

Caracterización de células madre de núcleo pulposo de disco intervertebral cervical y comparación con células de médula ósea de los mismos pacientes

Characterization of stem cells from nucleus pulposus of cervical intervertebral disc and compared with bone marrow cells from the same patients

López González D ¹, González Díaz R ¹, Ortega R ³, Muntión S ³, Pescador Hernández D ², Sánchez-Guijo F ³, Blanco JF ²

¹ Hospital Universitario Fundación Alcorcón. Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Alcorcón, Madrid, España.

²IBSAL-Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Salamanca, España. ³IBSAL-Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Unidad de Terapia Celular del Servicio de Hematología, Salamanca.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Evaluar la presencia de células mesenquimales en el núcleo pulposo de disco intervertebral cervical y caracterizarlas comparativamente con las obtenidas de médula ósea de los mismos sujetos.

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

Resultados: Las células de ambos orígenes se diferencian *in vitro* hacia ambos tipos celulares, si bien la diferenciación adipocítica de las células procedentes del disco fue menor que las procedentes de MO. Tampoco se han demostrado diferencias en los marcadores inmunofenotípicos. Las células de ambas fuentes poseen los marcadores inmunofenotípicos característicos de las células mesenquimales.

Conclusión: El NP de disco vertebral cervical degenerado contiene células troncales mesenquimales. Estas células son similares a las células de MO, con la excepción de su capacidad disminuida de diferenciación adipogénica.

Palabras clave:

Células troncales, núcleo pulposo, degeneración discal, terapia celular.

Abstract

Objective: To evaluate the presence of mesenchymal cells in the nucleus pulposus (NP) of cervical discs and characterize them in comparison of those obtained from the bone marrow of the same subjects.

Patients and methods: We have performed a descriptive study with 14 patients requiring cervical fusion surgery. The presence of mesenchymal stem cells (MSCs) were analyzed in the NP from the disk and compared qualitatively with the bone marrow (BM) of the same patients. MSC were isolated and expanded for both NP and MO. We performed *in vitro* differentiation studies of mesenchymal cells from both sources, into osteogenic and adipogenic lines, and flow cytometric immunophenotyping.

Results: We got differentiation towards both cell types, although adipocyte differentiation of disc-derived cells was decreased compared to those from BM. There were no differences in immunophenotypic markers. Cells from both sources have immunophenotypic markers characteristic of mesenchymal cells.

Conclusion: The NP of degenerated cervical disc contains mesenchymal stem cells. These cells are quite similar to BM cells, with the exception of a diminished adipogenic differentiation capacity.

Key words:

Stem cells, nucleus pulposus, disc degeneration, cell therapy.

Correspondencia

D López González
Hospital Universitario Fundación Alcorcón
Budapest 1, 28922, Alcorcón, Madrid, España.
E-mail: dlopezg@fhalcorcon.es

Introducción

Las numerosas patologías cartilaginosas existentes tienen una elevada incidencia en la población mundial: son causa importante de absentismo laboral y generan un gasto sanitario alto. De todas estas enfermedades, se estima que solo la artrosis es responsable del 50% de las enfermedades crónicas en la población envejecida, y en los próximos años se espera que su incidencia sea aún mayor.

El daño discal, centro de nuestro estudio, se produce de forma crónica con la pérdida de su estructura, composición y función, la pérdida de células notocordales que estabilizan la matriz extracelular y la integridad del disco [1]; la pérdida de condrocitos en el núcleo pulposo (NP) y su sustitución por fibroblastos también parece asociada a degeneración precoz [2]. Gracias al avance en investigación, se han desarrollado en los últimos años estudios sobre el potencial tratamiento con estrategias de terapia celular e ingeniería de tejidos con células de diferente origen, desde el cordón umbilical, la placenta o tejidos del adulto como la médula ósea o el tejido adiposo, e incluso también células del propio disco intervertebral [3, 4].

Las células *stem* mesenquimales (MSC) fueron descritas por primera vez por Friedenstein [5] como células no hematopoyéticas que residen en la médula ósea, con aspecto fibroblástico y características de célula *stem*: capacidad de autorrenovación, proliferación y capacidad de diferenciarse a varias líneas de tejido mesodérmico. Se aislaron inicialmente en médula ósea, grasa, músculo, piel, periostio, tendón y tejido nervioso. Su obtención menos traumática en tejido adiposo las ha popularizado como fuente alternativa de estos tipos celulares.

La capacidad de diferenciación hacia estas estirpes mesodérmicas es un requisito exigido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) para que una célula sea considerada mesenquimal [6]. Las MSC pueden representar una herramienta terapéutica que podría aplicarse a diversas enfermedades degenerativas e inmunes debido a su amplia capacidad de autorrenovación, proliferación y multipotencialidad [7]. Las MSC influyen directamente en la homeostasis del hueso. Se ha demostrado que las MSC son capaces de injertarse en hueso y diferenciarse a osteoblastos [8]. Ya existen estudios que previamente han identificado células troncales en los discos intervertebrales (DIV), concretamente en núcleo pulposo (NP) [9,10].

En esta ocasión, dirigimos la investigación a los discos cervicales cuya anatomía y biomecánica condicionan la evolución del disco y su evolución celular de forma particular en el raquis, diferenciando la carga y movilidad a la que son sometidos los DIV en distintas áreas de la columna. El

ejercicio puede estimular la reparación del disco y la proliferación de células madre en modelos animales de forma diferente a lo largo del raquis [11], lo que pone de manifiesto la importancia biomecánica en este proceso.

El NP es avascular, con un ambiente hipóxico, de carga y con una probable merma en su capacidad de regeneración de las células troncales; por lo tanto, uno de los objetivos de la terapia regenerativa es facilitar el ambiente externo adecuado y estimular la proliferación celular desde el lugar inicial de la lesión, introduciendo MSC en el disco, buscando su capacidad regenerativa.

Hasta hace poco tiempo se creía que las células troncales adultas, presentes en un determinado tejido, solo se diferenciaban dando lugar exclusivamente a los tipos celulares propios de dicho tejido. Sin embargo, actualmente se ha puesto de manifiesto que en los seres vivos adultos existen varios tipos de células troncales, capaces de encontrarse localizadas en un tejido y generar células especializadas de otro diferente [12]. Por ello, el hecho de que podamos aislar células madre similares a las MSC en discos degenerados apoyaría la hipótesis de una potencial regeneración celular discal a través de MSC de este u otro origen. Dichas células pueden ser cultivadas y expandidas *in vitro*, manteniendo su capacidad de diferenciación [13]. En los últimos años, varios grupos han investigado el potencial de las MSC en la reparación y regeneración de tejidos, dejando patente la capacidad de diferenciación de estas células a lo largo de varias rutas definidas *in vitro*, en concreto para reparar patología traumatológica como el hueso [14], el cartílago, el músculo y los tendones, siendo los resultados preliminares prometedores.

El objetivo de nuestro estudio fue identificar la presencia de células madre en núcleo pulposo de discos intervertebrales cervicales degenerativos y compararlas con las de su MO.

Material y métodos

Se realizó el estudio en un grupo de 14 pacientes seleccionados, sometidos a cirugía vertebral por patología degenerativa (discopatía), obteniendo, previo consentimiento informado, el material extraído del disco cervical, que normalmente se desecha, así como 5- 10 ml de aspirado de la MO. Las muestras se procesaron según procedimientos estándar establecidos para la obtención de MSC, como nuestro grupo ha publicado previamente [9].

El material discal fue disociado mecánica y enzimáticamente y, posteriormente, cultivado en medio estándar DMEM, con 10% de suero bovino fetal, y se obtuvieron células mononucleadas de la MO tras centrifugación en gradiente de densidad y posterior cultivo con el mismo me-

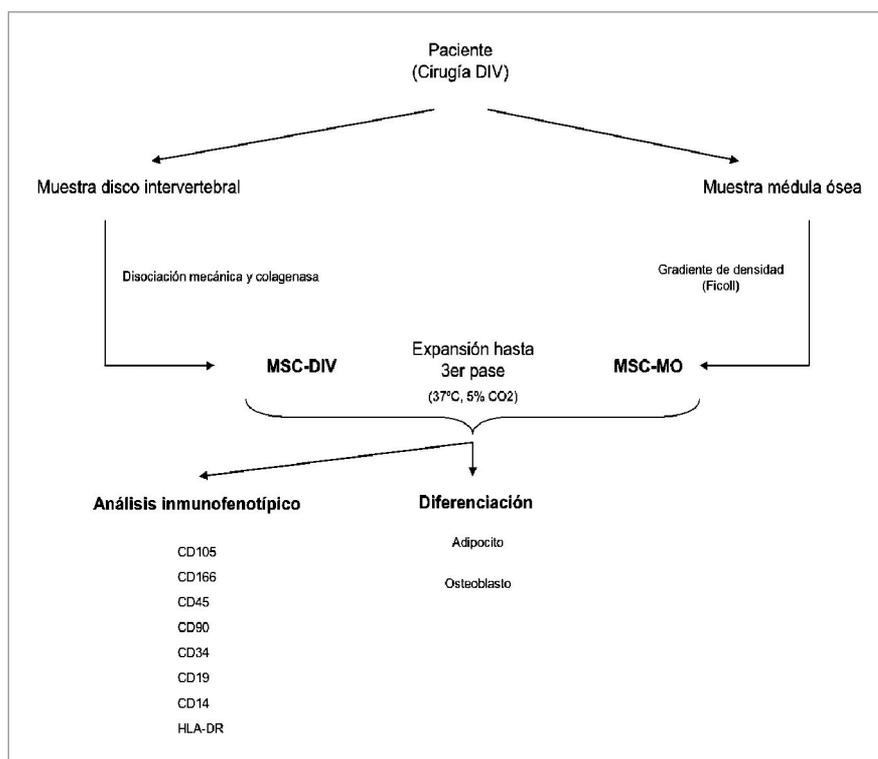


Fig. 1. Diseño del estudio

dio antes mencionado. Se evaluó la capacidad proliferativa *in vitro* de las MSC de ambos orígenes. Tras tres pases en cultivo, las MSC obtenidas de ambas fuentes fueron procesadas para su análisis morfológico e inmunofenotípico, y se comprobó la capacidad de diferenciación multilineal (adipocito, osteoblasto) en ambos casos. (Figura 1).

Los pacientes incluidos en el estudio tenían edades comprendidas entre 40 y 70 años, que precisaron una cirugía cervical causada por mielopatía o radiculopatía, con degeneración discal cervical, en el Hospital Universitario Fundación de Alcorcón, a los que se les realizó una artrodesis cervical intersomática por vía anterior, utilizando autoinjerto. Se anotó edad, sexo, indicación quirúrgica, nivel fusionado cervical y el grado de afectación discal según la escala de Griffith [15]. (Figura 2).

La media de edad de los pacientes intervenidos fue de 48 años (rango: 34-74) y la relación mujer/hombre fue 8/6. Once pacientes (79%) fueron intervenidos por radiculopatía (RP) y otros tres (21%) por mielopatía (MP). Los niveles de fusión, son 6 C5-C6 (43%), 5 C5-C6-C7 (36%), 2 C4-C5-C6-C7(14%) y 1 C4-C5-C6 (7%). (Tabla 1).

Las 14 muestras pareadas de tejido, procedente del disco intervertebral y de aspirado medular del mismo sujeto, de las que se han obtenido células mesenquimales de ambas fuentes, se procesaron en la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca. En cuatro casos, pro-

bablemente por la escasa cantidad de la muestra obtenida o por un problema en el establecimiento del cultivo primario, no se dispone de las muestras pareadas de ambas fuentes. En todos los casos restantes las células MSC de disco intervertebral y las de médula ósea se aislaron y expandieron adecuadamente hasta el tercer pase.

Coordinados con el Servicio de Hematología y la empresa de transporte, se programó la realización de un paciente por día quirúrgico. Todas las cirugías se realizaron por el mismo equipo quirúrgico. Se extrajeron 5-10 ml de médula ósea mediante un trócar y se repartieron en dos tubos/paciente heparinizados y un único disco/paciente en un bote

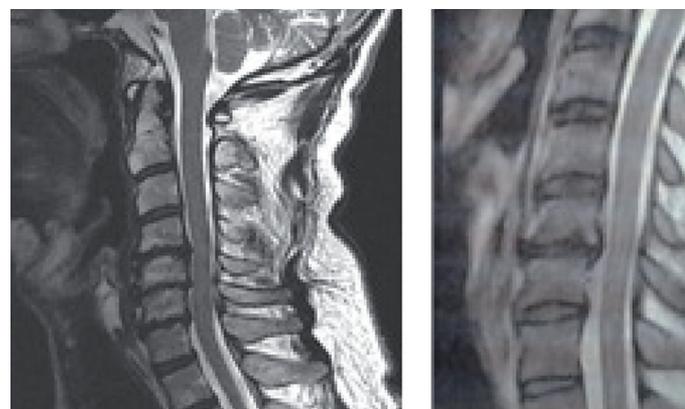


Fig. 2. Discopatía degenerativa.

Tabla 1. Datos recogidos de los pacientes intervenidos

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

(MP: Mielopatía, RP: Radiculopatía, Nivel Iqx: nivel quirúrgico)

con medio RPMI (medio Roswell Park Memorial Institute) añadido (Figura 3). Todo era conservado en nevera 4-8° C hasta la llegada al laboratorio, donde fueron procesadas como se resume a continuación:

1. *Aislamiento de MSC en NP.* La muestra del núcleo pulposo se disoció mecánicamente en la campana de flujo laminar y posteriormente fue digerida en presencia de una solución con 0,02% de colagenasa durante 1 hora en agitación a 37° C, con 5% de CO₂. Las células obtenidas fueron incubadas y subcultivadas.
2. *Aislamiento de MSC en MO.* Con respecto a las células procedentes del aspirado de cresta ilíaca, se procesaron de acuerdo con el procedimiento estándar. Tras centrifugación en gradiente de densidad, las células mononucleadas fueron expandidas. Durante la expansión *in vitro*

hasta el tercer pase, se evaluaron las características morfológicas de las células. Tras alcanzar el tercer pase, se procedió a los distintos estudios (inmunofenotipo y diferenciación).

3. *Inmunofenotipo por citometría de flujo.* Las MSC obtenidas de ambas localizaciones fueron incubadas con los siguientes anticuerpos monoclonales: CD90, CD14, CD73, CD106, CD166, HLA-DR, CD45, CD34 CD19 y CD105. Las muestras fueron procesadas tal y como se ha descrito previamente [9, 16]. Posteriormente, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur y analizadas con el *software* Infinicyt (Cytognos).
4. *Diferenciación multilineal de MSC.* Para la diferenciación a adipocito y osteoblasto, de cada muestra se sembraron cuatro placas de cultivo de 9,6 cm² de superficie



Fig. 3. Intervención quirúrgica, material de extracción y conservación de tejido.

del tipo *chamber slide*, a razón de 5×10^3 células/cm², incubándose hasta obtener una confluencia del 80%. De estas placas, dos se usaron para la diferenciación adipocito y dos para la de osteocito. En el caso de la diferenciación a osteocito se incubaron con medio de diferenciación «NH Osteodiff Medium», cambiando el medio cada 3-4 días. Se comprobó la diferenciación osteogénica mediante tinción con fosfatasa alcalina. Para la diferenciación a adipocito, las muestras se incubaron en el mismo tipo de placas, pero con medio de diferenciación «NH Adipodiff Medium» en las mismas condiciones (37° C y 5% CO₂) durante 21 días. Se comprobó la diferenciación mediante tinción de rojo al aceite (*Oil-Red*), como se ha publicado previamente [9].

Se utilizó la versión 15.0 del SPSS (Chicago IL) para el análisis estadístico. Para cada variable, mediana, rango o media se calcularon \pm dos desviaciones estándar. Para explorar las diferencias de cualquier variable entre MSC de disco intervertebral y MSC de médula ósea utilizamos la prueba no paramétrica U-Mann-Whitney. Además, para encontrar diferencias en cualquier variable entre las MSC del mismo individuo pero de ambas muestras se utilizó el *Wilcoxon signed-rank test*. Las diferencias encontradas fueron significativas para una $p < 0,05$.

Resultados

En todos los casos se aislaron y expandieron MSC, tanto de DIV como de MO. En el caso de MSC-NP, se observó una capa de células mononucleares (CMN) adheridas después de dos días del cultivo celular inicial. El tiempo para llegar a la confluencia en cada pase fue similar en ambos grupos. En cuanto a la morfología, las células de DIV y MO exhiben la característica forma de huso en el cultivo, aunque las primeras eran ligeramente más pequeñas (Figura 4).

De los estudios de diferenciación multilineal de las células mesenquimales de ambas fuentes hacia osteoblasto y adipocito se obtuvo, en todos los casos, la diferenciación hacia ambos tipos celulares, si bien la diferenciación adipocítica de las células procedentes del disco es mucho menor que las procedentes de la médula ósea (Figura 5).

Tampoco se encontraron diferencias en los marcadores inmunofenotípicos (Figuras 6 y 7). Las células de ambos orígenes poseen los marcadores inmunofenotípicos característicos de las MSC, de acuerdo con los criterios de la ISCT [6]. El marcador de células NP maduras CD24 [17] fue negativo en todos los casos. MSC-NP fueron positivas para CD90, CD73, CD105 y CD166, con positividad para CD106 tenue, mientras que fueron negativas para el marca-

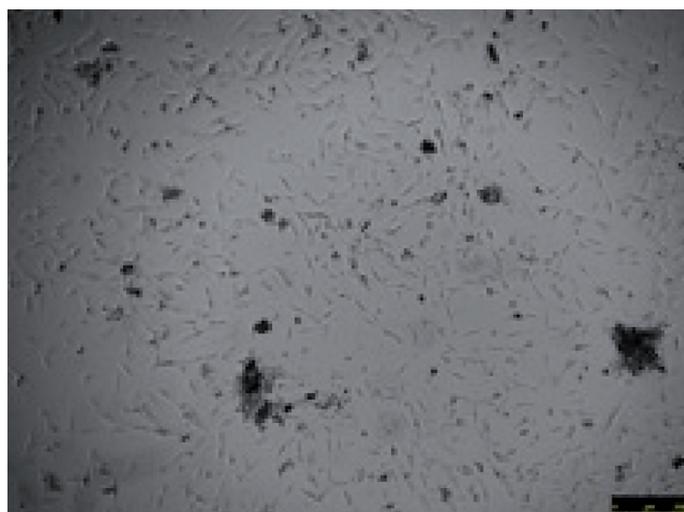


Fig. 4. Morfología de las MSC del disco cervical en pase inicial.

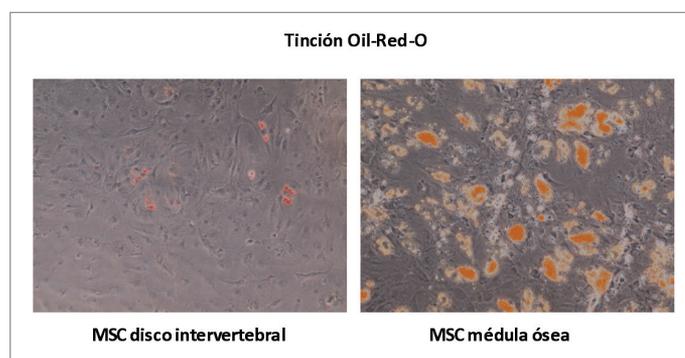


Fig. 5. Diferenciación adipocítica de células procedentes de disco intervertebral y médula ósea.

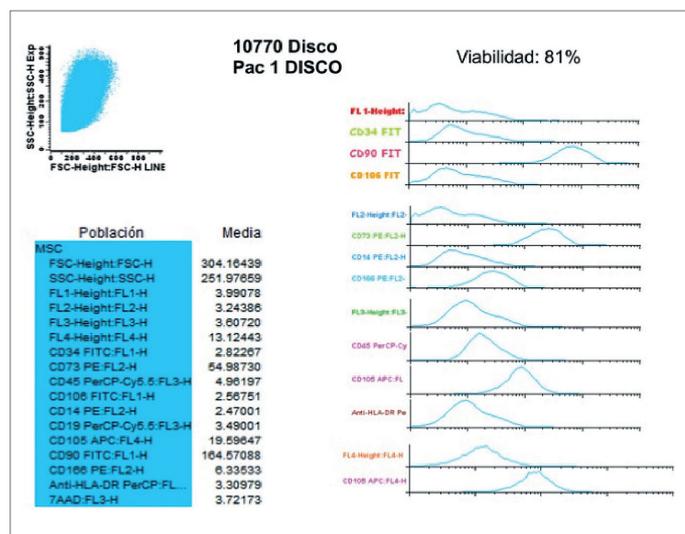


Fig. 6. Marcadores inmunofenotípicos de MSC DIV.

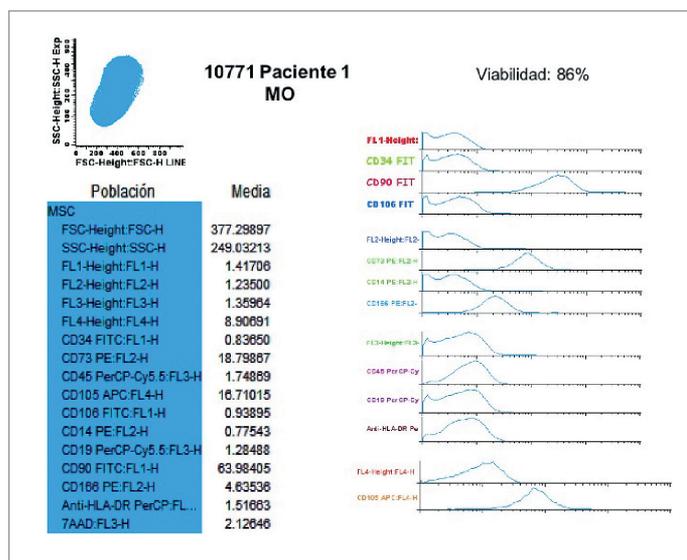


Fig. 7. Marcadores inmunofenotípicos de MSC de médula ósea.

dor panhematopoyético CD45, el marcador de células madre hematopoyéticas CD34, el antígeno monocitario CD14, el marcador de células B CD19, y el antígeno HLA-DR, que es el mismo patrón fenotípico que se muestra en las MSC-MO.

Discusión

Los problemas degenerativos del raquis tienen gran importancia en la sociedad actual, afectando a gran parte de la población, de edad media y avanzada –la mayoría en estos tiempos–, siendo el dolor difícil de controlar y la evolución de la enfermedad difícil de detener. La discopatía degenerativa presenta un origen multifactorial y superamos términos como la deshidratación o la pérdida de altura para explicar este proceso, profundizando en un campo celular y molecular, que nos hará avanzar en un sentido más actual para entender y tratar este problema. Se han identificado la carga, la falta de ejercicio, el tabaco, los traumatismos, la edad y los genes como factores de riesgo, y hasta ahora se ha actuado sobre los factores modificables realizando prevención y tratamiento.

Datos de un estudio realizado en Estados Unidos aportan que la mayoría de los adultos experimentarán dolor de raquis durante su vidas [18]. De acuerdo a los datos de la Encuesta Nacional de Atención Médica Ambulatoria, se estimó que entre 2003 y 2004 hubo 42,4 millones de visitas al médico de atención primaria debidas al dolor de espalda [19]. Se calcula que el 80-90% de personas con experiencia de dolor de espalda tiene una completa resolución dentro de las seis semanas, y solo el 5-10% desarrolla dolor crónico [18].

Las *stem cells* o células troncales que potencialmente se pueden emplear en programas de regeneración discal deberían mostrar capacidad de diferenciación condral [20][21], como ocurre con las células mesenquimales. Las MSC pueden obtenerse de diversas fuentes como tejido adiposo, médula ósea, sinovial y periostio, entre otros, siendo las que poseen mayor capacidad de diferenciación condrogénica las procedentes de sinovial y médula ósea [22]. La capacidad de diferenciación y proliferación de los condrocitos se ve mermada con la edad y por disminución de las telomerasas. Esto explica por qué el ACI (implante de condrocitos autólogos) en edad avanzada genera resultados peores. El efecto de la edad es menor en las MSC, y además permite el uso alogénico, lo que puede contribuir a solventar este potencial problema [23, 24].

En nuestro estudio hemos comparado dos tipos de MSC, procedentes del DIV y de la MO de pacientes intervenidos de cirugía raquídea bajo anestesia general. Esta fuente de obtención nos parece fácil y resulta abundante, ya que cada año se practican en España 21.320 cirugías de estas características.

El segundo elemento fundamental en la ingeniería tisular son las sustancias estimulantes, diferenciadoras y microambientales que logran que las células prediferenciadas se diferencien adecuadamente, proliferen y generen las propiedades necesarias para logran una matriz lo más parecida a la nativa y duradera [25]. Los primeros factores usados fueron el factor de crecimiento transformante beta (TGF-®) y la dexametasona [26]. Para inducir la condrogénesis y así lograr mejorar el microambiente tisular y mantener el fenotipo celular, se ha visto que las MSC por sí mismas pueden contribuir a la reparación tisular, pero con la asociación de factores los resultados mejoran [27]. Otras moléculas investigadas son las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), que incrementan la condrogénesis y aumentan los proteoglicanos, acentuándose más con el subtipo 2 que con el 4 y el 6. Otras moléculas estudiadas son el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), que es un mediador anabólico y mitótico del cartílago que estimula la formación de cartílago y hueso. También el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que estimula las células mesodérmicas especialmente los fibroblastos. Finalmente, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), que potencia la mitosis de los condrocitos. Por el contrario, en algunos estudios se puede apreciar que se puede lograr una satisfactoria regeneración sin incorporar este tipo de factores, siendo suficiente para la reparación la estimulación que ejerce el microambiente local de la lesión sobre el biomaterial o las células administradas [28].

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

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

Risbud *et al.* [10] describen el aislamiento, desde disco degenerado cervical DIV (tanto del anillo fibroso y del NP), de una población de células que se seleccionó después de la expansión *in vitro* en la superficie de plástico, y se describen como células progenitoras esqueléticas o *MSC-like*. Ellos aíslan tales células de disco moderadamente degenerado DIV, lo que sugiere la idea de que la regeneración endógena puede ser promovida por la estimulación de estos progenitores. Nuestros resultados confirman que es posible aislar y expandir las células MSC en una población de pacientes con degeneración discal moderada o severa.

Al comparar las MSC del NP (NP-MS) con las obtenidas a partir de la MO de los mismos sujetos (MO-MS), ambos tipos de células tienen la morfología y el patrón inmunofenotípico característicos, con mínimas diferencias. Algunos marcadores inmunofenotípicos –como CD146– que se ha relacionado con MSC no se incluyeron en nuestro estudio, ya que es específico de autorrenovación de MSC y en la actualidad no se considera en el panel de ISCT fenotípico recomendado [6].

En cuanto a la capacidad de diferenciación, es de gran interés el hecho de que en la mayoría de nuestros pacientes muy pocos NP-MS fueron capaces de adquirir vesículas lipídicas rojas al aceite después de cultivo en medio adipogénico.

Ligeras diferencias en el método de diferenciación o en la fuente de NP, junto con el hecho de que en nuestros discos de trabajo se encontraban en un estado de degeneración más avanzada, pueden dar cuenta de esta alteración en la diferenciación adipogénica, o bien que la limitación de la diferenciación se deba a otros motivos. A este respecto, se debe señalar que, en contraposición a la MO, no hay adipocitos en el medio normal de NP. Los DIV se desarrollan tanto desde el mesénquima embrionario y la notocorda,

aunque el origen de las células NP adultas todavía no está claro. Es bien sabido que las interacciones entre las células madre y su nicho circundante, incluyendo la matriz extracelular, son esenciales para modular no solo su morfología y fenotipo, sino también su función, lo que se ha demostrado recientemente para el NP [29].

El ambiente único del DIV (avascularidad, cargas, ambiente hipóxico, etc.) podría desempeñar un papel importante. En este sentido, algún estudio [30] ha comparado el perfil de expresión génica de las células aisladas a partir de células diferenciadas de NP a partir de MO y las estándar MSC de médula ósea, mostrando alguna diferencia.

La biomecánica del disco depende de su composición y de la organización de su matriz. Por lo tanto, cualquier desorganización en su estructura afectará a su capacidad biomecánica. Las MSC de NP, pese a que la hipoxia es buena para la proliferación de MSC [31] y el disco degenera por ambiente hipóxico, son incapaces de controlar el proceso de degeneración DIV a nivel clínico, ya sea porque están presentes en números bajos en el DIV o porque pueden estar alteradas primaria o secundariamente. Desde MO se puede obtener fácilmente gran número de células de los mismos pacientes, y como hemos visto, son bastante similares a los precursores residentes de la NP. Por tanto, podría ser una fuente alternativa para la terapia celular de la degeneración DIV. Muchos estudios han demostrado la posibilidad de diferenciar MSC en NP con contacto con células de núcleo pulposo [32], incluso es posible que las células mesenquimales de grasa se diferencien también en células parecidas de NP, en contacto con células *stem* de NP [33].

Las causas de esta degeneración discal son aún desconocidas, si bien existen factores de riesgo como la edad, el ambiente mecánico o químico y la genética. Las nuevas líneas de tratamiento de ingeniería tisular están encaminadas a utilizar factores de crecimientos, células y medios de soporte.

Precisamos, además, el análisis en disco sano para tener una referencia con la que comparar todos los estudios y análisis que existen hasta el momento en la literatura científica sobre este tema.

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis. *Exp Cell Res* 1999; 246:129-37.
2. Kim KW, Lim TH, Kim JG, Jeong ST, Masuda K, An HS. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs. *Spine* 2003; 28:982-90.
3. Chun HJ, Kim YS, Kim BK, Kim EH, Kim JH, Do BR, *et al.* Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit Model of traumatic degeneration of lumbar discs. *World neurosurgery*. 2012; 78:364-71.
4. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, Kim JS, Gilberston LG, Kang JD. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2008; 8:888-96.
5. Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 1995; 56(Suppl 1):17.
6. Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-7.
7. Marie PJ, Fromiguet O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med* 2006; 1:539-48.
8. Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, *et al.* Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18:846-58.
9. Blanco JF, Sánchez-Guijo FM, Muntión S, Hernández-Campo P, Santamaría C, Carrancio S, *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects. *Spine* 2010; 35:2259-65.
10. Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, Lee JY, Danielson KG, Vaccaro AR, *et al.* Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc. *Spine* 2007; 32:2537-44.
11. Sasaki N, Henriksson HB, Runesson E, Larsson K, Sekiguchi M, Kikuchi S, *et al.* Physical exercise affects cell proliferation in lumbar intervertebral disc regions in rats. *Spine* 2012; 37:1440-7.
12. Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36:1179-83.
13. Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5:362-9.
14. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair and skeletal regeneration. *J Cell Biochem* 1994; 56: 283-94.
15. Griffith JF, Wang YX, Antonio GE, Choi KC, Yu A, Ahuja AT, *et al.* Modified Pfirrmann grading system for lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine* 2007; 32:708-12.
16. Villarón EM, Almeida J, López-Holgado N, Alcoceba M, Sánchez-Abarca LI, Sánchez-Guijo FM, *et al.* Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004; 89:1421-7.
17. Fujita N, Miyamoto T, Imai J, Hosogana N, Suzuki T, Yagi M, *et al.* CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:1890-6.
18. Manchikanti L. Epidemiology of low back pain. *Pain Phys* 2000; 3:167-92.
19. Licciardone JC. The epidemiology and medical management of low back pain during ambulatory medical care visits in the United States. *Osteopath Med Prim Care* 2008; 2:11.
20. Delamarter RB, Zigler J. Five-year reoperation rates, cervical total disc replacement versus fusion, results of a prospective randomized clinical trial. *Spine* 2013; 38:711-7.
21. Guangdong W, Wei L, Lei C, Xiaoyun W, Tiany L, Yilin C. Repair of porcine articular osteochondral defects in non weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2006; 12:3209-21.
22. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* 2006; 97:84-97.
23. Lee KB, Hui JH, Song IC, Ardany L, Lee EH. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects. A porcine model. *Stem Cells* 2007; 25:2964-71.
24. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:199-206.
25. Vaquero J, Forriol F. Knee chondral injuries: Clinical treatment strategies and experimental models. *Injury* 2012; 43:694-705.
26. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238:265-72.

27. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009; 17:1289-97.
28. Koga H, Muneta T, Ju YJ, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, *et al.* Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* 2007; 25:689-96.
29. Rastogi A, Thakore P, Leung A, Benavides M, Machado M, Morschauer MA, *et al.* Environmental regulation of notochordal gene expression in nucleus pulposus cells. *J Cell Physiol* 2009; 220:698-705.
30. Vadala G, Studer RK, Sowa G, Spiezia F, Iucu C, Denaro V, *et al.* Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion. *Spine* 2008; 33:870-6.
31. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358:948-53.
32. Richardson SM, Walker RV, Parker S, Rhodes NP, Hunt JA, Freemont AJ, *et al.* Intervertebral disc cell mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 2006; 24:707-16.
33. Lu ZF, Zandieh BD, Wuisman PI, Bank RA, Helder NH. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: Configuration effect. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 359:991-6.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.