

INVESTIGACIÓN

Identificación inmunohistoquímica de los fenómenos degenerativos en la hernia de disco lumbar

Expresión de ácido hialurónico, metaloproteasas 1 y 3, factor de crecimiento fibroblástico básico y CD34

E. G. ORTOLAN,* A. G. DELLA VALLE,* H. GARCÍA RIVELLO,** E. MOCETTI,** C. A. SOLA* y M. F. GRUENBERG*

*Instituto de Ortopedia y Traumatología Carlos E. Ottolenghi; **Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Italiano de Buenos Aires, Buenos Aires.

RESUMEN: Los objetivos de este trabajo son identificar los niveles de expresión y distribución de las metaloproteasas (MMP) 1 y 3, observar su efecto sobre el ácido hialurónico (AH), estudiar la respuesta inflamatoria, analizar los procesos de angiogénesis en el disco detectando la proteína CD34 y el factor de crecimiento fibroblástico básico (FCF-b) y relacionar los hallazgos con parámetros clínicos y epidemiológicos de los enfermos. Se analizaron discos intervertebrales obtenidos en 34 discectomías por hernia de disco y de 10 discos control con técnica histológica de rutina y técnicas inmunohistoquímicas contra MMP-1 y MMP-3, AH, CD34 y FCF-b. Se observó aumento significativo del porcentaje de degeneración, vascularización, detección de AH, MMP-1, MMP-3, CD34 y FCF-b en los discos degenerados. Las formas de degeneración más graves se observaron con mayor prevalencia en discos extruidos y secuestrados, lo que sugiere una relación entre las etapas más avanzadas de herniación y las más intensas de degeneración. Los enfermos con antecedentes de tabaquismo presentaron hernias con mayores niveles de expresión de FCF-b, lo que sugiere una asociación entre el hábito de fumar y la intensidad de la respuesta tisular. Se discuten los hallazgos observados con una revisión de la literatura sobre el tema. La degeneración discal estaría producida por fenómenos biológicos que representan una falla en la capacidad de reparación del tejido conectivo especializado.

PALABRAS CLAVE: Disco intervertebral. Degeneración discal. Inmunohistoquímica discal.

IMMUNOHISTOCHEMICAL DETECTION OF DEGENERATIVE PHENOMENA IN LUMBAR DISC HERNIATIONS

ABSTRACT: The aim of the present study is to determine the expression patterns of matrix degrading enzymes, hyaluronic acid, endothelial membrane protein CD34 and beta-basic fibroblast growth factor (beta-BFGF) in human degenerated lumbar disc tissue. Intensity of detection reactions and its location were analyzed together with clinical data. Thirty-four lumbar disc herniations from 34 patients and control tissue from 10 lumbar discs were examined. Histologic analysis with hematoxylin-eosin (H&E) was performed together with detection of hyaluronic acid (HA) (using a biotinylated PG probe), metalloproteinases (MMP) -1 and -3, CD34 and beta-BFGF (using human specific mouse monoclonal antibodies and avidin-biotin-peroxidase complex). The intensity and location of reactions were recorded and compared with age, sex, duration of symptoms, straight leg raising test, macroscopic appearance during surgery and smoking habit. Herniated disc tissue demonstrated increased expression of hyaluronate, MMP-1, MMP-3, beta-BFGF and CD34. Extruded and sequestered disc tissue demonstrated more severe degeneration in the H&E study. Smoking habit correlated positively with the intensity of detection reaction for beta-BFGF. Degenerative changes in herniated lumbar discs represent a complex multistep process characterized by proliferation of blood vessels, changes in the expression of matrix MMPs, and in HA distribution patterns. Our findings suggest that these processes may represent a failure in cellular capability of connective tissue remodeling.

KEY WORDS: Lumbar disc. Disc degeneration. Disc Immunohistochemistry.

Recibido el 28-12-1998. Aceptado luego de la evaluación el 18-2-1999.

Correspondencia:

E. G. ORTOLAN
Servicio de Ortopedia y Traumatología
Hospital Italiano de Buenos Aires
Potosí 4215
(1181) Capital Federal
Argentina

El disco intervertebral debe conjugar resistencia y elasticidad para proveer soporte mecánico, permitir la absorción y dispersión de cargas y colaborar con la movilidad

del segmento vertebral.^{10,11,18,22} Sus propiedades físicas dependen de los colágenos (CO) y de los proteoglicanos (PG) presentes en la matriz extracelular. Los primeros constituyen las principales moléculas estructurales y proveen resistencia a la tensión. Los PG asociados a ácido hialurónico (AH) son macromoléculas de gran poder osmótico, altamente hidratadas, que otorgan resistencia a la compresión. El AH puede ser detectado con alta sensibilidad en el tejido discal utilizando sondas proteicas específicas.²

La enfermedad degenerativa del disco intervertebral es la causa más frecuente de dolor lumbar; sin embargo, su fisiopatología es un tema controvertido.^{22,52} La degeneración es concebida actualmente como el resultado de fenómenos biológicos y mecánicos interrelacionados que alteran el balance entre síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular.^{18,22,36,80}

Los condrocitos tienen una participación fundamental en la patogénesis de esta condición. Estas células producen enzimas proteolíticas responsables de la degradación de los componentes de la matriz extracelular: serínproteasas, cisteínproteasas, aspartatoproteasas y metaloproteasas (MMP). La MMP-1 degrada CO fibrilar y la MMP-3 degrada PG y glucoproteínas no colágenas. Las MMP pueden ser detectadas mediante técnicas inmunohistoquímicas con gran especificidad y sensibilidad.^{7,39,54,82,86}

La actividad de las MMP es necesaria para numerosos procesos fisiológicos en tejidos de origen mesodérmico vinculados con la remodelación tisular y angiogénesis; sin embargo, se detecta en numerosos procesos patológicos como la degeneración discal.^{7,22,39,80,82}

El disco intervertebral del adulto es avascular; sin embargo, su degeneración se acompaña de neovascularización a partir de vasos epidurales.^{10,11,19,20,27,37,52,58,76,77} Este hallazgo también se observa en los secuestros.^{14,16,27,84,86}

La proteína CD34 es un marcador utilizado para estudiar procesos de angiogénesis. Es expresada por las células endoteliales y puede ser detectada por métodos inmunohistoquímicos con elevada especificidad y sensibilidad.

En contraposición con las teorías que interpretaban la degeneración discal como un fenómeno de autoinmunidad,^{3,15,19,20,45,53} se considera que el condrocito del disco intervertebral es afectado por factores mecánicos y bioquímicos locales proinflamatorios que inducen la producción de enzimas degradativas de la matriz. Estas últimas promueven la migración de células inflamatorias y la neovascularización²⁵ que forman parte del proceso de degeneración.

El factor básico de crecimiento fibroblástico (FCF-b), un mediador liberado durante la respuesta inflamatoria, estimula la fibrogénesis y la proliferación y la migración de células endoteliales (angiogénesis). El endotelio puede producir y liberar este factor de crecimiento ante estímulos como el traumatismo y la inflamación. El FCF-b actúa en forma autocrina. Su actividad se ha demostrado en nu-

merosas condiciones fisiológicas y patológicas y recientemente en el disco intervertebral.^{21,71,78}

La hipótesis de este trabajo es que enzimas vinculadas con la degradación de los tejidos conectivos especializados como las MMP serían responsables de la degradación de la matriz extracelular en la degeneración del disco intervertebral y que este fenómeno sucedería en el contexto de una reacción inflamatoria con neovascularización. Para respaldar esta hipótesis, se caracterizarán los aspectos más relevantes de la enfermedad degenerativa del disco intervertebral en material obtenido en cirugía.

Los objetivos de este trabajo son: 1) identificar los niveles de expresión y distribución de MMP-1 y -3, 2) observar en forma indirecta su efecto sobre componentes de matriz extracelular (AH), 3) analizar la intensidad de respuesta inflamatoria, 4) evaluar los procesos de angiogénesis en el fibrocartilago, identificando vasos de neoformación (CD34) y mediadores responsables de la angiogénesis (FCF-b) y 5) relacionar los hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos con parámetros clínicos y epidemiológicos de los enfermos.

Materiales y métodos

Se estudió un grupo de 34 discectomías quirúrgicas lumbares consecutivas en 31 pacientes con diagnóstico de hernia de disco. El grupo estaba compuesto por 24 hombres y 10 mujeres con una edad promedio de 48 años (rango, 26-84 años). Todas las discectomías comprendieron un nivel: L2-L3 en 1 caso, L3-L4 en 3, L4-L5 en 13 y L5-S1 en 17. En 31 pacientes la discectomía fue primaria y en 3 casos, recidiva. Ningún enfermo recibió corticoides epidurales previos a la cirugía.

El día anterior a la cirugía se registró el tiempo de duración del dolor, la presencia de signo de Laségue o Wasserman y el déficit neurológico motor y sensitivo. Se interrogó el antecedente de tabaquismo (Tabla).

Se clasificaron los hallazgos operatorios de acuerdo con lo propuesto por Sprangfort: protrusión discal, extrusión o secuestro.⁶¹

Se utilizaron diez discos intervertebrales de control obtenidos en autopsias y cirugías de enfermos sin patología discal.

El material discal obtenido fue fijado en formol tamponado al 10%, procesado por método de rutina e incluido en parafina. Se realizaron cortes histológicos y se colorearon con hematoxilina-eosina (H&E).

Fueron evaluadas al menos dos secciones de cada muestra y entre 20 y 40 campos de gran aumento (400x) en cada preparado teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

a) **Degeneración de la matriz cartilaginosa:** expresión morfológica de cambios en la composición de la sustancia fundamental (deshidratación, disminución de AH y PG) y en el tipo y cantidad de CO. Se consideró la presencia de degeneración al observar pérdida de la estructura normal de la matriz extracelular cartilaginosa y cambios en su coloración. Se la clasificó en los siguientes tipos: cambios fibrilares, mixoides y mucoides. Los grados de degeneración se cuantificaron en todo el material procesado, registrándose porcentajes relativos de los diferentes tipos de alteraciones.

b) **Proliferación condrocitaria:** se analizó la cantidad de condrocitos por grupo isógeno.

c) **Proliferación fibroblástica:** se evaluó el reemplazo del cartilago normal o con cambios degenerativos por una proliferación de fibroblastos y/o miofibroblastos. Para el análisis se utilizó una estimación

Tabla. Datos epidemiológicos, clínicos y hallazgos quirúrgicos, histológicos e inmunohistoquímicos en las muestras correspondientes a discos degenerados (hernias de disco)

Caso	E	S	Clinica	Sint.	L-W	D	N	H	T	R	% degen.	Mixoides	Fibrilar	Mucoide	P F	Inf. Inf.	Vasos	MMP-1	MMP-3	FCF-b	AH1	AH2	AH3	CD34
1	84	M	LCrI	3		S	3	P	N	N	80	90	10	0	(-)	(-)	(-)	30	0	0	0	(++)	(+)	(+)
2	42	M	LCrD	0,5		S	4	E	N	N	90	40	50	10	(-)	(-)	(-)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)
3	65	F	LCD	1	25	S	4	P	N	N	80	30	70	0	(+)	(-)	(+)	80	0	0	0	(+)	(++)	(+)
4	34	M	LCI	9	40	S	4	E	S	N	80	25	70	5	(+)	(-)	(++)	20	2	3	0	(++)	(+)	(+)
5	43	M	LCI	3	70	S	5	E	S	N	80	0	100	0	(+)	(-)	(+)	80	10	10	0	(++)	(+++)	(+)
6	29	F	LCD	0,5	45	S	5	E	N	N	80	40	60	0	(-)	(-)	(-)	60	3	0	0	(+)	(+/-)	(-)
7	47	M	LCI	1	45	S	5	E	S	N	70	0	100	0	(-)	(-)	(++)	5	0	3	(+)	(+)	(++)	(+)
8	42	M	LCD	0,8	45	S	5	E	S	N	80	0	100	0	(+)	(-)	(-)	0	0	0	(+)	(+)	(+)	(+)
9	46	M	LCrD	1		S	2	E	S	N	60	20	80	0	(+++)	(-)	(++)	50	0	0	(+)	(++)	(+)	(+)
10	32	M	LCI	4	30	S	4	E	N	N	70	40	60	0	(+)	(+)	(++)	20	0	0	0	(+)	(+)	(+)
11	44	F	LCI	1,5	40	S	5	E	N	N	70	50	30	20	(-)	(-)	(-)	30	30	0	0	(+)	(++)	(+)
12	47	F	LCI	12	40	S	5	P	S	N	80	10	50	40	(+)	(-)	(-)	80	10	4	0	0	(+)	(+)
13	60	F	LCI	2	30	S	5	E	N	N	75	20	70	10	(+)	(-)	(+)	10	3	0	0	0	0	(-)
14	32	M	LCI	1	40	S	4	E	N	S	85	15	80	5	(++)	(+)	(+++)	90	5	0	0	0	0	(+)
15	44	M	LCD	3	20	S	5	P	N	N	90	10	90	0	(-)	(-)	(-)	0	0	0	0	0	0	(-)
16	26	M	LCI	5	20	S	5	P	N	N	100	10	10	80	(++)	(+)	(++)	2	0	25	(+)	(+)	(-)	(-)
17	62	F	LCD	1,5		N	S	4	E	N	90	10	90	0	(+++)	(++)	(++)	20	2	0	0	(+)	0	(+)
18	30	M	LCI	48	30	S	5	E	S	S	90	60	30	10	(+)	(-)	(+)	20	0	0	0	(+)	(++)	(+)
19	52	M	LCD	24	30	S	5	E	N	N	80	10	80	10	(+)	(-)	(-)	50	0	2	(+)	(+)	0	(-)
20	40	F	LCI	5	45	S	5	E	S	N	70	90	10	0	(-)	(-)	(-)	0	0	2	0	0	0	(+)
21	53	M	LCrD	2		S	3	E	S	N	80	80	20	0	(-)	(-)	(+)	30	2	0	0	(+)	(+)	(+)
22	70	M	LCD	0,5	50	S	3	E	N	N	70	10	90	0	(++)	(-)	(+)	2	4	0	(++)	0	0	(-)
23	67	M	LCI	0,7	70	S	5	E	N	N	90	50	50	0	(-)	(-)	(-)	3	1	0	0	(+)	0	(-)
24	32	M	LCI	4	30	S	4	E	N	S	80	20	80	0	(+)	(-)	(-)	20	0	3	0	0	0	(-)
25	39	M	LCI	0,7	45	S	5	P	S	N	80	60	30	10	(-)	(-)	(-)	3	0	2	0	0	0	(-)
26	38	F	LCI	2	45	S	5	E	N	N	70	10	90	0	(+)	(-)	(+)	15	5	1	0	0	(++)	(+)
27	78	F	LCI	7	45	S	4	E	N	N	80	40	60	0	(-)	(-)	(++)	10	1	0	(++)	(+)	0	(-)
28	72	M	LCI	2	45	S	4	E	N	N	90	0	100	0	(+)	(+)	(+)	4	1	2	0	0	0	(+)
29	64	M	LCI	12		S	4	E	N	N	70	0	100	0	(+)	(-)	(-)	10	0	0	0	(+)	0	(-)
30	40	M	LCD	120	20	S	5	E	N	N	80	10	80	10	(-)	(-)	(-)	10	30	0	0	0	(+)	(+)
31	53	M	LCrD	12		S	4	P	N	N	80	20	80	0	(++)	(+)	(+++)	0	0	0	0	(+)	(+)	(+)
32	40	F	LCD	10	70	S	5	P	S	N	90	50	50	0	(-)	(-)	(+)	80	0	30	(+)	0	0	(-)
33	35	M	LCD	6	45	S	4	E	S	N	90	30	60	10	(-)	(-)	(-)	50	1	0	0	(++)	(+)	(+)
34	41	M	LCI	10	45	S	4	E	N	N	80	20	70	10	(+)	(-)	(+)	80	0	0	(+)	(++)	(++)	(+)

E = edad; S = sexo; M = masculino; F = femenino; LC = lumbociática; LCr = lumbocuralgia; L-W = Laségue-Waserman; N = nivel operado; H = hallazgo intraquirúrgico; P = protrusión; E = extrusión o secuestro; T = tabaquismo; S = sí; N = no; R = recidiva; % degen. = proporción de degeneración; Fibrilar = proporción de degeneración fibrilar; Mucoide = proporción de degeneración mucoide; Mixoides = proporción de degeneración mixoides; PF = proliferación fibroblástica; Inf. Inf. = infiltrados inflamatorios; AH1 = AH en área 1; AH2 = AH en área 2; AH3 = AH en área 3.

semicuantitativa: *frecuentes* (+++): más de 5 campos con cúmulos de 10 o más fibroblastos; *moderados* (++) : 3 a 5 campos similares; *aislados* (+): 1-2 campos similares; y *ausentes* (0): ausencia de proliferación fibroblástica

d) **Presencia y tipo de infiltrados inflamatorios (linfocitario, histiocitario o polimorfonuclear):** fue analizada utilizando una estimación semicuantitativa: *intensos* (+++): más de 5 campos con más de 5 células inflamatorias; *moderados* (++) : hallazgos similares en 5 a 3 campos; *aislados* (+): hallazgos similares en 1 a 2 campos; y *ausentes* (0): sin infiltrados inflamatorios.

e) **Neovascularización del disco:** fue evaluada utilizando análisis *semicuantitativo*: *frecuentes* (++) : vasos y capilares en 3 a 5 campos; *aislados* (+): hallazgos similares en 1 a 2 campos; y *ausentes* (0): ausencia de proliferación vascular.

Se definieron territorios histológicos del fibrocartilago: área 1 a los condrocitos, área 2 a la matriz pericondrocitaria (matriz extraterritorial densa) y área 3 a la matriz extracelular alejada de los condrocitos (matriz intraterritorial homogénea).

Se efectuaron secciones histológicas seleccionadas de acuerdo con lo observado en los cortes de rutina que fueron montados en por-

taobjetos salinizados para realizar inmunomacerasiones.

Se realizaron marcaciones para AH utilizando una sonda de proteoglicanos biotinilados (b-PG) que se une específicamente al AH libre del tejido (cortesía del doctor C. Underhill, Washington D.C. University, Cell. Biol. Dept.).^{2,23} Luego de la desparafinización e hidratación, se incubaron las secciones durante 20 minutos en agua oxigenada al 5% con metanol para suprimir la actividad de las peroxidases endógenas. Luego los cortes se incubaron durante 1 hora con 8 ug/ml de b-PG en 10% de suero normal y 90% de PBS libre de calcio y magnesio, previo bloqueo de la unión proteica inespecífica con suero normal al 10% en PBS. Los lavados se realizaron con PBS a un pH de 7,2. Finalmente, se incubaron durante 30 minutos con estreptovidina conjugada con peroxidasa (1/500) (Multilink, Biogenex Diagnostics, San Ramón, California, EE.UU.), empleando diabcidina como cromógeno. Se utilizaron como controles positivos cortes de cordón umbilical que contienen abundante ácido hialurónico en la gelatina de Wharton y como controles negativos se efectuó la misma inmunomarcación en cortes de cartilago normal, previamente tratados con hialuronidasa de *Streptomyces*. Se empleó hematoxilina como contraste nuclear. Las marcaciones se evaluaron de acuerdo con su intensidad (-, negativo; +, débil; ++, moderado; y +++, intenso) y a su distribución, tanto en la matriz cartilaginosa como

en los condrocitos (zonas 1, 2 ó 3).

Para la detección de MMP-1 y -3 se utilizó un procesamiento similar. Se realizó recuperación antigénica en tampón (*buffer*) citrato, a pH de 6,5, en olla a presión y microondas durante 10 minutos a máxima potencia. Los lavados se efectuaron con agua destilada y posteriormente se colocaron las secciones en PBS a pH de 7,2. Se bloqueó la unión proteica inespecífica con suero normal 1/20 en PBS. El anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-MMP-1 humana (Clon 41-1E5, Calbiochem, Oncogene Research Products, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) se utilizó a una concentración de 2,5 µg/ml en PBS. El anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-MMP-3 humana (Clon 55-2A4 B, Calbiochem) se utilizó en la misma dilución. Ambos fueron incubados 1 hora a temperatura ambiente y 12 horas a 4°C. Luego de lavar con PBS, los cortes se incubaron 30 minutos con anticuerpos biotinilados de cabra (Multilink, Biogenex Diagnostics, San Ramón, California, EE.UU.) y finalmente se realizó una incubación por 30 minutos con estreptovidina-peroxidasa, utilizando diaminobencidina como cromógeno. Las inmunomarcaciones para MMP-1 y -3 se evaluaron en condrocitos y fibroblastos separándolas en tres categorías, de acuerdo con el siguiente criterio: grado 1, hasta 20% de células positivas; grado 2, 21-70% de células positivas y grado 3, más del 70% de células positivas. Se evaluó la distribución de las marcaciones en los diferentes tipos celulares. Se utilizó tejido de carcinoma mamario humano como control positivo para ambas MMP.

Se realizó similar procesamiento al descrito previamente para detectar FCF-b. Se utilizó un anticuerpo policlonal primario de conejo anti-FCF-b humano (Calbiochem, Oncogene Research Products, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) con una concentración de 2,5 µg/ml en PBS. Los preparados se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y 12 horas a 4°C. La detección (anticuerpo secundario, conjugado y cromógeno) fue similar a la descrita antes. Las marcaciones para FCF-b se cuantificaron en los vasos, fibroblastos y condrocitos como positivas o negativas. Se utilizó miocardio humano como control positivo para el FCF-b.

Se realizó similar procesamiento al descrito antes para detectar CD34. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD34 humano o QBEnd/10 (Biogenex Diagnostics, San Ramón, California, EE.UU.) a una concentración de 1/20 en PBS. Los preparados se incubaron 1 hora a temperatura ambiente y 12 horas a 4°C. La detección (anticuerpo secundario, conjugado y cromógeno) fue similar a la descrita antes. Las inmunomarcaciones para CD34 se evaluaron en forma cualitativa (positivo-negativo). Se utilizó tejido de hemangioma capilar como control positivo para CD34 humano.

Se utilizó análisis estadístico univariado para el estudio de las variables continuas (pruebas no paramétricas) y pruebas de regresión lineal para las variables discretas. La comparación de relevancia estadística en las variables que presentaron diferencias significativas en el estudio univariado ($p < 0,05$) fue realizado utilizando análisis multivariados (prueba de regresión logística). Se utilizó el programa de computación *Statistica* para Windows, versión 4.2 (Statsoft, Inc., 1993).

Resultados

En el análisis histológico de rutina, en todas las muestras se observaron extensas áreas de degeneración. En 33 muestras (97%), el compromiso era igual o superior al 70% del disco. Los tipos de degeneración más observados fueron los cambios fibrilares (70,58%) y los mixoides (20,58%). En el grupo control no se observaron áreas de degeneración. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,00001$, prueba exacta de Fischer).

En la serie estudiada se observó proliferación condrocitaria con formación de condroblastos de hasta 10 con-

drocitos. Los discos del grupo control mostraron condroblastos con hasta 3 ó 4 condrocitos.

Se observó proliferación fibroblástica en 20 discos degenerados (58,8%). La proporción de reemplazo fibroblástico fue intensa (+++) en 2 casos (5,8%); moderada (++) en 4 (11,8%); aislada (+) en 14 (41,2%); y ausente (0) en 14 (41,2%). Los discos del grupo control no mostraron proliferación fibroblástica. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,0009$).

Los infiltrados inflamatorios estaban presentes en 6 discos degenerados (16,6%), con poca intensidad en 5 muestras y de intensidad moderada en 1. Estaban compuestos predominantemente por linfocitos y macrófagos. En 1 caso se observó componente polimorfonuclear. No se observaron infiltrados inflamatorios en el grupo control. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p < 0,31$).

La proliferación vascular se evaluó mediante dos métodos: observación histológica con H&E y marcación con CD34. En el estudio con HE, 19 casos (55,8%) evidenciaron vasos, de los cuales 5 (14,7%) fueron falsopositivos, ya que las estructuras histológicas compatibles con vasos no marcaron con CD34. Se hallaron 8 falsonegativos (23,5%) en la observación con HE, que luego marcaron con CD34. No se halló buena correlación entre la presencia de vasos capilares observados con HE y la observada con CD34; debido a ello, se consideró la marcación con CD34 como el método de referencia para el análisis estadístico.

En los discos con cambios degenerativos fue frecuente la presencia de vasos marcados con CD34, observándose positividad en 22 casos (64,7%), de los cuales 2 (5,8%) mostraron proliferación intensa en la histología con HE, 5 (14,7%) proliferación moderada y 15 (44,1%) presentaron proliferación vascular leve o negativa en el estudio histológico. En el grupo control no se observó proliferación vascular con CD34. La diferencia entre los discos degenerados y los grupos control fue estadísticamente significativa ($p < 0,0005$).

Se evaluó la expresión aislada y combinada de AH, MMP-1 y MMP-3 como marcadores de la capacidad plástica (síntesis y degradación de matriz extracelular) y de la viabilidad del condrocito, siendo además indicadores del grado de funcionalidad y de remodelación de la matriz.

La distribución de AH fue heterogénea. Fue positiva en el área 1 en 29,4%, en el área 2 en 55,8% y en el área 3, en 52,9%. En el grupo control se observaron trazas de AH libre distribuidas irregularmente en las áreas 2 y 3, pero de intensidad marcadamente inferior que en los discos degenerados. Esto se debe a que la mayoría del AH en el disco normal se halla unido a proteoglucanos y, por lo tanto, no permite la unión de la sonda específica que identifica el AH libre. La marcación positiva en el área 1 (citoplasma condrocitario), sólo se observó en los discos degenerados.

En los discos degenerados, la expresión de MMP-1 fue intensa (grado 3) en 6 casos (17%), moderada (grado 2) en 7 (21%), débil (grado 1) en 16 (47%) y negativa en 5 (15%). Los 5 casos con marcación negativa para MMP-1

mostraron degeneración intensa. Sin embargo, no se halló correlación entre los niveles de degeneración del disco y los de expresión de MMP-1. En los casos control se halló expresión de MMP-1 en condrocitos normales aislados.

En los discos degenerados se halló expresión de MMP-3 en 16 casos (47%), de los cuales fue moderada (grado 2) en 2 (5,8%) y débil (grado 3) en los restantes (41,2%). En los casos control no se halló expresión de MMP-3 en condrocitos normales. Las diferencias entre los controles y los discos degenerados son significativas ($p < 0,0074$). Las marcaciones para MMP-3 fueron negativas en 53% de los discos degenerados.

La inmunomarcación de FCF-b en los discos degenerados fue positiva en 12 casos (35,3%) y negativa (64,7%). No se observó marcación positiva en los discos control ($p < 0,04$).

En el análisis univariado no se observó correlación entre el sexo y las restantes variables analizadas. Se halló correlación positiva entre el grado del signo de Laségue y el porcentaje de degeneración mucoide ($p < 0,015$, *Spearman rank order correlations*). Este tipo de degeneración representa la expresión morfológica de la máxima destrucción de la matriz extracelular.

Los discos destruidos y los secuestros mostraron una tendencia a expresar mayor proporción de MMP-3 sugiriendo una mayor actividad de esa enzima en esta etapa de la herniación discal ($p < 0,06$).

El antecedente de tabaquismo en los enfermos operados mostró una correlación significativa con los niveles de expresión de FCF-b en condrocitos y fibroblastos ($p < 0,021$) y con la presencia de infiltrados inflamatorios ($p < 0,04$).

No se observó correlación entre la proporción de degeneración del disco y las restantes variables analizadas.

Los niveles de proliferación fibroblástica se correlacionaron positivamente con la presencia de infiltrados inflamatorios ($p < 0,0009$), así como con mayores niveles de degeneración fibrilar ($p < 0,014$) y mixoide ($p < 0,003$).

Se halló correlación positiva entre niveles de CD34 (proliferación vascular) y mayor expresión de AH libre en matriz extracelular alejada de los condrocitos (área 3) ($p < 0,00001$). Esta observación podría estar relacionada con la función angiogénica del ácido hialurónico libre.

El análisis multivariado (donde se incorporaron todas las variables que mostraron correlación significativa en el análisis univariado) mostró correlación positiva significativa entre el antecedente de tabaquismo con la expresión de FCF-b, la presencia de inflamación con los niveles de proliferación fibroblástica y los niveles de AH en área 3 y los niveles de proliferación vascular (prueba de rangos logarítmicos).

Discusión

El dolor lumbar discogénico sin radiculopatía, constituye un difícil problema diagnóstico y terapéutico.¹⁶⁻⁴⁵ El

dolor puede originarse en fibras nerviosas de los ligamentos vertebrales comunes anterior y posterior, de las cápsulas articulares, de los ligamentos amarillos y del disco intervertebral.⁹

La presentación clínica de la radiculopatía lumbar aguda fue atribuida a la acción mecánica de la hernia sobre la raíz;^{1,10,11,17,38,48,66} sin embargo, existe poca relación entre las anomalías anatómicas y la intensidad de los síntomas,^{6,45,70} ya que grandes hernias extruidas pueden ser asintomáticas.^{29,81} Numerosos grupos durante la última década investigaron la función de los mediadores inflamatorios en la fisiopatogé- nia de la degeneración y el dolor discal.^{36,70}

En este trabajo se han estudiado aspectos biológicos relacionados con la fisiopatología de la degeneración del disco intervertebral y de los fenómenos inflamatorios y reparativos.

El núcleo pulposo posee una red colágena laxa y una matriz amorfa rica en PG. Debido al gran poder osmótico de estos últimos, el contenido de agua en el núcleo pulposo es del 80-90%. El anillo fibroso está compuesto por fibras colágenas densas que se extienden desde el platillo superior al inferior formando una estructura de tipo laminar.^{28,30,73,74}

En el disco degenerado existe pérdida del contenido de agua, cambios de su aspecto macroscópico y disminución de su volumen y altura.^{18,46,47,65} Nuestros hallazgos sugieren que la alteración de la matriz extracelular y, en particular, la fragmentación de los proteoglicanos (fenómeno evidenciado por el estudio del AH) contribuirían a la pérdida del poder osmótico normal del disco intervertebral.

El componente celular del disco representa solamente el 1% del volumen total del tejido discal (5800 células/mm¹)⁷⁴ y una diferencia importante con otros cartílagos (e.g., 10.000 células/mm³ en el cartílago articular).^{18,22,82}

El condrocito es una célula altamente diferenciada, considerada el "arquitecto" del cartílago, con una larga vida y una capacidad mitótica restringida. La actividad replicativa reaparece ante situaciones patológicas con daño de la matriz extracelular.^{50,82} Los componentes de la matriz extracelular son sintetizados y degradados por los condrocitos en un ciclo regulado por numerosos factores, como fuerzas físicas y factores de crecimiento.¹⁴ La actividad biológica del condrocito puede ser evaluada mediante el estudio de la síntesis de componentes de la matriz extracelular (e.g., glucosaminoglicanos como el AH) y de enzimas degradantes de la misma (e.g., MMP-1 y MMP-3). Las MMP son sintetizadas por los condrocitos y los fibroblastos en condiciones apropiadas de estimulación como los procesos de remodelación tisular o en situaciones patológicas en respuesta a lesiones o a inflamación; estas enzimas también pueden ser sintetizadas por las células inflamatorias que infiltran el disco intervertebral.

En los discos intervertebrales patológicos estudiados, se observó aumento de la expresión de MMP-1 y MMP-3, un hallazgo demostrado previamente.^{18,46,65} En algunas de estas publicaciones, se estudiaron células aisladas (*in*

vitro)^{18,36} soslayando la importancia del microambiente celular, de la regulación célula-célula (condrocitos, fibroblastos, células inflamatorias y vasos) y célula-matriz extracelular (expresión de MMP, FCF-b, AH). Otros investigadores han publicado series similares sin incluir grupos control.^{12,18,46,65} Matsui y cols.⁴⁴ analizaron la expresión de MMP-1 y MMP-3 en disco intervertebral degenerado; sin embargo, no estudiaron ningún componente de la matriz extracelular.⁴⁴

El análisis de ambas variables (expresión de MMP-1 y AH) en forma combinada sugiere que podrían ser consideradas marcadores de funcionalidad y capacidad de remodelación tisular. En los discos con ausencia de AH en dos o más áreas (15 casos) se observó una disminución estadísticamente significativa de la expresión de MMP-1 con respecto al promedio de las muestras estudiadas: sólo 3 casos presentaron expresión de MMP-1 en niveles superiores al 50% de los condrocitos.

La acción del condrocito sobre la matriz extracelular puede ser analizada desde otro punto de vista: de los 7 discos con tinciones moderadas a intensas para AH, sólo 1 presentó inmunomarcación para MMP-1 en menos del 10% de los condrocitos, lo que indica que estos marcadores representan fenómenos opuestos sobre la matriz extracelular y son el reflejo de la actividad compensadora entre síntesis y degradación.

Nuestros resultados sugieren que en las etapas avanzadas de degeneración, el condrocito es ineficiente para producir algunos componentes de la matriz (AH) y sintetizar enzimas degradativas de la misma (MMP-1). Esta observación puede ser la expresión de una alteración regulatoria local por destrucción tisular o el exponente de la etapa final del proceso degenerativo con la sustitución del fibrocartilago funcional por tejido fibroso sin capacidad remodelativa normal.

El patrón de tinción de MMP-1 sugiere el aumento de su actividad enzimática en los discos con cambios degenerativos leves y moderados, y su pérdida en los que presentan cambios degenerativos severos y con menor viabilidad condrocitaria.

El análisis histológico de rutina en las muestras procesadas evidenció proliferación vascular en el 64,7% de los casos. La presencia de vasos en el disco intervertebral es una observación conocida desde 1935.³⁵ Desde entonces, numerosos autores han comunicado este hallazgo con frecuencias variables según las series estudiadas, entre el 11 y el 91%.^{5,15,16,31,71,77,85}

Eckert y cols.¹⁶ sugirieron que la neoformación vascular se relacionaba con fenómenos reactivos y reparativos asociados a la degeneración, interpretación compartida por otros investigadores.^{10,11} Numerosos autores proponen que la angiogénesis constituye un fenómeno asociado a la reabsorción y consideran que el disco intervertebral es degradado por mecanismos celulares y humorales inflamatorios.^{41,76,77}

La inflamación participaría en la reabsorción de ex-trusiones discales observadas en pacientes con tomografía axial computarizada y resonancia magnética.^{4,26,43,64} La producción de mediadores de la inflamación en la enfermedad degenerativa del disco intervertebral ha sido demostrada en numerosos estudios.^{36,52,62-64,68} Estos mediadores estarían vinculados con la producción de dolor discal y radicular produciendo reacciones inflamatorias en terminales nerviosas del anillo fibroso y en la propia raíz.^{16,52}

Si bien no hemos hallado infiltrados inflamatorios frecuentes en las muestras de discos degenerados analizadas (17,6%), creemos que las citoquinas inflamatorias liberadas por células "no inflamatorias", como los fibroblastos, podrían ser importantes. El fibrocartilago normal tiene altos niveles de proTGF-beta (*pro inmmoral growth factor-beta*). Por la acción proteolítica de las MMP condrocitarias, este factor es escindido a TGF-beta, un factor altamente angiogénico y estimulante de la fibrogénesis.⁷²

En la serie estudiada se observaron vasos de neoformación (inmunohistoquímica con CD34) en 64,7% de las muestras, en el 68,5% de las correspondientes a discos extruidos y secuestros y en el 50% de las protrusiones. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Este hallazgo concuerda con las observaciones de otros autores.¹⁵

Chitkara y cols.⁸ sugirieron una correlación entre el tiempo de duración de los síntomas preoperatorios y la presencia de neovascularización periférica. Este hallazgo no fue corroborado por otros autores^{15,31} ni en este trabajo.

En los discos degenerados estudiados, se observó expresión de FCF-b en el 35,2% de los condroplastos. A pesar de ello, los dos fenómenos estimulados por este factor fueron altamente prevalentes en el mismo grupo: la proliferación fibroblástica positiva en el 58,8% de los casos y la neovascularización, en el 64,7%.

Doita y cols.¹⁵ sugieren que las células inflamatorias (histocitos y macrófagos) serían las responsables de la producción de mediadores que estimularían la síntesis de FCF-b por las células endoteliales y la neovascularización.⁵⁸

Tolonen y otros detectaron la presencia de FCF-b en material discal en el 81% de los casos. No hallaron una relación entre la intensidad de la inmunomarcación y la duración de los síntomas preoperatorios; sin embargo, este marcador era más prevalente en pacientes jóvenes y disminuía con la edad. Paralelamente observaron un aumento de la expresión de FCF-b en los discos protruidos con respecto a los extruidos y un nivel intermedio en los secuestros.

La neoformación vascular sería más intensa en las etapas iniciales de la enfermedad degenerativa, lo que sugiere una doble función de los vasos: en etapas incipientes (asociados al proceso inflamatorio) y en etapas tardías (asociados a la cicatrización).⁷¹

Relevancia clínica del estudio

- 1) Relación entre hallazgos clínico-quirúrgicos y hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos: Algunos autores han sugerido que en pacientes con hernia de disco lumbar existe una relación entre la intensidad de la respuesta celular y humoral en el tejido y el dolor.^{4,5,62,64} Otros demostraron una relación entre el volumen de la herniación y la intensidad de los síntomas.³³⁻⁷⁹ En este estudio hemos encontrado una relación entre la morfología herniaria y el tipo de degeneración: las formas de degeneración más graves (cambios mucoides) fueron observadas con mayor prevalencia en discos extruidos y secuestrados. Esto sugiere una relación entre las etapas más avanzadas de herniación y las más intensas de degeneración. Los enfermos con antecedentes de tabaquismo presentaron hernias con mayores niveles de expresión de FCF-b, lo que sugiere una asociación entre el hábito de fumar y la intensidad de la respuesta tisular. Es posible que el análisis de series más numerosas pueda modificar estas observaciones.
- 2) Origen intradiscal del dolor lumbar: Creemos que la persistencia de lumbalgia en algunos enfermos operados de hernia de disco podría estar vinculada no sólo con el desarrollo de cicatrices en el espacio epidural o con la coexistencia de cambios degenerativos o con subluxación facetaria desencadenados por la disminución del espacio intervertebral, sino con la actividad inflamatoria en el tejido discal remanente o su invasión por terminales nerviosas.^{24,59} Esta hipótesis es compartida por Jaffray y cols.,³² quienes indican artrodesis intersomática para estos enfermos. En forma análoga, creemos que la lumbalgia residual en enfermos con artrodesis posteriores puede ser atribuida a dolor discogénico. Creemos que para garantizar un buen resultado del tratamiento del dolor de origen discal, deben eliminarse no sólo los factores comprensivos mecánicos, sino también la respuesta celular y humoral.
- 3) Regresión de las hernias discales: La regresión espontánea de las hernias de disco ha sido comunicada en enfermos estudiados con mielografía, tomografía-computarizada y resonancia magnética.^{13,26,40,64,69} La fisiopatogenia de este fenómeno es controvertida.^{63,75} Creemos que la reducción del volumen de las extrusiones puede estar relacionada con la degradación tisular estudiada en este trabajo. Los fenómenos de neovascularización podrían estar involucrados en la absorción de las hernias al transportar células y mediadores de la inflamación al disco y remover productos de degradación.^{41,76,77}

- 4) Origen de la hernia discal: La degeneración discal es un requisito para la herniación.^{36,52} Creemos que las enzimas y la reacción inflamatoria en el disco degenerado, actuando sobre el anillo fibroso y el ligamento vertebral común posterior, en conjugación con fenómenos anatómicos y mecánicos particulares en la columna lumbar, pueden ser responsables de la herniación y extrusión del material discal.
- 5) Similitud con otras patologías: Los hallazgos inmunohistoquímicos en la enfermedad degenerativa del disco intervertebral son similares a los de otras patologías caracterizadas por la destrucción de tejidos conectivos especializados, como la artritis reumatoidea, la espondilitis anquilosante y la atrosia.^{7,39,42,46,49,55,57,65,82} Esta observación sugiere la existencia de una vía final común en todas ellas y una pérdida de la capacidad regulatoria de la reparación y recambio tisular en los tejidos conectivos.
- 6) Presencia de contraste con gadolinio en resonancia magnética: La presencia de neovascularización en el tejido discal, analizada en este trabajo, podría explicar la tinción con gadolinio de las hernias discales observadas en estudios de resonancia magnética.^{51,60,61,83} El valor pronóstico de este hallazgo es discutido.

Conclusiones

El material discal degenerado presenta un aumento de la expresión de las enzimas que degradan la matriz extracelular. En etapas avanzadas de degeneración, la baja viabilidad biológica y funcional del condrocito se expresa como una disminución de su capacidad sintética (disminución del contenido de AH) y de su capacidad degradativa (disminución de la detección de MMP-1). La combinación de ambas marcaciones representa un índice de viabilidad biológica y funcional de esta célula que no hemos encontrado descrito en la literatura consultada.

La formación y proliferación de ejes conjuntivo-vasculares son parte relevante en la patogenia de la enfermedad degenerativa del disco intervertebral. Su función aún no está establecida, pero estaría relacionada con fenómenos reactivos o reparativos.

Creemos que algunos parámetros clínicos y epidemiológicos, como el hábito de fumar y el ángulo del signo de Lasègue, se correlacionan con hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos.

Los resultados obtenidos en este trabajo fortalecen la hipótesis de que la enfermedad degenerativa del disco intervertebral no es un fenómeno de tipo mecánico, sino que posee como vía final común fenómenos biológicos complejos que representan una falla en la capacidad de reparación del tejido conectivo especializado.

Referencias bibliográficas

1. Adams, MA, y Hutton, WC: Gradual disc prolapse. *Spine*, 10:524-531, 1985
2. Azumi, N; Underbill, C; Kagan, E, y Sheibani, K: A novel biotinylated probe specific for hyaluronate. *Am J Surg Pathol*, 16(2): 116-121, 1992.
3. Bobechko, W, y Hirsch, C: Auto-immune response to nucleus pulposus in the rabbit. *J Bone Joint Surg*, 47(3)A: 574-580, 1965.
4. Bozzao, A; Gallucci, M; Masciocchi, C; Aprile, I; Barile, A, y Passariello, R: Lumbar disc herniation: MR imaging assessment of natural history of patients treated without surgery. *Radiology*, 185: 135-141, 1992.
5. Brock, M; Patt, S, y Mayer, H: The form and structure of the extruded disc. *Spine*, 17(12): 1457-1461, 1992.
6. Bush, K; Cowan, N; Katz, D, y Gishen, P: The natural history of sciatica associated with disc pathology: A prospective study with clinical and independent radiologic follow-up. *Spine*, 17(10): 1205-1212, 1992.
7. Buttle, DJ; Bramwell, H, y Hollander, AP: Proteolytic mechanisms of cartilage breakdown: a target for arthritis therapy? *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 48: 167-177, 1995.
8. Chitkara, YK: Clinicopathological study of changes in prolapsed intervertebral discs. *Arch Pathol Lab Med*, 115: 481-483, 1991
9. Coppes, MH; Marani, E; Thomeer, RTWM, y Groen, GJ: Innervation of 'painful' lumbar discs. *Spine*, 22(20): 2342-2350, 1997.
10. Coventry, MB; Ghormley, RK, y Kernohan, JW: The intervertebral disc: its microscopic anatomy and pathology. Part II: Changes in the intervertebral disc concomitant with age. *J Bone Joint Surg*, 27(2)A: 233-247, 1945.
11. Coventry, MB; Ghormley, RK, y Kernohan, JW: The intervertebral disc: its microscopic anatomy and pathology. Part III: Pathological changes in the intervertebral disc. *J Bone Joint Surg*, 27(3)A: 460-474, 1945.
12. Crean, JKG; Roberts, S; Jaffray, DC; Eisenstein, SM, y Duance, VC: Matrix metalloproteinases in human intervertebral disc: role in disc degeneration and scoliosis. *Spine*, 22(24): 2877-2884, 1997.
13. Delauche-Cavalier, MC; Budet, C, y Laredo, JC: Lumbar disc herniation: computed tomography scan changes after conservative treatment of nerve compression. *Spine*, 17: 927-933, 1992.
14. Deucher, WG, y Love, JG: Pathological aspects of posterior protrusion of the intervertebral discs. *Arch Pathol*, 27: 201, 1939.
15. Doita, M; Kanatani, T; Harada, T, y Mizuno, K: Immunohistologic study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine. *Spine*, 21(2): 23-24, 1996.
16. Eckert, C, y Decker, A: Pathological studies of intervertebral discs. *J Bone Joint Surg*, 29A: 447-454, 1947.
17. Frymoyer, JW, y Donaghy, RM: The ruptured intervertebral disc: Follow up report on the first case fifty years after the recognition of the syndrome and its surgical significance. *J Bone Joint Surg*, 67A: 1113-1116, 1985.
18. Fujita, K; Nakanawa, T; Hirabayashi, K, y Nagai, Y: Neutral proteins in human intervertebral disc: Role in degeneration and probable origin. *Spine*, 18: 1766-1773, 1993.
19. Gertzbein, SD: Degenerative disease of the lumbar spine: Immunological implications. *Clin Orthop*, 129: 68-71, 1977.
20. Gertzbein, SD; Tile, M; Gross, A, y Falk, R: Autoimmunity in degenerative disc disease of the lumbar spine. *Orthop Clin North Am*, 6: 67-73, 1975.
21. Gospodarowicz, D; Ferrara, N; Schweigerer, L, y Neufeld, G: Structural characterization and biological function of fibroblast growth factor. *Endocr Rev*, 8:95-114, 1987.
22. Goupille, P; Jayson, M; Valat, JP, y Freemont, AJ: Matrix metalloproteinases: The clue to intervertebral disc degeneration? *Spine*, 23(14): 1612-1626, 1998.
23. Green, SJ; Tarone, C, y Underhill, CB: Distribution of hyaluronidate receptors in the adult lung. *J Cell Biol*, 89: 145-156, 1998.
24. Grönblad, M; Weinstein, JN, y Santavirta, S: Immunohistochemical observations on spinal tissue innervation. *Acta Orthop Scand*, 62(6): 614-622, 1991.
25. Grönblad, M; Virri, J; Tolonen, J; Seitsalo, S; Kääpä, E; Kankare, J; Myllynen, P, y Karaharju, EO: A controlled immunohistochemical study of inflammatory cells in disc herniation tissue. *Spine*, 19(24): 2744-2751, 1994.
26. Guinto, FC; Hashim, H, y Stumer, M: CT demonstration of disc regression after conservative therapy. *Am J Neuroradiol*, 5: 632-633, 1984.
27. Hirabayashi, S; Kumano, K; Tsuiiki, T; Eguchi, M, y Ikeda, S: A dorsally displaced free fragment of lumbar disc herniation and its interesting histologic findings. *Spine*, 15(11): 1231-1233, 1990.
28. Hirsch, C, y Schajowicz, F: Studies on structural changes in lumbar annulus fibrosus. *Acta Orthop Scand*, 22(3): 184-231, 1953.
29. Hitselberger, WE, y Witten, RM: Abnormal myelograms in asymptomatic patients. *J Neurosurg*, 28: 204-206, 1968.
30. Inoue, H, y Takeda, T: Three dimensional observation of collagen framework of lumbar intervertebral disc. *Ada Orthop Scand*, 46: 949-956, 1975.
31. Ito, T; Yamada, M; Ikuta, F; Fukuda, T; Hoshi, S; Kawaji, Y; Uchiyama, S; Homma, T, y Takahashi, H: Histologic evidence of absorption of sequestration-type herniated disc. *Spine*, 21(2): 230-234, 1996.
32. Jaffray, D, y O'Brien, J: Isolated intervertebral disc resorption. A source of mechanical and inflammatory back pain? *Spine*, 11 (4): 397-401, 1986.
33. Johnsson, B, y Stromqvist, B: The straight leg raising tests and the severity of symptoms in lumbar disc herniations: A preoperative and postoperative evaluation. *Spine*, 20: 27-30, 1995.
34. Johnstone, B, y Bayliss, MT: The large proteoglycans of the human intervertebral disc. Changes in their biosynthesis and structure with age, topography and pathology. *Spine*, 20(6): 674-684, 1995.
35. Joplin, R: The intervertebral disc. Embryology, anatomy, physiology and pathology. *Surg Gynec Obstet*, 61: 591-599, 1935.
36. Kang, JD; Goergescu, HI; McIntyre-Larkin, L; Stefanovic-Racic, M; Donaldson, WF, y Evans, CH: Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine*, 21(3): 271-277, 1996.
37. Kauppila, LI: Ingrowth of vessels in disc degeneration. Angiographic and histological studies of cadaveric spines. *J Bone Joint Surg*, 77(1)A: 26-31, 1995.
38. Kelly, M: Is pain due to pressure on nerves? *Neurology*, 6: 32-36, 1956.
39. Kleiner, DE Jr., y Stetler-Stevenson, WG: Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*, 5: 891-897, 1993.
40. Komori, H; Shinomiya, K; Nakai, O; Yamamura, I; Takeda, S, y Furuya, K: The natural history of herniated nucleus pulposus with radiculopathy. *Spine*, 21(2): 225-229, 1996.
41. Lindblom, K, y Hultqvist, G: Absorption of protruded disc tissue. *J Bone Joint Surg*, 32(3)A: 557-560, 1950.
42. Liu, J; Roughley, PJ, y Mort, JS: Identification of human intervertebral disc stromelysin and its involvement in matrix degeneration. *J Orthop Res*, 9: 568-575, 1991.
43. Maigne, JY; Rime, B, y Deligne, B: Computer tomography follow-up study of forty-eight cases of nonoperatively treated lumbar intervertebral disc herniation. *Spine*, 17: 1071-1074, 1992.
44. Matsui, Y; Maeda, M; Makagami, W, y Iwata, H: The involvement of matrix metalloproteinases and inflammation in lumbar disc herniation. *Spine*, 23(8): 863-869, 1998.

45. **McCarron, R; Wimpee, M; Hudkins, P, y Laros, G:** The inflammatory effect of nucleus pulposus. A possible element in the pathogenesis of low-back pain. *Spine*, 12(8): 760-764, 1987.
46. **Melrose, J; Ghosh, P, y Taylor, TKF:** Neutral proteinases of the human intervertebral disc. *Biochem Biophys Acta*, 923: 483-495, 1987.
47. **Miller, JAA; Schmatz, C, y Schult/, AB:** Lumbar disc degeneration: Correlation with age, sex and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine*, 13(2): 173-178, 1998.
48. **Mixer, WJ, y Baar, JS:** Rupture of the intervertebral disc with involvement of the spinal canal. *N Engl J Med*, 211: 210-215, 1934.
49. **Mizel, S; Dayer, JM; Krane, SM, y Mergenhagen, SE:** Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin production by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin-1). *Proc Natl Acad Sci USA*, 8: 2474-2477, 1987.
50. **Muir, H:** The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function, and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays*. 17(2): 1039-1048, 1995.
51. **Nguyen, CM; Ho, KC; Houghton, VM, y Strand, JA:** An experimental model to study contrast enhancement in MR imaging of the intervertebral disc. *Am J Neuroradiol*, 10:811-814, 1989.
52. **Nygaard, O; Mellgren, S, y Osterud, B:** The inflammatory properties of contained and noncontained lumbar disc herniation. *Spine*, 22(21): 2484-2488, 1997.
53. **Olmarker, K; Blomqvist, J; Stromberg, J; Nannmark, U; Thomsen, P, y Rydevik, B:** Inflammatory properties of nucleus pulposus. *Spine*, 20(6): 665-669, 1995.
54. **Obata, K; Iwata, K; Okada, Y; Kohrin, Y; Ohm hi. E; Ioshida, S; Shinmei, M, y Hayakawa, T:** A one step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase-3 using monoclonal antibodies. *Clin ChimActa*, 211: 59-72, 1992.
55. **Okada, Y; Takeuchi, N; Tomita, K; Nakanishi, I, y Nagase, H:** Immunolocalization of matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) in rheumatoid synovioblasts (B cells): correlation with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 48: 645-653, 1989.
56. **Okada, Y; Gonoji, .I; Nakanishi, I; Nagase, H, y Hayakawa, T:** Immunohistochemical demonstration of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in synovial lining cells of rheumatoid synovium. *Virchows Arch B*, 59: 305-312, 1990.
57. **Okada, Y; Shinmei, M, y Tanaka, O:** Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest*, 66: 680-690, 1992.
58. **Oki, S; Matsuda, Y; Shibata, T; Okumura, H, y Desaki, J:** Morphologic differences of the vascular buds in the vertebral endplate. Scanning electron microscopic study. *Spine*, 21(2): 174-177, 1996.
59. **Palmgren, T; Grönblad, M; Virri, J; Seitsalo, S; Ruuskanen, M; Karharju, E:** Immunohistochemical demonstration of sensory and autonomic nerve terminals in herniated lumbar disc tissue. *Spine*, 21(11): 1301-1306, 1996.
60. **Ricketson, R; Simmons, J, y Hausier, B:** The prolapsed intervertebral disc. The high-intensity zone with discographic correlation. *Spine*, 21(23): 2758-2762, 1996.
61. **Ross, JS; Modic, MT, y Masaryk, TJ:** Tears of the annulus fibrosus: Assessment with Gd-DTPA-enhanced MR imaging. *AmJ Neuroradiol.*, 10: 1251-1254, 1990.
62. **Saal, J:** The role of inflammation in lumbar spine. *Spine*, 20(26): 1821-1827, 1995.
63. **Saal, JA, y Saal, JS:** The nonoperative treatment of herniated nucleus pulposus with radiculopathy: an outcome study. *Spine*, 49: 39-46, 1988.
64. **Saal, JA; Saal, JS, y Herzog, RJ:** The natural history of lumbar intervertebral disc extrusions treated nonoperatively. *Spine*, 15: 683-686, 1990.
65. **Sedowofia, KA; Tomlinson, IW; Weiss, JB; Hilton, RH, y Jayson, MIV:** Collagenolytic enzyme systems in human intervertebral disc. Their control mechanisms and their possible role in the initiation of biomechanical failure. *Spine*, 7: 212-222, 1982.
66. **Smyth, MI, y Wright, V:** Sciatica and the intervertebral disc: An experimental study. *J Bone Joint Surg*, 40A: 1401-1418, 1958.
67. **Sprangfort, EV:** The lumbar disc herniation: A computer-aided analysis of 2504 operations. *Acto Orthop Scand*, 142: 44-65, 1972.
68. **Takahashi, H; Suguro, T; Okazima, Y; Motegi, M; Okada, Y, y Takiuchi, T:** Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine. *Spine*, 21(2): 218-224, 1996.
69. **Teplick, JG, y Ilaskin, ME:** Spontaneous regression of herniated nucleus pulposus. *Am J Roentgenol*, 145: 371-375, 1985.
70. **Thelander, U; Fagerlund, M; Friberg, S, y Larsson, S:** Straight leg raising test versus radiologic size, shape and position of lumbar disc herniations. *Spine*, 17(4): 395-399, 1992.
71. **Tolonen, J; Grönblad, M; Virri, J; Seitsalo, S; Ryötmaa, T, y Karharju, E:** Basic fibroblast growth factor immunoreactivity in blood vessels and cells of disc herniations. *Spine*, 20(3): 271-276, 1995.
72. **Trippel, S; Wroblewski, J; Makower, A; Wehlan, M; Schoenfeld, D, y Doctrow, S:** Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth-factor 1 and basic fibroblast growth factor. *J Bone Joint Surg*, 75(2)A: 177-189, 1993.
73. **Urban, PG, y Roberts, S:** Development and degeneration of the intervertebral discs. *Mol Med Today*, 4: 329-335, 1995.
74. **Urban, JPG, y Roberts, S:** The intervertebral disc. En: **Comper, WD** (ed). *Extracellular Matrix*. Vol. 1. Hardwood Academic Publishers; 1: 203-233, 1996.
75. **Van Korff, M:** Studying the natural history of back pain. *Spine*, 19(18S): S204I-S2046, 1994.
76. **Virri, J, y Grönblad, M:** Concomitant immunohistochemical study of macrophage cells and blood vessels in disc herniation tissue. *Eur Spine J*, 3: 336-341, 1994.
77. **Virri, J; Grönblad, M; Savikko, J; Palmgren, T; Seitsalo, S; Ruuskanen, M, y Karharju, E:** Prevalence, morphology, and topography of blood vessels in herniated disc tissue. A comparative immunocytochemical study. *Spine*, 21(16): 1856-1863, 1996.
78. **Vlodavsky, I; Folkman, J, y Sullivan, R:** Endothelial cell derived basic fibroblast growth factor: Synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2292-2296, 1989.
79. **Vucetic, N; Naatanen, H, y Svensson, O:** Pain and pathology in lumbar disc hernia. *Clin Orthop*, 320: 65-72, 1995.
80. **Weiss, JB; Quennel, R, y Jaison, MIV:** Abnormal connective tissue degrading enzyme patterns in prolapsed intervertebral discs. *Spine*, 11(7): 695-701, 1986.
81. **Wiesel, SW; Tsourmas, N, y Feffer, HL:** A study of computer-assisted tomography: I. The incidence of positive CAT scans in an asymptomatic group of patients. *Spine*, 9: 549-551, 1984.
82. **Woessner, JF:** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 5: 2145-2154, 1991.
83. **Yamashita, K; Hiroshima, K, y Kurata, A:** Gadolinium-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging of a sequestered lumbar intervertebral disc and its correlation with pathologic findings. *Spine*, 19(4): 479-482, 1994.
84. **Yasuma, T; Koh, S; Okamura, T, y Yamauchi, Y:** Histológica! changes in aging lumbar intervertebral discs. *J Bone Joint Surg*, 73(2)A: 220-229, 1990.
85. **Yasuma, T; Arai, K, y Yamauchi, Y:** The histology of lumbar intervertebral disc herniation. The significance of small blood vessels in the extruded disc. *Spine*, 18(13): 1761-1765, 1993.
86. **Zhang, J; Fujimoto, N; Iwata, K; Sakai, T; Okada, Y, y Hayakawa, T:** A one step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 1 using monoclonal antibodies. *Clin ChimActa*, 219: 1-14, 1993.