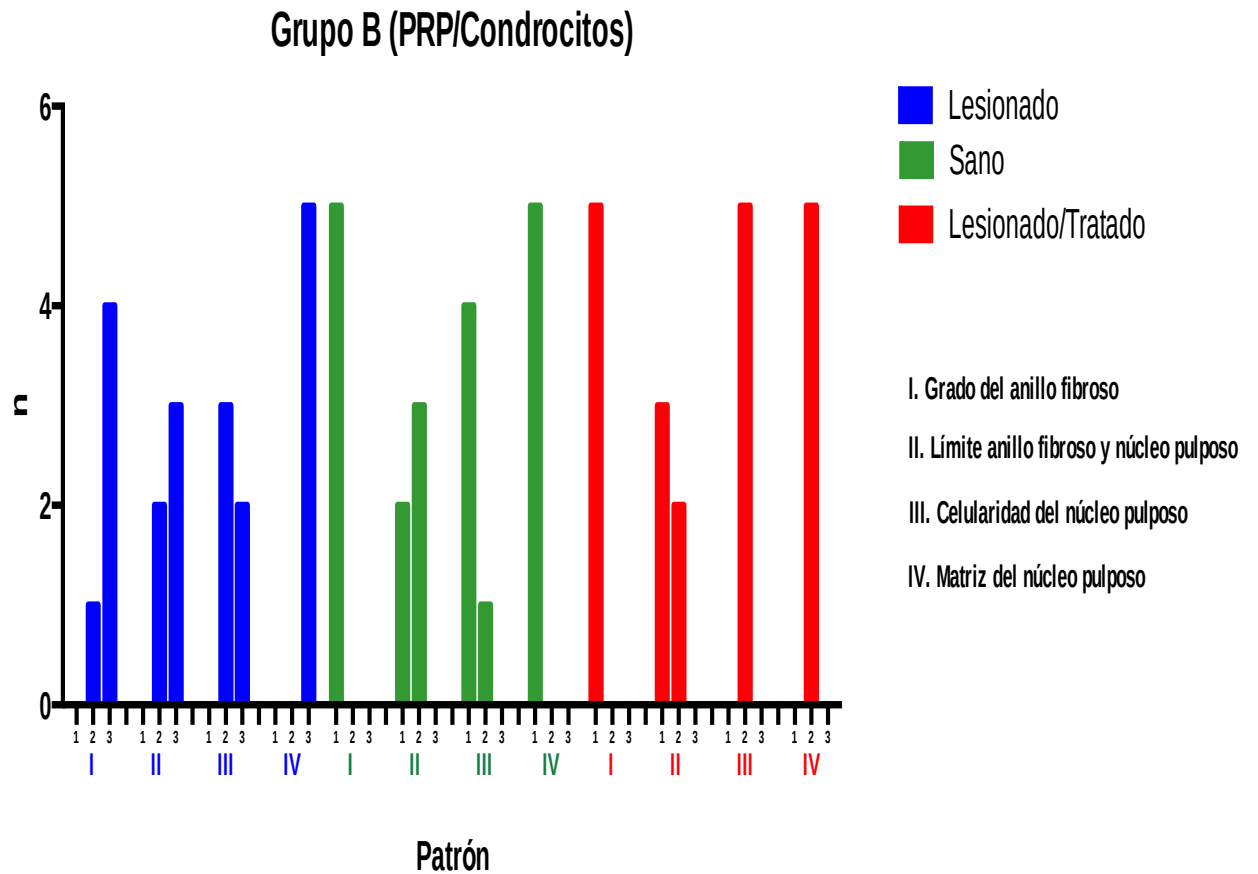
I.- que corresponde al grado del anillo fibroso, predominio en los **5 discos el patrón 1**. que corresponde al patrón normal de láminas de fibrocartílago (en forma U en la cara posterior y ligeramente convexa en la cara anterior) sin fibras rotas y sin aspecto serpentino en ninguna parte del anillo.

II.- que corresponde al límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposo grado, se presentó en 3 disco el grado 1. que corresponde grado normal y en **2 discos el grado 2.** que corresponde a mínimamente interrumpido.

III.- que corresponde a la celularidad del núcleo pulposo grado, se presentó en los **5 discos el grado 2.** que corresponde a mínimamente interrumpido.

IV.- que corresponde a la matriz del núcleo pulposo clasificación, se presentó en los **5 discos la clasificación 2.** que corresponde a ligera condensación de la matriz extracelular.

Determinando que el disco lesionado/tratado con intervención e infiltrado con PRP+condrocitos, **mantuvo característica muy variables tendiendo a conservar características de proceso degenerativo** en los discos del **Grupo B 3 L/T** encontrándose una suma muy constante , correspondiendo en **2 disco 7 puntos** (1 puntos en la categoría I, y 2 puntos en las categorías II,III,IV), otros 3 discos 6 puntos (1 puntos en 2 categorías I,II y 2 puntos en categoría III,IV) en el otro disco (1 punto en 2 categorías I,II y 2 puntos en 2 categoría III,IV), **encontrándose tendencia al efecto regeneración.**



Grafica 2 L2-L3 L una degeneración severa con una puntuación en **4D** de 11 puntos y **1D** de 10 puntos. **L3-L4 S** conservó características normales con un puntaje general consistente y variando de 4-6 puntos. **L4-L5 L/T** mejoría respecto con el disco L/no T, pero sin alcanzar la normalidad del tejido discal con puntuación entre 6-7 puntos.

6.3 GRUPO C PRP / CMMS

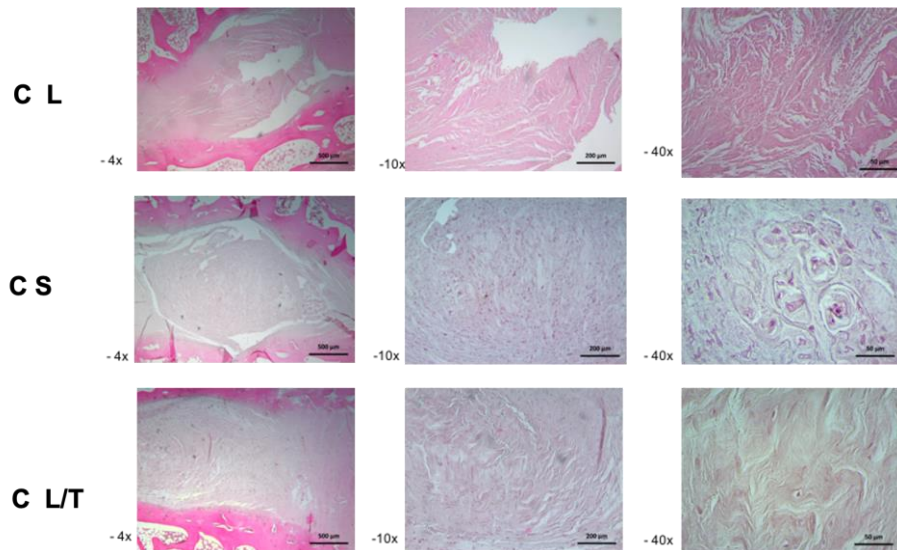


Figura 3. Análisis histológico de discos intervertebrales del Grupo C, tratados con PRP y CMMS. Las imágenes representan la composición celular y la arquitectura de la matriz en discos lesionados, sanos y lesionados tratados (4x, 10x, 40x). Se observa la organización de los haces fibrocolagenosos, la densidad y morfología de las células en el núcleo pulposo, así como las diferencias en la matriz extracelular después del tratamiento. Estos hallazgos detallan las alteraciones y la respuesta al tratamiento en el tejido discal. (L: Lesionado, S: Sano, L/T: Lesionado y Tratado) Tinción H&E.

Grupo C (PRP + CMMs)

	L2:3 Disco lesionado					L3:4 Disco sano					L4:5 Disco lesionado y tratado				
I. Grado del anillo fibroso:	C1.1	C2.1	C3.1	C4.1	C5.1	C1.2	C2.2	C3.2	C4.2	C5.2	C1.3	C2.3	C3.3	C4.3	C5.3
1. Patrón normal de láminas de fibrocartilago en forma de U en la cara posterior y ligeramente convexa en la cara anterior) sin fibras rotas y sin aspecto serpenteo en ninguna parte del anillo						1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2. Fibras rotas o serpenteadas en menos del 30% del anillo	2	2	2												
3. Fibras rotas o serpenteadas en más del 30% del anillo				3	3										
II. Límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposso Grado:	C1.1	C2.1	C3.1	C4.1	C5.1	C1.2	C2.2	C3.2	C4.2	C5.2	C1.3	C2.3	C3.3	C4.3	C5.3
1. normales						1	1				1	1	1	1	1
2. Mínimamente interrumpido	2	2	2					2	2	2	2	2	2	2	2
3. Interrupción moderadamente				3	3										
III. Cantidad del núcleo pulposso Grado:	C1.1	C2.1	C3.1	C4.1	C5.1	C1.2	C2.2	C3.2	C4.2	C5.2	C1.3	C2.3	C3.3	C4.3	C5.3
1. Cantidad normal con grandes vacuolas en la estructura gelatinosa de la matriz						1			1	1					
2. Ligera disminución en el número de células y menos vacuolas.							2	2			2	2	2	2	2
3. Disminución moderadamente (50%) del número de células y sin vacuolas.	3	3	3	3	3							3	3	3	3
IV. Matriz del núcleo pulposso:	C1.1	C2.1	C3.1	C4.1	C5.1	C1.2	C2.2	C3.2	C4.2	C5.2	C1.3	C2.3	C3.3	C4.3	C5.3
1. Aspecto gelatinoso normal						1	1	1	1	1					
2. Ligera condensación de la matriz extracelular													2	2	2
3. Condensación moderadamente de la matriz extracelular	3	3	3	3	3						3	3	3	3	3
	10	10	10	12	12	4	5	6	5	5	7	8	7	7	7

Grupo C que corresponde a PRP+CMMs, plasma rico en plaquetas con células madres mesenquimales.

6.3.1 El disco de L2-L3 disco lesionado bajo punción dirigida por fluoroscopia, sometido a desarrollar el proceso degenerativo, de acuerdo con la escala de clasificación histológica determinándose las categorías:

I.- que corresponde al grado del anillo fibroso, predomino en 3 discos el patrón 2. de fibras rotas o serpenteadas en menos del 30% del anillo y en **2 discos predomino el patrón 3.** de fibras rotas o serpenteadas en más del 30% del anillo.

II.- que corresponde al límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposos grado, se presentó en **3 discos el grado 2**. que corresponde a mínimamente interrumpido y en **2 discos el grado 3**. que corresponde a interrupción moderada/grave.

III.- que corresponde a la celularidad del núcleo pulposos grado, 5 discos el grado 3. que corresponde a disminución moderada/grave (50%) del número de células y sin vacuolas.

IV.- que corresponde a la matriz del núcleo pulposos clasificación, se presentó en los **5 discos la clasificación 3**. Que corresponde a condensación moderada/grave de la matriz extracelular.

Determinando que la intervención desarrolló **un grado importante de degeneración** de los discos del **Grupo C 1 L** encontrándose una suma muy constante, correspondiendo a **2 disco 12 puntos** (2 discos 3 puntos en 3 categoría I, II, III, IV,) y **3 disco 10 puntos** (2 puntos en 2 categorías I, II, y 2 puntos en 2 categoría III, IV) correspondiendo a uno **discos severamente degenerados**.

6.3.2 El disco de L3-L4 disco sano, conservándose como control no puncionado, de acuerdo con la escala de clasificación histológica determinando por categorías:

I.- que corresponde al grado del anillo fibroso, predominio en los **5 discos el patrón 1**. Que corresponde al patrón normal de láminas de fibrocartilago (en forma U en la cara posterior y ligeramente convexa en la cara anterior) sin fibras rotas y sin aspecto serpentino en ninguna parte del anillo.

II.- que corresponde al límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulpos grado, se presentó en **2 disco el grado 1**. que corresponde grado normal y en **3 discos el grado 2**. que corresponde a mínimamente interrumpido.

III.- que corresponde a la celularidad del núcleo pulpos grado, se presentó en los **3 discos el grado 1**. que corresponde a celularidad normal con grandes vacuolas en la estructura gelatinosa de la matriz y en **2 disco el grado 2** que corresponde a ligera disminución en el número de células y menos vacuolas

IV.- que corresponde a la matriz del núcleo pulpos clasificación, se presentó en los **5 discos la clasificación 1**. Que corresponde al aspecto gelatinoso normal.

Determinando que el disco sin intervención **mantuvo características normales** en los discos del **Grupo C 2 S** encontrándose una suma muy constante, correspondiendo en **1 disco 4 puntos** (1 puntos en las 4 categorías) correspondiendo a un disco normal, y **3 discos 5 puntos** (2 discos 1 puntos en 3 categorías I,III,IV y 2 puntos en 1 categoría II y 1 disco 1 punto en 3 categorías I,II,IV y 2 puntos en 1 categoría III) y **1 disco 6 puntos** (1 punto 2 categorías I,IV y 2 puntos 2 categorías II,III) tendiendo a **conservar características normales** en estos últimos discos.

6.3.3 El disco de L4-L5 disco lesionado/ tratado, que corresponde al disco que se puncionó y a las 8 semanas se infiltró con PRP+CMMs y a las 8 semanas se obtiene la pieza para su estudio histológico, de acuerdo con la escala de clasificación histológica determinando por categorías:

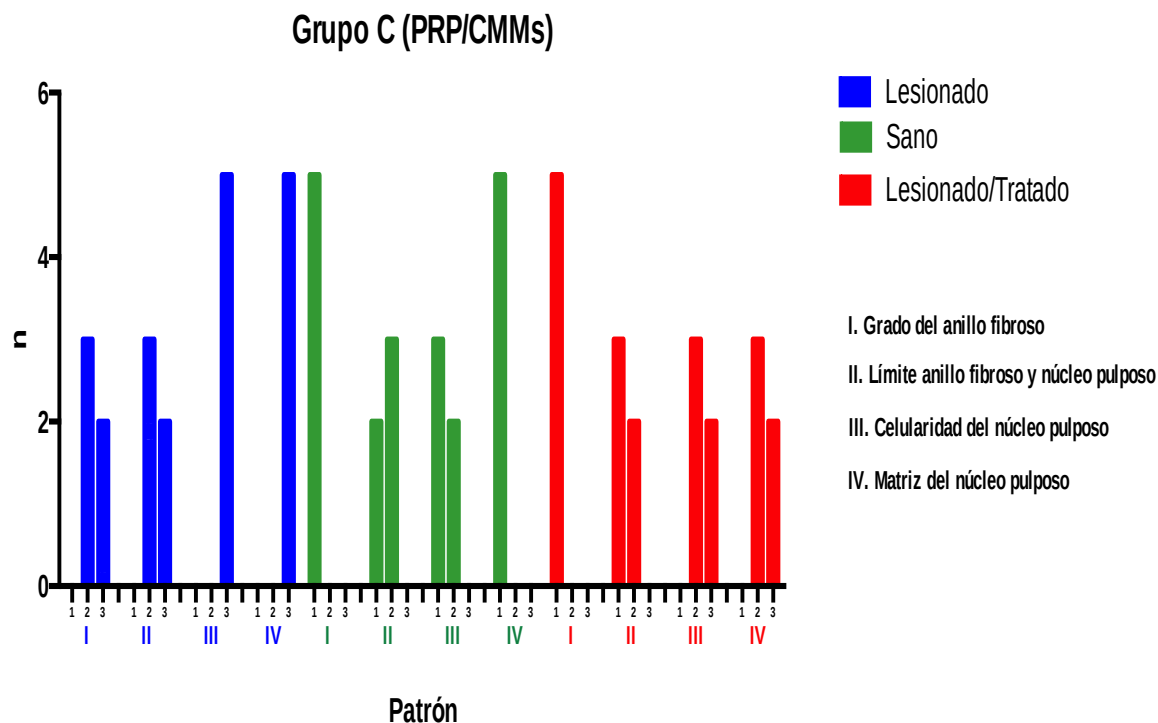
I.- que corresponde al grado del anillo fibroso, predomino en los **5 discos el patrón 1**. que corresponde al patrón normal de láminas de fibrocartílago (en forma U en la cara posterior y ligeramente convexa en la cara anterior) sin fibras rotas y sin aspecto serpentino en ninguna parte del anillo.

II.- que corresponde al límite entre el anillo fibroso y el núcleo pulposo grado, se presentó en **3 disco el grado 1.** que corresponde grado normal y en **2 discos el grado 2.** que corresponde a mínimamente interrumpido.

III.- que corresponde a la celularidad del núcleo pulposo grado, se presentó en los **3 discos el grado 2.** que corresponde a mínimamente interrumpido y **2 discos el grado 3** que corresponde disminución moderada/grave (50%) del número de células y sin vacuolas.

IV.- que corresponde a la matriz del núcleo pulposo clasificación, se presentó en los **3 discos la clasificación 2.** que corresponde a ligera condensación de la matriz extracelular y **2 discos la clasificación 3** que corresponde a condensación moderada/grave de la matriz extracelular.

Determinando que el disco lesionado/tratado con intervención e infiltrado con PRP+CMMS, **mantuvo características muy variables tendiendo a conservar características de proceso degenerativo** en los discos del Grupo C 3 L/T encontrándose una suma muy constante, correspondiendo en **4 disco 7 puntos** (3 discos 1 puntos en la categoría I,II y 3 discos 2 puntos en las categorías II,III,IV y 2 discos 3 puntos en las categorías III,IV), 1 discos 8 puntos (1 puntos en 2 categorías I,II y 3 puntos en 2 categoría III,IV), encontrándose **pobre efecto regenerativo en esta intervención pero tendiendo a la regeneración.**



Grafica 3 L2-L3 L una degeneración severa con una puntuación en **2D** de 12 puntos y **3D** de 10 puntos. **L3-L4 S** conservó características normales con un puntaje general consistente y variando de 4-6 puntos. **L4-L5 L/T** mejoría respecto con el disco L/no T, pero sin alcanzar la normalidad del tejido discal con puntuación entre 6-8 puntos.

6.4 Resultados Estadísticos

En el presente estudio, se empleó una muestra de 15 conejos, distribuidos en tres grupos de 5 cada uno. A cada conejo se le indujo una lesión en dos discos intervertebrales, y posteriormente, los grupos fueron sometidos a diferentes tratamientos: el primer grupo recibió plasma rico en plaquetas (PRP), el segundo grupo fue tratado con PRP y condrocitos, y el tercer grupo fue tratado con PRP y células madre (CMMs). Luego de la aplicación de los tratamientos, se procedió a la eutanasia de los conejos, seguida de la evaluación histológica de los dos discos intervertebrales lesionados, así como de un disco intervertebral sano adyacente a estos.

Los resultados presentados en la Tabla 1 muestran una comparación de los puntajes obtenidos en los discos intervertebrales evaluados entre los tres grupos de tratamiento. En los discos intervertebrales sanos, los puntajes histológicos promedio variaron entre 4.4 y 5 para los tres grupos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas ($p=0.42$). En los discos lesionados y no tratados, los valores promedio oscilaron entre 10 y 10.8 para los grupos ($p=0.46$). Por otro lado, en los discos lesionados y tratados, ya sea con PRP solamente, PRP y condrocitos, o PRP y CMMs, los valores promedio variaron entre 6.4 y 7.2 ($p=0.11$).

Al analizar las diferencias entre los discos intervertebrales (sanos, lesionados y lesionados con tratamiento) dentro de cada grupo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.001$). Los puntajes promedio para la integridad histológica fueron de 4.73 ± 0.70 para los discos sanos, 10.53 ± 1.12 para los discos lesionados y 6.93 ± 0.70 para los discos lesionados y tratados.

En la comparación entre los grupos, se observaron diferencias significativas entre todos ellos. La puntuación de los discos sanos difirió tanto de la puntuación de los discos lesionados sin tratamiento como de la puntuación de los discos lesionados con tratamiento. Asimismo, los discos lesionados sin tratamiento difirieron de los discos lesionados con tratamiento, siendo estos últimos incapaces de alcanzar los valores de los discos sanos.

Se demostró diferencias significativas en la integridad histológica de los discos intervertebrales tratados y no tratados en los tres diferentes grupos de tratamiento, lo que sugiere un efecto beneficioso de los tratamientos con PRP, condrocitos y células madre en comparación con los discos lesionados no tratados.

Tabla 1. Calificación obtenida entre los grupos tres tratamientos empleados

		Calificación			T P
		Disco sano n=15	Disco lesionado n=15	Disco lesionado y tratado n=15	
Grupo	PRP	4.4±0.54a	10±1.5 ^b	7.2±.83 ^c	<.001
	PRP+condrocitos	4.8±0.83a	10.8±.44 ^b	6.4±.54 ^c	<.001
	PRP+CMMs	5±0.7a	10.8±1.09 ^b	7.2±.44 ^c	<.001
	‡ P	0.42	0.46	0.11	

PRP, Plasma rico en plaquetas; CMMs, Células Madre...

Cada super índice indica diferencia entre cada subgrupo.

‡ ANOVA de un factor, comparando la calificación obtenida entre los tipos de disco evaluados

‡ ANOVA de un factor, comparando la calificación obtenida entre los grupos de tratamiento

Los discos sanos en los tres grupos mantuvieron puntuaciones histológicas consistentes y no mostraron diferencias significativas, lo que era de esperarse ya que no estaban sujetos a la intervención. Este dato sirve como una línea de base para la integridad del disco en condiciones normales. En los discos lesionados no tratados, las puntuaciones también fueron consistentes y no mostraron diferencias significativas entre los grupos, lo que establece la homogeneidad del daño inducido en el disco antes del tratamiento. Este es un punto crucial para validar la comparabilidad de los resultados posteriores al tratamiento. La variabilidad en las puntuaciones en los discos tratados indica que los tratamientos tuvieron un efecto diferencial. Los grupos tratados con PRP y PRP+condrocitos mostraron una tendencia hacia una mejor puntuación comparada con los discos lesionados no tratados, lo que sugiere un efecto beneficioso en la integridad histológica del disco. Sin embargo, es notable que, aunque se observó mejora, ninguno de los tratamientos restauró completamente la puntuación histológica a los niveles de un disco sano.

6.5 Análisis molecular

La RT-qPCR cuantitativa demostró que todos los tratamientos alteraron la expresión de COL2A1 y COL10A1 en comparación con los controles de lesión (L2-L3). En el grupo de condrocitos con PRP, COL2A1 en los discos tratados (L4-L5) aumentó de $1,03 \pm 0,12$ a $2,37 \pm 0,14$ ($p = 0,002$), lo que corresponde a un aumento de 2,3 veces, mientras que COL10A1 disminuyó de $1,05 \pm 0,06$ a $0,41 \pm 0,05$ ($p = 0,003$), un nivel 0,4 veces mayor en comparación con los controles de lesión (Figura 7). En comparación con los controles sanos (L3-L4; COL2A1 = $3,08 \pm 0,17$; COL10A1 = $0,22 \pm 0,04$), los discos tratados con condrocitos PRP alcanzaron $2,37 \pm 0,14$ para COL2A1 (0,77 veces superior al de los sanos; $p = 0,010$) y $0,41 \pm 0,05$ para COL10A1 (1,9 veces superior al de los sanos; $p = 0,030$). El protocolo PRP-MSC indujo la expresión de COL2A1 a un nivel de $1,82 \pm 0,11$ en los discos tratados, lo que representa un aumento de 1,9 veces con respecto a los controles con lesión ($0,98 \pm 0,11$; $p = 0,010$), y redujo COL10A1 a $0,62 \pm 0,05$ (0,61 veces frente a los controles con lesión a $1,02 \pm 0,05$; $p = 0,015$). En comparación con los discos sanos, COLA1 en este grupo fue 0,62 veces mayor ($1,82 \pm 0,11$ frente a $2,95 \pm 0,16$; $p = 0,005$), mientras que COL10A1 fue 2,9 veces mayor ($0,62 \pm 0,05$ frente a $0,19 \pm 0,03$; $p = 0,008$).

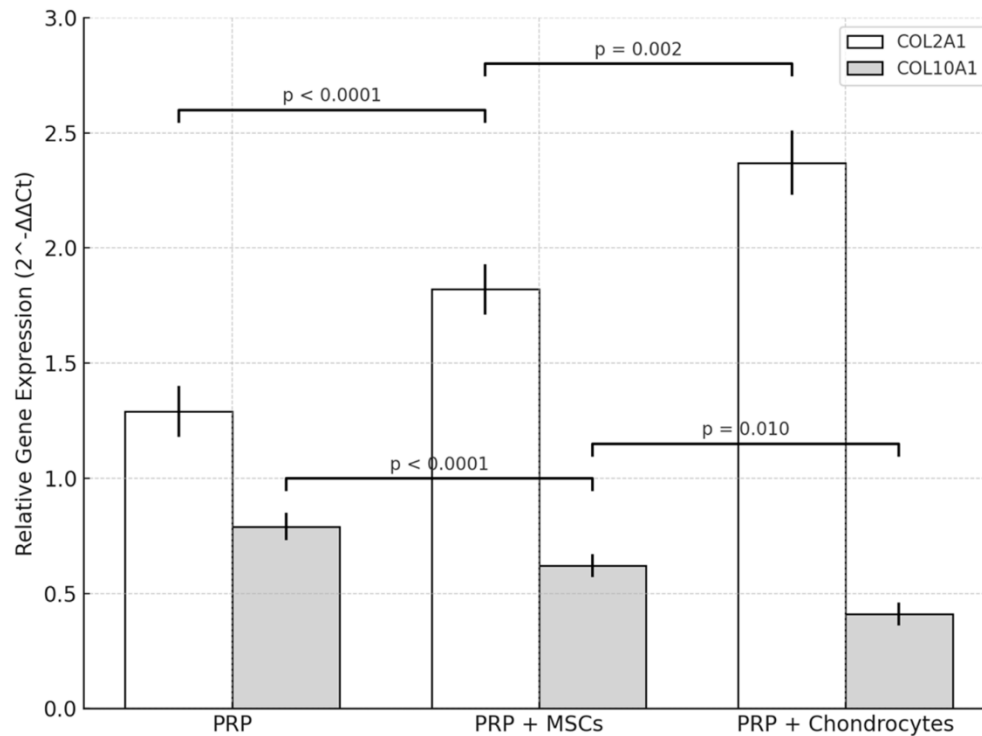


Figura 7. Expresión relativa del ARNm de COL2A1 y COL10A1 en discos intervertebrales tratados con PRP, PRP + células madre mesenquimales (MSC) o PRP + condrocitos. Los datos representan la media $\pm$ DE (n = 5). Los niveles de expresión se normalizaron con β -actina y se calibraron con respecto a los controles de lesión (L2-L3) mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El tratamiento con PRP + condrocitos presentó la mayor expresión de COL2A1 y la menor expresión de COL10A1 entre los grupos. Para el análisis estadístico, se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey. Se muestran los valores p para las comparaciones significativas entre grupos.

El PRP solo produjo una elevación modesta en COL2A1 a $1,29 \pm 0,11$ (1,3 veces frente a los controles de lesión a $1,01 \pm 0,10$; $p = 0,080$) y disminuyó COL10A1 a $0,79 \pm 0,06$ (0,80 veces frente a los controles de lesión a $0,99 \pm 0,05$; $p = 0,040$). En comparación con los discos sanos, la expresión de COL2A1 fue 0,43 veces mayor ($1,29 \pm 0,11$ frente a $3,02 \pm 0,14$; $p < 0,001$), mientras que la de COL10A1 fue 4,4 veces mayor ($0,79 \pm 0,06$ frente a $0,18 \pm 0,04$; $p < 0,001$).

La comparación intergrupar de los discos tratados confirmó diferencias significativas en la expresión de marcadores. Para COL2A1, los valores medios

fueron $2,37 \pm 0,14$ (PRP-condrocitos), $1,82 \pm 0,11$ (PRP-MS) y $1,29 \pm 0,11$ (PRP) (ANOVA unidireccional, $F(2,12) = 56,8$, $p < 0,0001$; post hoc de Tukey: PRP-condrocitos $>$ PRP-MS, $p = 0,002$; PRP-MS $>$ PRP, $p < 0,0001$). Para COL10A1, los valores medios fueron $0,41 \pm 0,05$, $0,62 \pm 0,05$ y $0,79 \pm 0,06$, respectivamente (ANOVA unidireccional, $F(2,12) = 28,3$, $p < 0,0001$; post hoc de Tukey: PRP-condrocitos $<$ PRP-MS, $p = 0,010$; PRP-MS $<$ PRP, $p < 0,0001$). Estos resultados indican que el PRP combinado con condrocitos produjo el perfil condrogénico más favorable y la menor expresión de marcadores hipertróficos, en concordancia con los hallazgos histológicos.

CAPÍTULO VII

7 DISCUSIÓN

Este estudio evaluó la eficacia reparadora de tres estrategias biológicas (PRP solo, PRP combinado con condrocitos y PRP combinado con células madre mesenquimales) en la regeneración del disco intervertebral (DIV) en un modelo de lesión discal en conejos. Los resultados histológicos se complementaron con un perfil molecular específico mediante RT-qPCR cuantitativa de marcadores condrogénicos e hipertróficos claves (COL2A1 y COL10A1), lo que proporcionó un contexto mecanístico a las observaciones a nivel tisular.

Histológicamente, el PRP produjo mejoras variables en los discos tratados (L4-L5) en comparación con los controles lesionados (L2-L3), sin restaurar completamente la integridad estructural y celular del núcleo pulposo y el anillo fibroso. Estos hallazgos concuerdan con trabajos previos que demuestran que, si bien el PRP puede estimular la proliferación celular y la síntesis de la matriz extracelular, el resultado del tratamiento depende de la gravedad de la lesión, la formulación y los parámetros de administración [15,16]. Las fuentes de variabilidad probablemente incluyen la heterogeneidad en la composición del PRP, la gravedad basal de la lesión y las respuestas biológicas interindividuales [17,18].

A nivel molecular, el PRP indujo solo cambios parciales, en consonancia con un estudio previo de punción anular en el que el PRP autólogo aumentó COL2A1 sin un aumento concomitante de COL10A1, lo que sugiere un efecto condrogénico moderado sin promover la hipertrofia [19].

En conjunto, el PRP por sí solo confiere beneficios histológicos y moleculares parciales, pero podría ser insuficiente para la regeneración completa del DIV en este modelo [15-19].

El PRP combinado con condrocitos resultó en una reparación estructural más consistente, incluyendo la normalización de las láminas del fibrocartílago, en consonancia con el potencial reparador de las células derivadas del cartílago.

La literatura existente respalda la justificación de la combinación de PRP con condrocitos para restaurar la matriz extracelular (ECM) similar al cartílago [20-23] y destaca la posible sinergia en las construcciones celulares de PRP para la reparación del cartílago [24,25], en consonancia con estrategias más amplias para abordar las causas de la degeneración del DIV más allá del alivio sintomático [26]. Nuestro análisis molecular confirmó estas mejoras: la expresión de COL2A1 aumentó, mientras que COL10A1 disminuyó hasta alcanzar los niveles observados en discos sanos, lo que refleja la evidencia de modelos caninos de trasplante de disco-condrocitos, donde las células promovieron la síntesis de colágeno tipo II sin hipertrofia excesiva [27]. En conjunto, estos datos e informes previos respaldan la terapia con PRP y condrocitos como una estrategia prometedora para la reparación del disco [20-27].

De igual manera, el PRP combinado con MSC mejoró la reparación del disco en comparación con controles lesionados, lo que concuerda con estudios previos ex vivo e in vivo que muestran que el PRP potencia la condrogénesis de MSC y la deposición de matriz en entornos similares al disco [28]. El grado de regeneración parece depender del contexto, influenciado por la gravedad de la lesión, el fenotipo de las MSC y las señales microambientales [29]. A nivel molecular, los discos tratados con PRP-MSC demostraron una mejora en el equilibrio COL2A1/COL10A1 en relación con la lesión, en consonancia con los

efectos antidegenerativos descritos previamente en modelos de conejo [30] y en la literatura más amplia sobre MSC [28,29].

En general, ambas estrategias de combinación superaron al PRP solo en los resultados histológicos y moleculares, lo que respalda una interacción sinérgica entre el PRP y las células reparadoras [20-26,28,29]. Nuestros hallazgos integrados abogan por enfoques combinados que combinen formulaciones optimizadas de PRP con terapias celulares. Si bien estudios previos han explorado el uso de condrocitos o MSC solos para la regeneración de discos [27-30], nuestro diseño experimental no incluyó grupos con células administradas sin PRP. Esta fue una elección deliberada, ya que la hipótesis central del presente estudio era evaluar los posibles efectos sinérgicos de la combinación de PRP con células reparadoras. Reconocemos que esto limita las comparaciones directas con terapias solo con células, lo cual debería abordarse en futuras investigaciones.

Sin embargo, con base en nuestros hallazgos y la evidencia previa, las estrategias combinadas pueden ofrecer claras ventajas sobre el PRP solo al mejorar la síntesis de la matriz extracelular, mantener un fenotipo condrogénico y reducir la deriva hipertrófica, mejorando así potencialmente los resultados clínicos en pacientes con degeneración discal.

Los enfoques combinados pueden ofrecer ventajas clínicas sobre el PRP solo en pacientes con degeneración discal. Si bien el PRP proporciona una liberación rápida pero transitoria de factores de crecimiento, sus efectos pueden disminuir a medida que persiste el entorno degenerativo. Por el contrario, los condrocitos adjuntos o las células madre mesenquimales (CMM) pueden mantener la síntesis de la matriz y ejercer actividad inmunomoduladora paracrina, lo que ayuda a mantener un fenotipo condrogénico y reducir la deriva hipertrófica.

Estos mecanismos pueden prolongar el beneficio terapéutico más allá del logrado con el PRP solo. Clínicamente, estas estrategias combinadas podrían proporcionar un alivio más duradero de los síntomas y una reparación estructural, lo que representa un posible avance en comparación con las intervenciones que solo contienen PRP.

La variabilidad interestudio e intraestudio probablemente refleje diferencias en la composición del PRP (contenido de plaquetas/leucocitos, activación), la gravedad de la lesión, el fenotipo celular y la dosis, y la cinética de administración [17,18,29]. En el futuro, los enfoques para la estandarización de la preparación del PRP, la caracterización celular rigurosa y el ajuste de la mecánica de los transportadores pueden reducir la varianza y mejorar la magnitud del efecto [15,16,20,21,24-26]. Basándose en la integración actual de la histología con la RT-qPCR, los trabajos futuros deberían ampliar los criterios de valoración moleculares evaluados (p. ej., *agrecano* y *COL1A1*, mediadores inflamatorios y catabólicos) e incluir biomarcadores a nivel de proteína y de imagen para fortalecer las inferencias mecanicistas [28-30]. Serán importantes cohortes más amplias y estudios de determinación de dosis para definir las concentraciones óptimas de PRP y el número de células, así como para comparar las MSC derivadas de tejido adiposo con las derivadas de médula ósea en condiciones estandarizadas [28,29]. En última instancia, la optimización preclínica debería preceder a los estudios translacionales que evalúan la seguridad, la dosificación y las vías de administración en entornos clínicamente relevantes.

Los análisis estadísticos sugirieron que la infiltración de PRP, ya sea sola o en combinación con condrocitos o MSC, mejoró significativamente la integridad histológica de los discos intervertebrales lesionados en comparación con los discos lesionados no tratados. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y los discos sanos, los tratamientos con PRP-condrocitos. CONCLU PRP-MSC mejoraron las

puntuaciones hacia valores saludables, lo que sugiere los beneficios regenerativos de estas intervenciones. Estos hallazgos respaldan estudios previos que informan sobre los efectos positivos del PRP y las células madre en la regeneración tisular y se alinean con la hipótesis de que la combinación de factores de crecimiento y células puede mejorar la reparación del DIV [29]. Es importante destacar que la variabilidad en las puntuaciones entre los discos lesionados y tratados sugiere que factores individuales pueden influir en la respuesta al tratamiento, lo que subraya la necesidad de mayor investigación enfocada en optimizar las terapias y personalizar la modalidad de tratamiento para cada caso. Los tratamientos con PRP, ya sea solo o en combinación con condrocitos o células madre mesenquimales (CMM), parecen conferir beneficios regenerativos en los discos lesionados en el modelo de conejo considerado. Sin embargo, la variabilidad observada indica que la regeneración completa del DIV es compleja y podría requerir un enfoque más personalizado.

CAPÍTULO VIII

8 CONCLUSIONES

Los tratamientos con PRP, tanto solos como en combinación con condrocitos o células madre mesenquimales (MSC), no solo mejoraron las puntuaciones histológicas, sino que también indujeron un claro cambio molecular hacia un fenotipo más regenerativo, como lo demuestra la sobreexpresión del marcador condrogénico COL2A1 y la desregulación del marcador hipertrófico COL10A1. Cabe destacar que el protocolo PRP-condrocitos produjo las mejoras más pronunciadas tanto a nivel tisular como de expresión génica, mientras que el PRP-MSC produjo beneficios intermedios y el PRP solo provocó cambios más moderados. Sin embargo, incluso las respuestas más fuertes no lograron restaurar por completo las características sanas del disco, lo que subraya que la regeneración del disco intervertebral sigue siendo un desafío complejo y multifactorial que probablemente requiere combinaciones precisas de parámetros celulares, moleculares y de administración.

Este estudio destaca el potencial de las terapias regenerativas en la reparación del disco intervertebral, lo que podría contribuir significativamente a futuras estrategias de tratamiento para enfermedades discogénicas. La investigación continua, dirigida a optimizar las formulaciones de PRP, refinar las propiedades de las MSC y los condrocitos, y estandarizar los protocolos de administración, será esencial para maximizar los resultados terapéuticos y garantizar una traducción clínica reproducible.

Si bien este estudio presenta ciertas limitaciones, también define valiosas oportunidades para futuras investigaciones. El tamaño relativamente pequeño de la muestra refleja la naturaleza exploratoria de este trabajo preclínico, pero

aun así arrojó tendencias histológicas y moleculares consistentes. Asimismo, la ausencia de grupos tratados solo con condrocitos o MSC limitó las comparaciones directas respecto a sus efectos aislados, pero nos permitió centrarnos en el comportamiento sinérgico de las combinaciones de células y PRP, que fue la hipótesis central de este estudio. Finalmente, si bien los presentes resultados se obtuvieron en un modelo de conejo a corto plazo, proporcionan una sólida base biológica para estudios translacionales posteriores. Se espera que la ampliación de la duración, el tamaño de la muestra y la inclusión de controles solo con células en futuros experimentos contribuyan a validar y extender estos alentadores hallazgos hacia la aplicación clínica.

CAPÍTULO IX

9 BIBLIOGRAFIA

1. Steinmetz M, Berven S, Benzel E, editors. Benzel's Spine Surgery. In: Spine Surgery techniques, complication, avoidance, and management, Third. 2012. p. 209–14.
2. Steven Garfin, Frank Eismont, Gordon Bell, Christopher M. Bono, Jeffrey S. Fischgrund. Rothman-Simeone and Herkowitz's The Spine. In: Rothman-Simeone, The Spine. Sixth Volumen 1. 2011. p. 98–108.
3. Samartzis DCK. Structure and Biology of the intervertebral Disk in Health and Disease. In: Lumbar Intervertebral Disc Degeneration, An Issue of Orthopedic Clinic. 1st ed. 2011. p. 447–64.
4. Einhorn TAMJRMBJAMM. Form and Function of the intervertebral disk. In: Orthopaedic Basic Science, Foundations of clinic practice. Third. 2007. p. 258–64.
5. Herkowitz HNGSREFJBGRBRA. Development of the Spine. In: Rothman-Simeone The Spine. Sixth. 2011. p. 2–14.
6. Garreta E. Casajuana DEAABO. Degeneración del disco intervertebral lumbar: anatomía, fisiología y patofisiología. Dolor. 2011; 26:69–75.
7. 'Colombier Pauline' 'Clouet Johann' 'Hamel Olivier' 'Lescaudron Laurent' 'Guicheux Jérôme't. The Lumbar Intervertebral disc: From embryonic development to degeneration. Joint Bone Spine. 2014; 81:125–9.
8. 'Benzel Edward C.' Francis Todd B. Intervertebral disc process of degeneration physiology and pathophysiology. In: Edward C Benzel Spine Surgery Techniques, complication, avoidance and management. Third edition. 2012. p. 123–33.
9. 'Buckwalter Joseph A.MD'. Orthopaedic Basic Science, In: Orthopaedic Basic Science, Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System. 2nd edition. 2000. p. 548–56.
10. 'Zhao Chang-Qing' 'Wang Li-Min' 'Jiang Lei-Sheng' Dai Li-Yang'. The Cell Biology of intervertebral disc aging and degeneration. Ageing Research Reviews 6. 2007;247–61.
11. 'Lotz Jeffrey C. PhD'. Animal Models of Intervertebral Disc Degeneration. Spine. 2004;29(23):2742–50.
12. 'Karppinen Jaro MD P 'Shen FHM' LKDKMc (Orth)' FFFF 'Andersson GBJMP 'Cheung KMCMM (MK), FFF 'Samartzis DDs. Management of Degenerative Disk Disease and Chronic Low Back Pain. In: Orthopedic Clinic of North America. 2011. p. 513–8.
13. 'Mayer H. Michael MD P 'Siepe CJMP. Prosthetic Total Disk Replacement- Can We Learn from Total Hip Replacement. In: Orthopedic Clinic of North America. 2011. p. 543–54.
14. 'Sakai Daisuke MD P. Stem Cell Regeneration of the Intervertebral Disk. In: Orthopedic Clinic of North America. 2011. p. 555–62.
15. Drazin D, Rosner J, Avalos P, Acosta F. Stem Cell Therapy for Degenerative Disc Disease. Adv Orthop. 2012; 2012:1–8.

16. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (1979). 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
17. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, Nomura T, Okuma M, Nishimura K, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen® gel to the intervertebral disc: A potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials*. 2003;24(20):3531–41.
18. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Watanabe T, Nakai T, Ando K, et al. Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Transplanted to a Rabbit Degenerative Disc Model Potential and Limitations for Stem Cell Therapy in Disc Regeneration. Vol. 30, *SPINE*.
19. Richardson SM, Walker R V., Parker S, Rhodes NP, Hunt JA, Freemont AJ, et al. Intervertebral Disc Cell-Mediated Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cells*. 2006 Mar 1;24(3):707–16.
20. Chan SCW, Gantenbein-Ritter B. Intervertebral disc regeneration or repair with biomaterials and stem cell therapy - Feasible or fiction? Vol. 142, *Swiss Medical Weekly*. SMW supporting association; 2012.
21. Ahn J, Park EM, Kim BJ, Kim JS, Choi B, Lee SH, et al. Transplantation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells highly expressing TGF β receptors in a rabbit model of disc degeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Oct 2;6(1).
22. Yang H, Cao C, Wu C, Yuan C, Gu Q, Shi Q, et al. TGF- β 1 Suppresses Inflammation in Cell Therapy for Intervertebral Disc Degeneration. *Sci Rep*. 2015 Aug 20;5.
23. Bian Z, Sun J. Original Article [Internet]. Vol. 8, *Int J Clin Exp Pathol*. 2015. Available from: www.ijcep.com/
24. Wang YH, Yang B, Li WL, Li JM. Effect of the mixture of bone marrow mesenchymal stromal cells and annulus fibrosus cells in repairing the degenerative discs of rabbits. *Genetics and Molecular Research*. 2015 Mar 27;14(1):2365–73.
25. Mochida J. SD, NY, WT, YY, KS. Intervertebral disc repair with activated nucleus pulposus cell transplantation: a three- year, prospective clinical study of its safety. *European Cells and Materials*. 2015; 29:202–12.
26. Han XB, Zhang YL, Li HY, Chen B, Chang X, Zhang W, et al. Differentiation of human ligamentum flavum stem cells toward nucleus pulposus-like cells induced by coculture system and hypoxia. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015;40(12): E665–74.
27. Gantenbein B, Illien-Jünger S, Chan SC, Walser J, Haglund L, Ferguson SJ, et al. Organ Culture Bioreactors-Platforms to Study Human Intervertebral Disc Degeneration and Regenerative Therapy HHS Public Access. Vol. 10, *Curr Stem Cell Res Ther*. 2015.
28. Handley C. Mesenchymal stem cell tracking in the intervertebral disc. *World J Stem Cells*. 2015;7(1):65.
29. Bertolo A. HS, TAR, BM, PT, SF, and SJ. Injectable Microcarriers as Human Mesenchymal Stem Cell Support and Their Application for Cartilage and Degenerated Intervertebral Disc Repair. *European Cells and Materials*. 2015; 29:70–81.

30. Liu C, Guo Q, Li J, Wang S, Wang Y, Li B, et al. Identification of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells. *PLoS One*. 2014 Sep 26;9(9).
31. News N. Holy Carp, I'm a Patient! CURRENT CONCEPTS Biologic Treatments for Discogenic Low Back Pain Imaging Corner Updates to the Electronic Health Records Incentive Program Advocacy Legislator Physicians Answer Code Blue Call Ethics COI: Biological and Psychological Mechanisms of Bias Online CME: Exercise Lumbar Injections & Cervical Surgery Courses NASS 2012 Registration Opens TM NORTH AMERICAN SPINE SOCIETY THE CLINICAL AND NEWS MAGAZINE FOR SPINE CARE PROFESSIONALS Spine Across the Sea [Internet]. Available from: www.surgitel.com
32. Potier E. DVS, DV and IK. Potential application of Notochordal Cells for Intervertebral Disc Regeneration: an in vitro assessment. *European Cells and Materials*. 2014; 28:68–81.
33. pang Xiaodong MD YHP and PBMP. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of chronic discogenic low back pain. *Pain Physician*. 2014; 17:525–30.
34. Yim RLH, Lee JTY, Bow CH, Meij B, Leung V, Cheung KMC, et al. A systematic review of the safety and efficacy of mesenchymal stem cells for disc degeneration: Insights and future directions for regenerative therapeutics. Vol. 23, *Stem Cells and Development*. Mary Ann Liebert Inc.; 2014. p. 2553–67.
35. Subhan RA, Puvanan K, Murali MR, Balaji Raghavendran HR, Shani S, Abdullah BJJ, et al. Fluoroscopy assisted minimally invasive transplantation of allogenic mesenchymal stromal cells embedded in hystem reduces the progression of nucleus pulposus degeneration in the damaged interverbal disc: A preliminary study in rabbits. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
36. Park SH, Gil ES, Cho H, Mandal BB, Tien LW, Min BH, et al. Intervertebral disk tissue engineering using biphasic silk composite scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2012 Mar 1;18(5–6):447–58.
37. Oehme D, Goldschlager T, Ghosh P, Rosenfeld J V., Jenkin G. Cell-based therapies used to treat lumbar degenerative disc disease: A systematic review of animal studies and human clinical trials. Vol. 2015, *Stem Cells International*. Hindawi Limited; 2015.
38. Abbushi A, Endres M, Cabraja M, Kroppenstedt SN, Thomale UW, Sittering M, et al. Regeneration of Intervertebral Disc Tissue by Resorbable Cell-Free Polyglycolic Acid-Based Implants in a Rabbit Model of Disc Degeneration. Vol. 33, *SPINE*.
39. Tian P, Li ZJ, Fu X, Ma XL. Role of interleukin-17 in chondrocytes of herniated intervertebral lumbar discs. *Exp Ther Med*. 2015;10(1):81–7.
40. Rosenzweig DH, Carelli E, Steffen T, Jarzem P, Haglund L. 3D-printed ABS and PLA scaffolds for cartilage and nucleus pulposustissue regeneration. *Int J Mol Sci*. 2015 Jul 3;16(7):15118–35.
41. Hegewald AA, Endres M, Abbushi A, Cabraja M, Woiciechowsky C, Schmieder K, et al. Adequacy of herniated disc tissue as a cell source for nucleus pulposus regeneration: Laboratory investigation. *J Neurosurg Spine*. 2011 Feb;14(2):273–80.
42. Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, Hutton WC, Alasevic OJ. Clinical experience in cell-based therapeutics: Disc chondrocyte transplantation. *A*

- treatment for degenerated or damaged intervertebral disc. *Biomol Eng.* 2007;24(1 SPEC. ISS.):5–21.
43. Risbud M V., Schoepflin ZR, Mwale F, Kandel RA, Grad S, Iatridis JC, et al. Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: Recommendations of the spine research interest group at the 2014 annual ORS meeting. *Journal of Orthopaedic Research.* 2015 Mar 1;33(3):283–93.
 44. Chen M, Li S, Xie W, Wang B, Chen D. Col2CreER T2 , A MOUSE MODEL FOR A CHONDROCYTE-SPECIFIC AND INDUCIBLE GENE DELETION.
 45. Johnson ZI, Shapiro IM, Risbud M V. Extracellular osmolarity regulates matrix homeostasis in the intervertebral disc and articular cartilage: Evolving role of TonEBP. Vol. 40, *Matrix Biology.* Elsevier; 2014. p. 10–6.
 46. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. Vol. 39, *Matrix Biology.* Elsevier B.V.; 2014. p. 25–32.
 47. Liang QQ, Ding DF, Xi ZJ, Chen Y, Li CG, Liu SF, et al. Protective Effect of ligustrazine on lumbar intervertebral disc degeneration of rats induced by prolonged upright posture. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2014;2014.
 48. Jin L, Liu Q, Scott P, Zhang D, Shen F, Balian G, et al. Annulus fibrosus cell characteristics are a potential source of intervertebral disc pathogenesis. *PLoS One.* 2014 May 5;9(5).
 49. Xiong C, Huang B, Cun Y, Aghdasi BG, Zhou Y. Migration inhibitory factor enhances inflammation via CD74 in cartilage end plates with Modic Type 1 changes on MRI. *Clin Orthop Relat Res.* 2014;472(6):1943–54.
 50. Wang Z, Weitzmann MN, Sangadala S, Hutton WC, Yoon ST. Link protein N-terminal peptide binds to bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor and drives matrix protein expression in rabbit intervertebral disc cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2013 Sep 27;288(39):28243–53.
 51. Toh WS, Foldager CB, Olsen BR, Spector M. Basement membrane molecule expression attendant to chondrogenesis by nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research.* 2013 Jul;31(7):1136–43.
 52. Ellman MB, Kim JS, An HS, Kroin JS, Li X, Chen D, et al. The pathophysiologic role of the protein kinase C δ pathway in the intervertebral discs of rabbits and mice: In vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Arthritis Rheum.* 2012 Jun;64(6):1950–9.
 53. Power KA, Grad S, Rutges JPHJ, Creemers LB, Van Rijen MHP, O’Gaora P, et al. Identification of cell surface-specific markers to target human nucleus pulposus cells: Expression of carbonic anhydrase XII varies with age and degeneration. *Arthritis Rheum.* 2011 Dec;63(12):3876–86.
 54. Gilchrist CL, Darling EM, Chen J, Setton LA. Extracellular matrix ligand and stiffness modulate immature nucleus pulposus cell-cell interactions. *PLoS One.* 2011 Nov 7;6(11).
 55. Liu LT, Huang B, Li CQ, Zhuang Y, Wang J, Zhou Y. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate. *PLoS One.* 2011 Oct 18;6(10).

56. Li ZY, Xiong SH, Hu M, Zhang C Sen. Epithelial Membrane Protein 1 Inhibits Human Spinal Chondrocyte Differentiation. *Anatomical Record*. 2011 Jun;294(6):1015–24.
57. Liang QQ, Li XF, Zhou Q, Xing L, Cheng SD, Ding DF, et al. The expression of osteoprotegerin is required for maintaining the intervertebral disc endplate of aged mice. *Bone*. 2011 Jun 1;48(6):1362–9.
58. Yang Z, Huang CYC, Candiotti KA, Zeng X, Yuan T, Li J, et al. Sox-9 facilitates differentiation of adipose tissue-derived stem cells into a chondrocyte-like phenotype in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*. 2011 Aug;29(8):1291–7.
59. Hamilton DJ, Séguin CA, Wang J, Pilliar RM, Kandel RA. Formation of a nucleus pulposus-cartilage endplate construct in vitro. *Biomaterials*. 2006 Jan;27(3):397–405.
60. Kwon YJ, Lee JW, Moon EJ, Chung YG, Kim OS, Kim HJ. Anabolic effects of peniel 2000, a peptide that regulates TGF- β 1 signaling on intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013 Jan 15;38(2).
61. Gui K, Ren W, Yu Y, Li X, Dong J, Yin W. Inhibitory effects of platelet-rich plasma on intervertebral disc degeneration: A preclinical study in a rabbit model. *Medical Science Monitor*. 2015 May 12;21:1368–75.
62. Obata S, Akeda K, Imanishi T, Masuda K, Bae W, Morimoto R, et al. Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular puncture model: a preclinical study [Internet]. 2012. Available from: <http://arthritis-research.com/content/14/6/R241>
63. Wang SZ, Rui YF, Tan Q, Wang C. Enhancing intervertebral disc repair and regeneration through biology: platelet-rich plasma as an alternative strategy [Internet]. Available from: <http://arthritis-research.com/content/15/5/220>
64. Tuakli-Wosornu YA, Terry A, Boachie-Adjei K, Harrison JR, Gribbin CK, LaSalle EE, et al. Lumbar Intradiskal Platelet-Rich Plasma (PRP) Injections: A Prospective, Double-Blind, Randomized Controlled Study. *PM and R*. 2016 Jan 1;8(1):1–10.
65. Kim HJ, Yeom JS, Koh YG, Yeo JE, Kang KT, Kang YM, et al. Anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma on nucleus pulposus cells with response of TNF- α and IL-1. *Journal of Orthopaedic Research*. 2014 Apr;32(4):551–6.
66. Pirvu TN, Schroeder JE, Peroglio M, Verrier S, Kaplan L, Richards RG, et al. Platelet-rich plasma induces annulus fibrosus cell proliferation and matrix production. *European Spine Journal*. 2014;23(4):745–53.
67. Gullung GB, Woodall JW, Tucci MA, James J, Black DA, Mcguire RA. Evidence-Based Spine-Care Journal Original Research-Platelet-rich plasma effects on degenerative disc disease (...). Vol. 2. 2011.
68. Chen WH, Liu HY, Lo WC, Wu SC, Chi CH, Chang HY, et al. Intervertebral disc regeneration in an ex vivo culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(29):5523–33.
69. Hou Y, Shi G, Shi J, Xu G, Guo Y, Xu P. Study design: in vitro and in vivo assessment of bone morphogenic protein 2 combined with platelet-rich plasma on treatment of disc degeneration. *Int Orthop*. 2016 Jun 1;40(6):1143–55.
70. Mietsch A, Neidlinger-Wilke C, Schrezenmeier H, Mauer UM, Friemert B, Wilke HJ, et al. Evaluation of platelet-rich plasma and hydrostatic pressure regarding

- cell differentiation in nucleus pulposus tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2013;7(3):244–52.
71. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, Imai Y, Okuma M, Thonar EJ, et al. A Novel Rabbit Model of Mild, Reproducible Disc Degeneration by an Annulus Needle Puncture: Correlation Between the Degree of Disc Injury and Radiological and Histological Appearances of Disc Degeneration. Vol. 30, *SPINE*.
 72. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? Vol. 4, *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2013. p. 303–6.