

UNIVERSIDAD DE LEÓN.

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS.
(Área de FISIOLÓGÍA)**



***PREVENCIÓN DE LA FIBROSIS
EPIDURAL EN CONEJOS MEDIANTE LA
UTILIZACIÓN DE DISTINTOS TIPOS DE
ÁCIDO HIALURÓNICO.***

Cipriano Jesús Betegón Nicolás.

León, Noviembre de 2009.

UNIVERSIDAD DE LEÓN.

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS.
(Área de FISIOLÓGÍA)**



***PREVENCIÓN DE LA FIBROSIS EPIDURAL EN
CONEJOS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE DISTINTOS
TIPOS DE ÁCIDO HIALURÓNICO.***

*Memoria que presenta el licenciado en Medicina y Cirugía
D. Cipriano Jesús Betegón Nicolás para la obtención del grado de Doctor por la
Universidad de León.*

León, Noviembre de 2009.

UNIVERSIDAD DE LEÓN.

**INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

El **Dr. D. Julio G. Prieto Fernández** y el **Dr. D. Manuel Fernández González** como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Prevención de la fibrosis epidural en conejos mediante la utilización de distintos tipos de ácido hialurónico” realizada por D. Cipriano Jesús Betegón Nicolás en el Departamento de Ciencias Biomédicas, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo en León, a 16 de Noviembre de 2009.

Fdo. Dr. D. Julio G. Prieto Fernández. Fdo. Dr. D. Manuel Fernández González.

UNIVERSIDAD DE LEÓN.

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO.

**(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y norma 7ª de las
complementarias de la ULE)**

El Departamento de Ciencias Biomédicas en su reunión celebrada el día **18 de Noviembre de 2009** ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada **“Prevención de la fibrosis epidural en conejos mediante la utilización de distintos tipos de ácido hialurónico”**, dirigida por el **Dr. D. Julio G. Prieto Fernández** y el **Dr. D. Manuel Fernández González** y presentada por **D. Cipriano Jesús Betegón Nicolás** ante este Departamento y cuyo título en inglés es: **“Prevention of epidural fibrosis in rabbit by different hyaluronic acid solutions”**

Lo que firmo en León a 18 de Noviembre de 2009.

VªB

La Directora del Departamento.

La Secretaria.

Fdo.: Mª Jesús Tuñón González

Fdo.: Nélida Fernández Martínez

Deseo expresar mi reconocimiento a todos los que me han ayudado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, muchas han sido las personas que me han acompañado en este camino y para todas ellas mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar acordarme de mi familia, de mis padres y hermanos, gracias a ellos he llegado a ser quien soy. Gracias por “aguantarme” con todos mis defectos.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Dr. D. Julio G. Prieto Fernández sin cuyo apoyo y estímulo nunca habría sido capaz de realizar este trabajo. Al Dr. D. Manuel Fernández González y al resto de los miembros de la Unidad de Cirugía del Raquis del Hospital de León, por introducirme en el mundo de la columna y brindarme todos sus conocimientos y amistad.

A todo el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, en especial a Ana, Antonio y Gracia, por todo lo que he aprendido de vosotros y demostrar una paciencia infinita conmigo en este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Manuel Gonzalo Orden y al Departamento de Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León. Gracias a Marta, José, María, Inés... por todo su trabajo y colaboración desinteresada, sin vuestro ejemplo y ayuda en todas las tardes que compartimos juntos, nada habría sido posible.

No puedo olvidarme de mis compañeros y amigos del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital de León, con los que comparto mi día a día. Gracias por acogerme y ayudarme desde el primer día en que llegué a León hace casi ya 10 años.

Por último, gracias a todos los que estáis a mi lado en los buenos y los malos momentos, sin esperar nada a cambio, queriéndome tal y como soy.

A David y Chusa.

ÍNDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Epidemiología.....	6
2.2. Anatomía de la columna vertebral.....	15
2.2.1 Vértebras lumbares.....	18
2.3. Diagnóstico por imagen de la columna vertebral.....	29
2.4. Síndrome de fracaso de la cirugía de columna.....	35
2.5. Métodos de prevención de la fibrosis epidural.....	41
2.6. Ácido hialurónico.....	43
2.6.1. Usos terapéuticos y aplicaciones del ácido hialurónico.....	48
2.7. YKL 40.....	51
2.8. Metaloproteasas (MMP's).....	52
2.8.1. Estructura de las MMP's.....	52
2.8.2. Substratos y nomenclatura de las MMP's.....	53
2.8.3. Activación de las MMP's.....	59
2.8.4. Inhibición de las MMP's.....	59
2.9. El conejo como modelo experimental.....	62
3. OBJETIVOS.....	64
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
4.1. Animales de experimentación.....	68
4.2. Características de los ácidos hialurónicos estudiados.....	70
4.3. Técnica quirúrgica.....	71
4.4. Determinación del peso del tejido fibroso dentro del canal neural.....	77

4.5. Determinación de la fibrosis epidural mediante estudio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	78
4.6. Determinación de los niveles de hidroxiprolina mediante HPLC.....	82
4.6.1. Protocolo de degradación del tejido.....	82
4.6.2. Soluciones de derivatización.....	82
4.6.3. Reacción de derivatización.....	83
4.6.4. Análisis por HPLC.....	84
4.6.5. Cuantificación de las muestras.....	85
4.7. Preparación de las muestras para el estudio anatomico-patológico.....	86
4.8. Determinación de los niveles de YKL 40.....	87
4.8.1. Homogenización del tejido.....	87
4.8.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	87
4.8.3. Determinación de la proteína YKL 40.....	87
4.9. Determinación de los niveles de MMP's (MMP-1 y MMP-9).....	89
4.9.1. Degradación del tejido fibrótico.....	89
4.9.2. Determinación de MMP-1 y MMP-9.....	89
4.9.3. Detección de la MMP-1.....	90
4.9.3.1. Preparación de los estándares para la curva patrón.....	90
4.9.3.2. Desarrollo del ensayo.....	90
4.9.3.3. Activación de la pro-MMP-1 por APMA.....	91
4.9.4. Detección de la MMP-9.....	91
4.10. Análisis estadístico.....	92

5. RESULTADOS.....	93
5.1. Resultados del peso de las muestras de tejido fibroso dentro del canal neural.....	94
5.2. Resultados del estudio de las imágenes de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	96
5.2.1. Resultados del estudio de RMN en el grupo control.....	96
5.2.2. Resultados del estudio de RMN en el grupo Adant®.....	97
5.2.3. Resultados del estudio de RMN en el grupo Durolane®.....	97
5.2.4. Resultados del estudio de RMN en el grupo Hyalgan®.....	98
5.3. Resultados de los niveles de hidroxiprolina.....	105
5.4. Resultados del estudio anatómico-patológico.....	107
5.5. Resultados de los niveles de YKL 40.....	112
5.6. Resultados de los niveles de MMP-1 y MMP-9.....	113
5.6.1. Niveles de MMP-1.....	113
5.6.2. Niveles de MMP-9.....	114
6. DISCUSIÓN.....	116
6.1. El conejo como modelo experimental para el estudio de la fibrosis epidural.....	119
6.2. Presencia y peso del tejido fibroso intracanal.....	121
6.3. RMN en la columna lumbar intervenida.....	123
6.4. Niveles de hidroxiprolina.....	126
6.5. Estudio anatómico-patológico.....	128
6.6. YKL 40.....	130
6.7. Metaloproteasas 1 y 9.....	132

7. CONCLUSIONES.....	135
8. BIBLIOGRAFÍA.....	137
9. ANEXOS.....	156

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Tipos de Ácidos hialurónicos y principales diferencias entre ellos.....	70
Tabla 2. Recta de valoración de hidroxiprolina y prolina.....	85
Tabla 3. Peso del tejido fibroso en grupo control.....	94
Tabla 4. Peso del tejido fibroso en grupo Adant®.....	94
Tabla 5. Peso del tejido fibroso en grupo Durolane®.....	94
Tabla 6. Peso del tejido fibroso en grupo Hyalgan®.....	94
Tabla 7. Valores de RMN inicial en el grupo control.....	96
Tabla 8. Valores de RMN final en el grupo control.....	96
Tabla 9. Valores de RMN inicial en el grupo Adant®.....	97
Tabla 10. Valores de RMN final en el grupo Adant®.....	97
Tabla 11. Valores de RMN inicial en el grupo Durolane®.....	97
Tabla 12. Valores de RMN final en el grupo Durolane®.....	97
Tabla 13. Valores de RMN inicial en el grupo Hyalgan®.....	98
Tabla 14. Valores de RMN final en el grupo Hyalgan®.....	98
Tabla 15. Representación gráfica de los valores de fibrosis en el análisis de RMN inicial y final en los diferentes grupos de estudio.....	102
Tabla 16. Representación de los resultados de la medición de fibrosis en la RMN inicial más la final en los diferentes grupos de estudio.....	103
Tabla 17. Niveles de hidroxiprolina en los distintos grupos de estudio.....	105
Tabla 18. Resultados del estudio anatómico-patológico en grupo control.....	110
Tabla 19. Resultados del estudio anatómico-patológico en grupo Adant®.....	110

Tabla 20. Resultados del estudio anatómico-patológico en grupo Durolane®.....	110
Tabla 21. Resultados del estudio anatómico-patológico en grupo Hyalgan®.....	110
Tabla 22. Representación gráfica de los valores de estudio de anatomía patológica en los diferentes grupos de estudio.....	111
Tabla 23. Valores de los niveles de YKL 40 en los distintos grupos de estudio.....	112
Tabla 24. Valores de MMP-1 en los distintos grupos de estudio.....	113
Tabla 25. Valores de MMP-9 en los diferentes grupos de estudio.....	114

ÍNDICE DE IMÁGENES.

Imagen 1. Fusión vertebral lumbosacra. Radiografía lateral.....	9
Imagen 2. Fusión vertebral lumbosacra. Radiografía anteroposterior....	9
Imagen 3. Infiltración tumoral del cuerpo de una vértebra lumbar.....	10
Imagen 4. Vertebroplastia percutánea.....	11
Imagen 5. Visión intraoperatoria de técnica de fusión vertebral instrumentada.....	14
Imagen 6. Columna vertebral humana en visión anterior, lateral y posterior.....	15
Imagen 7. Vértebra lumbar. Visión lateral.....	16
Imagen 8. Cuerpo vertebral. Vista superior.....	17
Imagen 9. Vértebra lumbar. Visión posterior.....	17
Imagen 10. Imagen en vista caudal y cefálica de una vértebra lumbar.	19
Imagen 11. Imagen de los ligamentos de la columna vertebral.....	20
Imagen 12. Imagen lateral de la columna vertebral lumbar y sus ligamentos.....	21
Imagen 13. Disco intervertebral.....	22
Imagen 14. Cuerpos vertebrales y disco intervertebral.....	23
Imagen 15. Unidad Funcional Raquídea (UFR) (parte anterior y posterior).....	25
Imagen 16. Movimiento de extensión de la columna lumbar.....	26
Imagen 17. Corte axial de columna lumbosacra. Estudio de TAC.....	29
Imagen 18. Cortes sagitales de RMN en T2 de columna lumbosacra..	32
Imagen 19. Corte axial de RMN de columna lumbosacra.....	32
Imagen 20. Estudio de RMN tras laminectomía con ocupación del espacio epidural. Imagen sin contraste.....	36

Imagen 21. Imagen de RMN esta vez realizada tras la administración de gadolinio donde se puede observar la captación del mismo estableciéndose el diagnóstico de fibrosis epidural.....	36
Imagen 22. Fórmula orgánica estructurada del ácido hialurónico. Su fórmula empírica es $(-4\text{Gl}_c\text{UA}\beta_1-3\text{Gl}_c\text{NA}_c\beta_1)_n$	43
Imagen 23. Estructura de las MMP's.....	54
Imagen 24. Raquis lumbar del conejo.....	63
Imagen 25. Raquis lumbar del conejo.....	63
Imagen 26. Corte axial de la columna lumbar del conejo.....	63
Imagen 27. Anestesia del conejo y preparación de la zona quirúrgica.....	71
Imagen 28. Preparación e instrumental quirúrgico.....	73
Imagen 29. Zona de laminectomía y exposición del saco dural.....	73
Imagen 30. Imagen de la columna vertebral del conejo con sección a nivel del disco intervertebral dividiendo la zona quirúrgica en dos segmentos uno superior y otro inferior.....	76
Imagen 31. Imagen de RMN. Localizador sagital.....	79
Imagen 32. Imagen de RMN. Localizador coronal.....	80
Imagen 33. Imagen de RMN. Corte axial. División del canal neural en 6 segmentos.....	81
Imagen 34. Corte axial de RMN en T1 sin contraste. Ausencia de fibrosis intracanal (grado 0).....	98
Imagen 35. Corte axial de RMN en T1 con contraste. Captación de gadolinio en la zona de cicatriz muscular y ausencia de captación dentro del canal neural (grado 0).....	99
Imagen 36. Corte axial de RMN en T1 sin contraste. Zona quirúrgica y presencia de fibrosis intracanal.....	99

- Imagen 37.** Corte axial de RMN en T1 con contraste del mismo conejo apreciándose la captación tanto en la zona muscular como en la zona de la laminectomía e interior del canal neural.....100
- Imagen 38.** Imagen de RMN en T2 con contraste de la misma zona quirúrgica donde se observa el tejido fibroso intracanal.101
- Imagen 39.** Imagen de anatomía patológica. Grado 1 de fibrosis.....107
- Imagen 40.** Imagen de anatomía patológica. Grado 2 de fibrosis.....108
- Imagen 41.** Imagen de anatomía patológica. Grado 3 de fibrosis.....108
- Imagen 42.** Banda de tejido fibroso dentro del canal vertebral rodeando el tejido neural.....109
- Imagen 43.** Estudio de anatomía patológica. Tejido neural rodeado de duramadre.....109

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Cromatograma de la hidroxiprolina.....	85
Figura 2. Recta patrón para la determinación de los niveles de MMP-1.....	90
Figura 3. Recta patrón para la determinación de los niveles de MMP-9.....	91
Figura 4. Representación gráfica del peso del tejido fibroso dentro del canal neural.....	95
Figura 5. Representación gráfica de los niveles de hidroxiprolina....	105
Figura 6. Valores de YKL 40 en los distintos grupos de estudio.....	112
Figura 7. Valores de MMP-1 en los distintos grupos de estudio.....	114
Figura 8. Valores de MMP-9 en los diferentes grupos de estudio....	115

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo I. Resultados del estudio estadístico del peso del tejido fibroso dentro del canal vertebral.....	157
Anexo II. Resultados del estudio estadístico de la fibrosis en la RMN inicial en los diferentes grupos de estudio.....	157
Anexo III. Resultados del estudio estadístico de la fibrosis en la RMN final en los diferentes grupos.....	158
Anexo IV. Resultados del estudio estadístico comparando la fibrosis inicial y final mediante RMN en los diferentes grupos....	159
Anexo V. Resultados del estudio estadístico de la suma de la fibrosis inicial más la final en el estudio de RMN en los diferentes grupos de estudio.....	160
Anexo VI. Resultados del estudio estadístico de los valores de hidroxiprolina.....	161
Anexo VII. Resultados del estudio estadístico de la fibrosis epidural en el estudio anatómo-patológico.....	161
Anexo VIII. Resultados del estudio estadístico de los niveles de YKL 40.....	162
Anexo IX. Resultados del estudio estadístico de los valores de MMP-1 en los diferentes grupos.....	163
Anexo X. Resultados del estudio estadístico de los valores de MMP-9 en los diferentes grupos.....	164

LISTA DE ABREVIATURAS.

- **ADCON-L:** gel reabsorbible de gelatina y poliglicanos.
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **AH:** ácido hialurónico.
- **AINE:** anti-inflamatorios no esteroideos.
- **ANOVA:** análisis de la varianza de una vía.
- **APMA:** 4 acetato aminofenilmercurio.
- **α 1-AT:** α -1 antitrombina.
- **L7:** séptima vértebra lumbar.
- **Da:** daltons.
- **ERO's:** especies reactivas del oxígeno.
- **FMOC:** fluorenilmetilcloroformato.
- **GAG's:** glicosaminoglicanos.
- **HCgp-39:** glicoproteína del cartílago humano 39.
- **HPLC:** cromatografía líquida de alta resolución.
- **LCR:** líquido cefalorraquídeo.
- **nm:** nanómetros.
- **MEC:** matriz extracelular.
- **ml:** mililitros.
- **MMP's:** metaloproteasas.
- **MT-MMP's:** metaloproteasas de tipo membrana.
- **O-HA:** oligómeros de ácido hialurónico de tres a diez disacáridos.
- **PFTEe:** politetrafluoroetileno.
- **PM:** peso molecular.
- **PMM:** polimetilmetacrilato.

- **RHAMM:** receptor de ácido hialurónico mediador de la movilidad.
- **RMN:** resonancia magnética nuclear.
- **S1:** primera vértebra sacra.
- **TAC:** tomografía axial computerizada.
- **TIMP's:** inhibidores tisulares de metaloproteasas.
- **UFR:** unidad funcional raquídea.
- **ULE:** universidad de león.
- **uPAR:** receptor de uroquinasa.

1. INTRODUCCIÓN.

La lumbalgia o dolor lumbar es una de las patologías con mayor incidencia dentro de los trastornos musculares que afectan al hombre y que implica una elevada utilización de recursos.

En el origen de la lumbalgia se ven involucrados todos aquellos elementos que forman parte de la estructura de la columna vertebral como son: músculos, articulaciones, ligamentos, cuerpos vertebrales, disco intervertebral y por último los elementos nerviosos que se encuentran dentro del canal vertebral.

Esta alta prevalencia de la patología del raquis ya sea de origen degenerativo, traumático o tumoral ha propiciado el desarrollo de gran variedad de opciones de tratamiento, existiendo dos grandes grupos, por un lado los conservadores, que implican el uso de analgésicos y anti-inflamatorios, relajantes musculares y medidas fisioterápicas y rehabilitadoras; siendo necesario en algunas ocasiones en las que estos tratamientos conservadores fracasan recurrir a la segunda opción de tratamiento, el quirúrgico.

El tratamiento quirúrgico de la patología de la columna vertebral ya sea a nivel cervical, torácico y sobre todo lumbar, esta alcanzando en los últimos años un importante desarrollo debido a la mejora de los métodos diagnóstico de imagen, el uso de nuevos instrumentales quirúrgicos y de novedosas técnicas quirúrgicas que implican una menor agresividad y riesgo para el paciente.

A pesar de la importante mejoría experimentada en los resultados del tratamiento quirúrgico de la patología de la columna lumbar, existe un porcentaje de pacientes que varía entre un 15-30% en los que tras haber realizado un tratamiento quirúrgico no se produce mejoría del dolor o tras un periodo variable de mejoría del mismo reaparecen síntomas dolorosos similares a los existentes antes de la cirugía. A esta no desaparición o reaparición del dolor lumbar tras la cirugía se le denomina síndrome de fracaso de la cirugía de columna.

En este síndrome de fracaso de la cirugía de columna se ven implicados una serie de factores como son: un inadecuado diagnóstico inicial de la patología causante del dolor lumbar, errores técnicos y quirúrgicos, presencia de inestabilidades del raquis secundarias a la cirugía, infecciones, aparición de nueva patología una vez operado el paciente en un

nivel diferente al intervenido previamente y por último la generación de fibrosis epidural tras la cirugía entorno a la médula y raíces nerviosas.

Esta fibrosis epidural se considera la causa más importante del síndrome de fracaso de la cirugía lumbar y consiste en la aparición de un tejido fibroso-cicatricial entorno a los elementos nerviosos medulares y radiculares que ocasionaría una irritación continua de los mismo, alteraría el adecuado intercambio de nutrientes y restos catabólicos, limitaría la movilidad de los elementos neurales generando de esta forma la aparición de dolor.

El origen de esta fibrosis se encontraría en la migración de fibroblastos desde el tejido muscular próximo a la zona quirúrgica que originaría la aparición de esta fibrosis. Para evitarlo se emplean cada vez técnicas quirúrgicas menos agresivas con una menor afectación de los tejidos musculares y conectivos con lo que su lesión y la reacción inflamatoria derivada de la misma sean menores, con lo que la fibrosis disminuiría.

Otras técnicas empleadas para la prevención de la fibrosis incluyen la colocación de métodos barrera que impidan la migración de los fibroblastos desde el tejido muscular hacia el tejido neural., otros métodos preventivos de la fibrosis emplean sustancias anti-inflamatorias como analgésicos, radiaciones ionizantes, etc. con el fin de disminuir la reacción inflamatoria origen de la fibrosis.

A pesar de todos estos medios empleados no existen ninguno de ellos plenamente efectivo ni exento de riesgos en la prevención de la fibrosis epidural por lo que se hace necesario el continuar investigando en todos aquellas opciones terapéuticas que eviten o disminuyan la generación de la misma.

Basándonos en la posible reacción inflamatoria a nivel de los tejidos blandos que recubren la zona de la columna intervenida, como origen de los fibroblastos, que posteriormente van a migrar hasta alcanzar el canal vertebral e inducir la formación del tejido cicatricial y que esta es la causa de la aparición de los cuadros dolorosos que en ocasiones suceden después de realizar una cirugía raquídea lumbar, nos decidimos a emplear el ácido hialurónico como elemento protector y limitador de la producción de fibrosis epidural debido a un posible doble efecto protector del ácido hialurónico (AH); por un lado como sustancia con capacidad anti-inflamatoria a nivel local, como demuestra su utilización en los procesos degenerativos artrósicos articulares a nivel de la articulación de

la rodilla fundamentalmente (Sánchez, 2006) y en segundo lugar como elemento barrera al depositar el ácido hialurónico en la zona de la laminectomía impidiendo la progresión de los fibroblasto dentro del canal medular (Schimizzi y cols., 2006).

El posible efecto protector del AH frente a la fibrosis epidural lo hemos estudiado desde múltiples puntos de vista que van desde pruebas de imagen, en concreto estudios de RMN, en busca de la presencia de fibrosis epidural y de si se producían variaciones en la misma a lo largo del tiempo; estudios anatomo-patológicos de la zona quirúrgica, determinaciones de productos de degradación de la fibrosis como la hidroxiprolina y cuantificación de marcadores inflamatorios como YKL 40 y MMP's 1 y 9.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, esta memoria se plantea como un estudio prospectivo con siguientes los objetivos generales:

1. Estudiar el posible efecto protector del AH, depositado en la zona quirúrgica, sobre la producción de fibrosis epidural.
2. Demostrar que el conejo es un buen modelo experimental para el estudio de la generación de fibrosis epidural tras cirugía del raquis lumbar en el mismo.
3. En el hipotético caso de que el AH disminuyera la generación de fibrosis epidural, buscar si existen diferencias entre distintos tipos de AH en cuanto a su origen y peso molecular, como protectores ante la producción de fibrosis epidural.

2. REVISIÓN

BIBLIOGRÁFICA.

2.1. EPIDEMIOLOGÍA.

La patología degenerativa lumbar es la segunda causa más común de incapacidad crónica después de las enfermedades respiratorias. La lumbalgia es el segundo motivo de consulta médica en atención primaria, llegando su incidencia en países desarrollados hasta un 45% de la población adulta y es la segunda causa de absentismo laboral en pacientes menores de 55 años. Según distintos estudios un 66-80% de la población adulta desarrolla dolor lumbar en algún momento de su vida (Gross y cols., 2006; Leeuw y cols., 2007; Schneider y cols., 2007).

Cuando este dolor dura más de 12 semanas, se define como dolor crónico. Esto ocurre entre un 7 y un 10% de los casos, afectando por igual a hombres y mujeres (Modic y cols., 1999).

El dolor lumbar crónico constituye un reto para los clínicos debido a que implica la utilización de una elevada cantidad de recursos tanto sanitarios (consultas médicas, pruebas diagnósticas, tratamiento médico y quirúrgico) como no sanitarios (absentismo laboral, incapacidades laborales temporales o permanentes) con una elevada repercusión social. Sirva como ejemplo, el hecho de que el dolor lumbar es el segundo motivo de baja laboral tras el resfriado común (González y Condón., 2000; Kovacs y cols., 2007).

Dentro de la afectación de la columna cervical, dorsal o lumbar, la patología de la columna cervical tiene menor prevalencia, pero la afectación a este nivel tiene las mismas consecuencias cuando se cronifica, que la patología lumbar que es la de mayor prevalencia e importancia por el número de personas afectadas. El riesgo de padecer dolor lumbar y cervical crónico se asocia con frecuencia a la actividad laboral desarrollada y su prevención debe ser un objetivo prioritario de la política sanitaria (Dimberg y cols., 1989; Grabois, 2005; Cano y cols., 2008; Dagenais y cols., 2008).

Buscando el origen de esta alta incidencia de dolor lumbar es evidente que el hombre es un ser inadaptado a la actitud postural erecta que adoptó hace miles de años, persistiendo aún estructuras cuya función se ve alterada por la falta de adaptación a pesar del tiempo transcurrido, siendo está la causa de múltiples enfermedades por sobrecarga. Es

pues evidente que el hombre moderno no se ha adaptado a esta posición erecta, como se demuestra, no sólo por la elevada prevalencia de discos intervertebrales lumbares y lumbosacros degenerados, sino también por las venas varicosas, hemorroides, patología periarticular del hombro, etc.

La postura erecta del tronco puede considerarse como una característica esencial de los primates. Otra característica asociada a la erección del tronco es la tendencia acentuada a adoptar un papel predominante de los miembros superiores en el quehacer diario.

Muchos de los primates realizan conjuntamente la bipedestación, la deambulación y la carrera; sin embargo, solamente el hombre permanece con las rodillas extendidas y es capaz de bipedestación prolongada. Los estudios de fósiles sugieren que este tipo de postura erecta tuvo sus comienzos hace aproximadamente unos 12 millones de años, en los comienzos de la era pliocénica. Desde entonces hasta ahora el hombre continúa buscando una adecuada adaptación a la posición bípeda.

La posición en bipedestación supone una sobrecarga para el disco lumbar, pero además esta postura sobrecarga especialmente la parte más posterior del mismo, que es la más débil (menor presencia de fibrillas, no adherencia a la zona del ligamento vertebral común posterior, menos densidad de dicho ligamento, etc.) sin que exista ninguna adaptación que proteja a este disco. Además los continuos movimientos de flexión y rotación del tronco que el hombre debe realizar para acercarse al suelo en su quehacer habitual facilitan la lesión del disco y la protrusión y herniación del núcleo pulposo dentro del canal vertebral, con el consiguiente compromiso radicular o medular asociado.

En resumen, el intenso deseo del hombre por permanecer erecto sobre sus piernas, con objeto de liberar sus miembros superiores para las acciones de manipulación de estructuras, se ha cumplido a un precio. La mayor parte de este precio ha sido pagado por la región lumbosacra. Incluso bajo las condiciones más ideales esta región presenta una constitución para responder a unas demandas que están más allá de sus límites de capacidad. Esta es la razón por la cual muy pocos seres humanos están libres, en algún momento de su vida, de algún episodio de dolor lumbar o lumbosacro (Kong y cols., 1996; Miralles, 1998).

Dentro del dolor lumbar debemos distinguir el dolor agudo y el crónico. Definimos dolor agudo como aquel que tiene una duración inferior a las seis semanas y dolor crónico aquel cuya duración supera los tres meses. La presencia de dolor agudo se suele deber a procesos herniarios con una compresión radicular, pero que de manera habitual suele tener un pronóstico favorable con tratamiento médico y sin la necesidad de cirugía, con una reincorporación rápida a la actividad previa y con poca deshabitación y alteración del modo de vida del paciente. El dolor de tipo crónico por el contrario se suele deber a procesos degenerativos en los que la recuperación implica largos periodos de tiempo de tratamiento y en los que en muchas ocasiones la cirugía es el único tratamiento efectivo. Además, los pacientes con dolor crónico presentan cambios significativos en su estilo de vida, incluyendo deshabitación y disfunciones importantes en la actividad cotidiana. Todo dolor y más cuando es de tipo crónico lleva asociado un componente psicológico que debe tenerse en cuenta a la hora de abordar su tratamiento, ya que este dolor crónico se acompaña, con más frecuencia que otros tipos de dolor, de alteraciones psicológicas, ansiedad, depresión y trastornos del sueño. También es importante destacar la importancia que la presencia de dolor lumbar, tanto agudo como crónico, tiene en la capacidad laboral de estos pacientes y el elevado número de horas de baja laboral producidas por esta patología (Soegaard y cols., 2007; Stafford y cols., 2007; Truchon y cols., 2008).

Esta alta prevalencia de la patología del raquis tanto cervical, dorsal y sobre todo lumbar es la causa del creciente interés dentro de la Medicina y en especial dentro del campo de la Traumatología y Cirugía Ortopédica en el estudio de su morfología, biomecánica, procesos degenerativos y de todas aquellas opciones de tratamiento tanto médico como quirúrgico sobre el raquis. Del mismo modo la alta incidencia de traumatismos de alta energía, fundamentalmente causados por accidentes de tráfico, laborales y deportivos ha producido un incremento espectacular en la patología traumática del raquis que obliga, en múltiples ocasiones, a la realización de cirugías estabilizadoras de la columna vertebral (Imágenes 1 y 2).



Imagen 1. Fusión vertebral lumbosacra radiografía lateral.



Imagen 2. Fusión vertebral lumbosacra radiografía anteroposterior.

También es conveniente recordar que la columna vertebral es el principal asiento de las metástasis de los tumores primarios de mama, pulmón y próstata, cuya incidencia se ha visto aumentada de manera progresiva en las sociedades industrializadas en los últimos años debido a la mayor esperanza de vida de estas poblaciones y sus estilos de vida. El número de metástasis óseas resulta muy superior al de las lesiones tumorales primarias óseas, existiendo un tumor primario óseo por cada 10 a 12 metástasis. Según estadísticas americanas, en EEUU se diagnostican aproximadamente un millón de tumores malignos extraóseos cada año, y de ellos aproximadamente el 55-65% dan metástasis en el esqueleto, y dentro de este fundamentalmente a nivel del raquis. La gran cantidad de tejido esponjoso existente a nivel de la columna vertebral con abundancia de médula ósea explica esta predilección de las metástasis vertebrales por el tejido óseo vertebral (Cohen, 2004) (Imagen 3).

La presencia de metástasis vertebrales clásicamente es definida como un criterio de mal pronóstico de supervivencia pero la esperanza de vida en los enfermos con metástasis óseas se ha incrementado en los últimos años debido al empleo de tratamientos cada vez

más eficaces, con la aparición de nuevos agentes quimioterápicos con una mayor agresividad sobre el tejido tumoral y unos menores efectos secundarios, acompañado de las modernas técnicas radioterápicas y las nuevas actuaciones quirúrgicas (Herrera y cols., 1999).

Estas innovadoras técnicas quirúrgicas en el caso de metástasis vertebrales abarcan cirugías percutáneas como la vertebroplastia y cifoplastia que permiten (White y cols., 2006) (Imagen 4):

1. La toma de muestras para establecer o confirmar el diagnóstico ante una lesión tumoral vertebral.
2. Aportar un refuerzo mecánico sobre lesiones vertebrales líticas debido a la implantación de cementos de polimetilmetacrilato (PMM) dentro del cuerpo vertebral.
3. Efecto analgésico.

Otra serie de técnicas quirúrgicas más agresivas incluyen la resección total de una vértebra afectada en el caso de encontrarnos con lesiones tumorales únicas y con un buen pronóstico de supervivencia del paciente y otras técnicas paliativas de estabilización vertebral en caso de metástasis vertebrales múltiples (Ledlie y Renfro., 2006; Pflugmacher y cols., 2006).

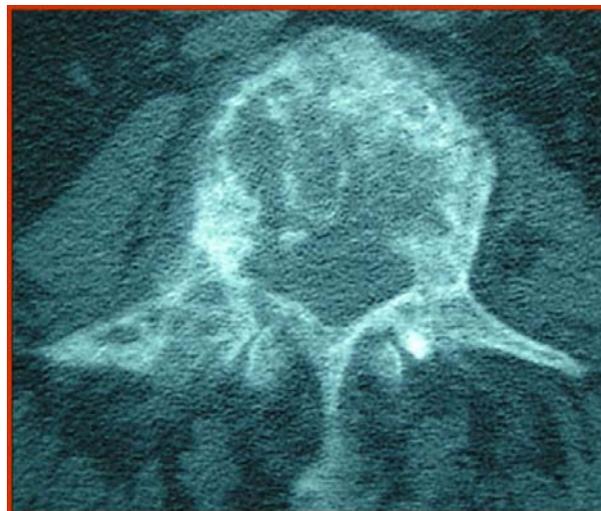


Imagen 3. Infiltración tumoral del cuerpo de una vértebra lumbar.

Ya sea por el mayor conocimiento y el aumento de la incidencia de la patología traumática, tumoral y fundamentalmente degenerativa del raquis, unido a la mejora de las técnicas de diagnóstico por imagen e instrumentales quirúrgicos, el número de cirugías realizadas esta aumentado de manera exponencial en los últimos años.



Cemento dentro del cuerpo vertebral

Imagen 4. Vertebroplastia percutánea.

A pesar de todas estas mejoras existen un porcentaje de pacientes que una vez sometidos a una cirugía a nivel del raquis continúan con dolor significativo y discapacidad después de la misma, este porcentaje se sitúa según los distintos autores entre el 15-20% según las series analizadas (Atlas y cols., 1996 a, b, 2001; Asch y cols., 2002; Hernández-Pérez, 2007).

Dentro de este porcentaje de cirugías fallidas del raquis lumbosacro encontramos diversas causas que pueden justificar este porcentaje de enfermos que no tienen una evolución satisfactoria a pesar de la cirugía sobre la columna lumbar.

Descartando la presencia de errores técnicos durante la cirugía como: la incorrecta identificación del nivel patológico, existencia de otra patología a nivel del raquis no diagnosticada, fallos en la colocación de los implantes vertebrales, etc., que suponen globalmente una tasa baja de fallo de la cirugía lumbar, uno de los mayores problemas a los que se enfrenta todo cirujano que realiza cirugía vertebral es la aparición, después de una

correcta actuación quirúrgica, de fibrosis epidural que consistiría en la formación de un tejido cicatricial intracanal, el cual envuelve las estructuras neurales tanto medulares como radicales, generando la reaparición de una sintomatología dolorosa similar a la existente previamente a la cirugía.

A pesar de los estudios realizados sobre la fibrosis epidural tras la cirugía no está claro cuál es el origen de la misma y el porqué de su aparición.

En nuestro estudio nos vamos a centrar fundamentalmente en el estudio de la patología degenerativa del raquis lumbar.

Como anteriormente se comentó la región lumbosacra es mucho más vulnerable que otras regiones del raquis debido a la existencia de fuerzas que tienden a desestabilizar la posición erecta que caracteriza al ser humano. La fuerza de la gravedad es la gran desestabilizadora de la columna.

Se define como dolor lumbar (lumbalgia o raquialgia lumbar) el que se localiza en un área anatómica que se encuentra entre la zona dorsal baja hasta la región sacra e irradiado en ocasiones hacia los glúteos. Este dolor lumbar lo podemos atribuir a las lesiones de las estructuras del raquis lumbar o lumbosacro (ya sean estructuras óseas, ligamentosas, discales, nerviosas o musculares) que tiene una suficiente intensidad para impedir la actividad normal de la persona que lo sufre o requiere una consulta médica (Deyo y cols., 1998; De Pedro y cols., 2002).

Podemos decir que las características que pueden definir la raquialgia lumbar son (De Pedro y cols., 2004):

1. Dolor de suficiente intensidad o duración.
2. Incapacidad, aunque sea parcial o temporal.
3. Que ambas manifestaciones sean producidas por una lesión del raquis lumbar o lumbosacro y/o las estructuras relacionadas íntimamente por el.

La mayoría de la población española sufre periodos intermitentes de dolor lumbar, en general de corta duración e intensidad, que no precisan ningún tipo de consulta especializada médica. La mayoría de estos episodios suelen tener origen o influencia de algún esfuerzo de tipo mecánico o posturas inadecuadas debidas a la actividad laboral.

Debemos diferenciar la lumbalgia de la ciatalgia o radiculalgia, que se trata de un dolor que aunque generalmente se inicia a nivel lumbar se caracteriza por su irradiación por una o las dos extremidades inferiores y asociado, en un elevado porcentaje de casos, de alteraciones sensitivas, motoras y de los reflejos osteotendinosos aquileo y rotuliano.

La raquialgia lumbar puede presentarse en personas de cualquier edad, pero es mucho más común entre las edades de 25 a 50 años y el de la radiculalgia, en pacientes de mayor edad, a partir de los 35-40 años de manera habitual. En el caso de aparecer dolor lumbar en el paciente joven este suele ser de menor intensidad y las crisis de ciatalgia son de menor duración (Main, 1983).

Debido a la alta incidencia de patología del raquis lumbar, son variados los tratamientos de tipo médico y rehabilitador que intentar solventar los cuadros dolorosos lumbares o radiculares. Cuando los tratamientos médicos fracasan o existen compromisos medulares o radiculares sintomáticos, es necesario recurrir a los tratamientos quirúrgicos. Dentro de los mismos tenemos múltiples opciones desde extirpación de la hernia, hasta fusiones vertebrales utilizando implantes metálicos. Todas estas cirugías desde las más simples a las más complejas corren el riesgo de sufrir la aparición de fibrosis epidural en la zona quirúrgica, una de las causas más importantes de fracaso de la cirugía del raquis, por lo que todas aquellas medidas encaminadas a eliminar o disminuir la producción de fibrosis epidural tendrán un claro beneficio para todos los pacientes sometidos a dichas cirugías (Imagen 5).

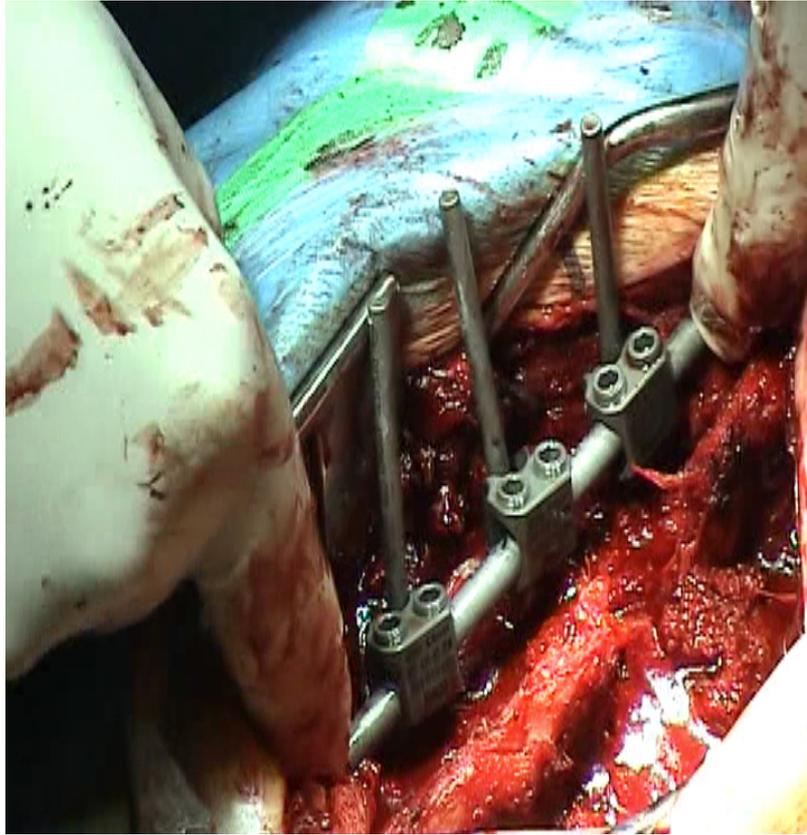


Imagen 5. Visión intraoperatoria de técnica de fusión vertebral instrumentada.

2.2. ANATOMÍA DE LA COLUMNA VERTEBRAL.

Desde el punto de vista anatómico la columna vertebral la podemos definir como la unión segmentaria de vértebras que constituye la parte subcraneal más importante del esqueleto axial. Sus elementos individuales, las vértebras, están unidos por una serie de articulaciones intervertebrales que forman un eje firme pero flexible que sostiene el tronco y sus apéndices, proporcionando al mismo tiempo una cobertura protectora para la médula espinal.

La totalidad de la columna vertebral esta formada por 33 ó 34 vértebras; 7 cervicales, 12 dorsales y 5 lumbares que constituyen la sección presacra móvil de la columna vertebral, mientras que los otros 5 elementos fusionados constituyen el sacro que se articula con la cintura pelviana. Caudalmente, al sacro, 4 ó 5 huesecillos irregulares constituyen el cóccix (Imagen 6).

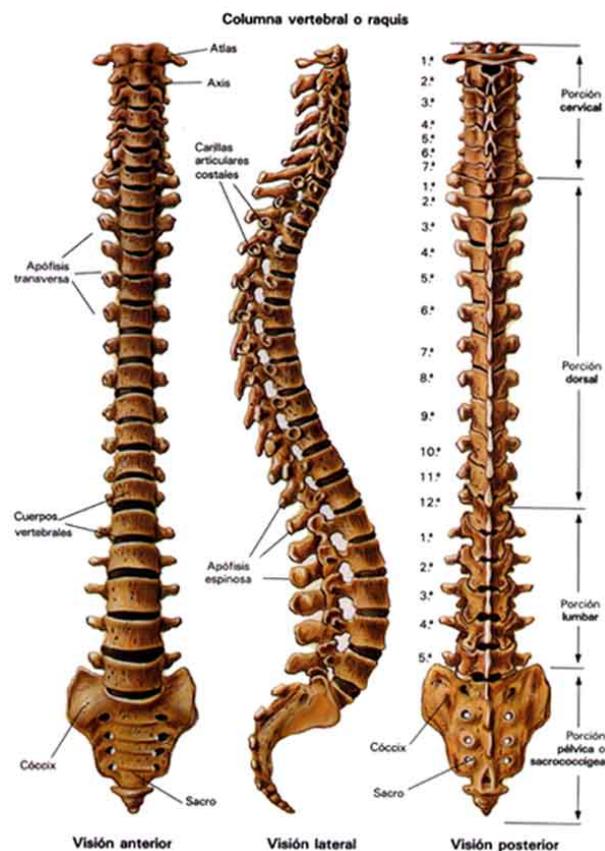


Imagen 6. Columna vertebral humana en visión anterior, lateral y posterior (Schünke y cols., 2005).

Como en los movimientos de la columna vertebral están involucradas 97 diartrosis (articulaciones de bajo rango de movilidad), y un número mayor de anfiartrosis (articulaciones de muy bajo rango de movilidad), la vértebra individual posee múltiples apófisis y marcadas superficies que indican la unión de los numerosos ligamentos y estructuras musculares que intervienen en la realización de los movimientos.

A pesar del hecho de que estas características varían considerablemente de una región del raquis a la siguiente, el origen segmentario homólogo de las vértebras permite aplicar una descripción generalizada única para la morfología básica de todas las vértebras con excepción de las más cefálicas y las más caudales.

La vértebra típica esta formada por dos componentes principales: una masa anterior aproximadamente cilíndrica de hueso esponjoso, el llamado cuerpo vertebral; y una región posterior: el arco vertebral dorsal, constituido por los pedículos, láminas, apófisis articulares superiores e inferiores y la apófisis espinosa (Imágenes 7, 8 y 9).

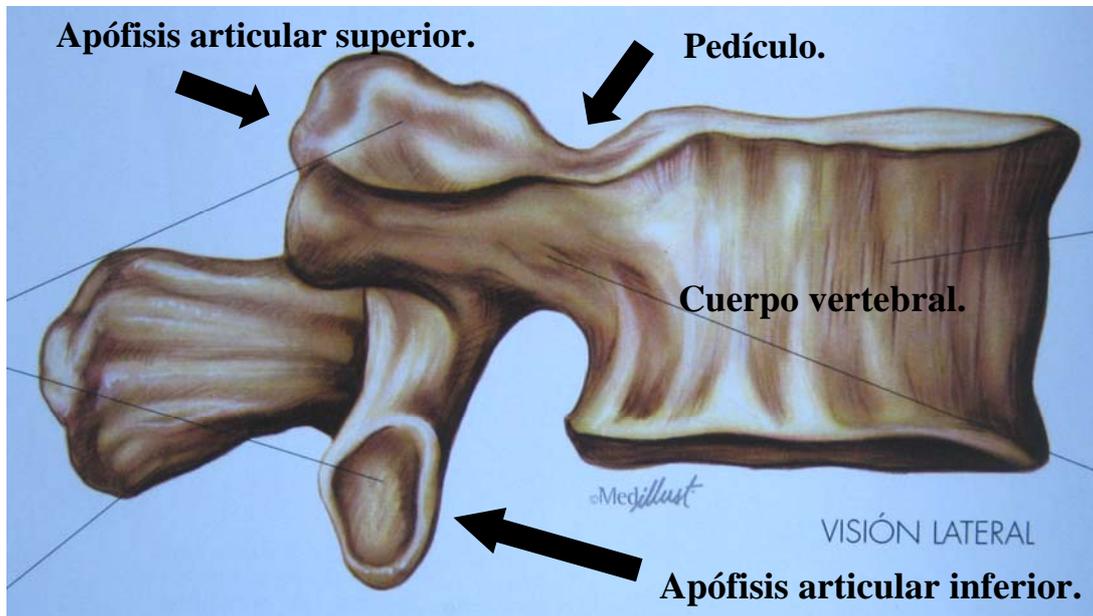


Imagen 7. Vértebra lumbar. Visión lateral (Schünke y cols., 2005).

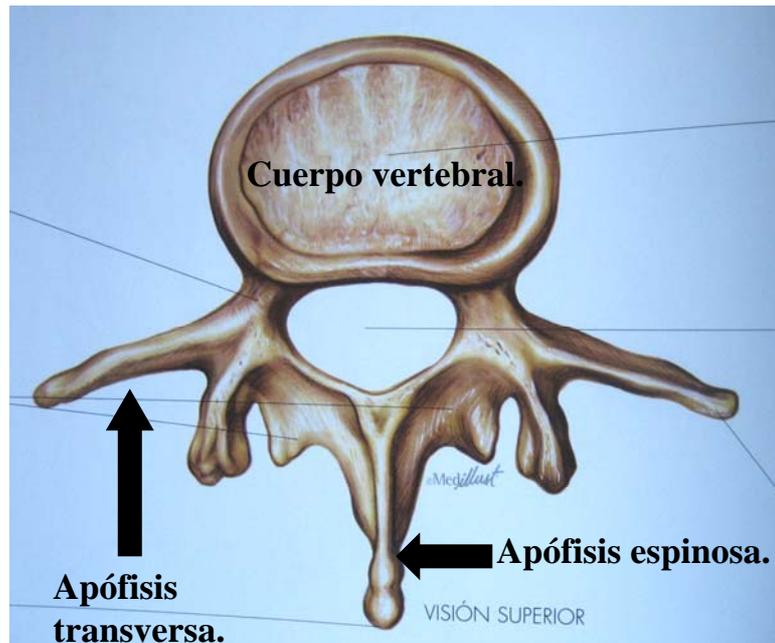


Imagen 8. Cuerpo vertebral. Vista superior (Schünke y cols., 2005).

Los cuerpos vertebrales varían considerablemente en el tamaño y en la forma del contorno en el corte transversal, pero todos ellos carecen de apófisis salientes y de rasgos externos singulares, fuera de las carrillas articulares para las costillas, en la región dorsal. Por el contrario el arco vertebral posee una estructura más compleja, esta unido a las caras posteriores del cuerpo vertebral por dos fornidos pilares, los pedículos. Estos se hallan unidos por un par de láminas planas arqueadas que están coronadas en la línea media por una proyección dorsal, la apófisis espinosa. Los pedículos, las láminas y la cara posterior del cuerpo vertebral forman el canal vertebral, un anillo óseo completo que encierra y protege a la médula espinal (Rouvière y Delmas., 1991).

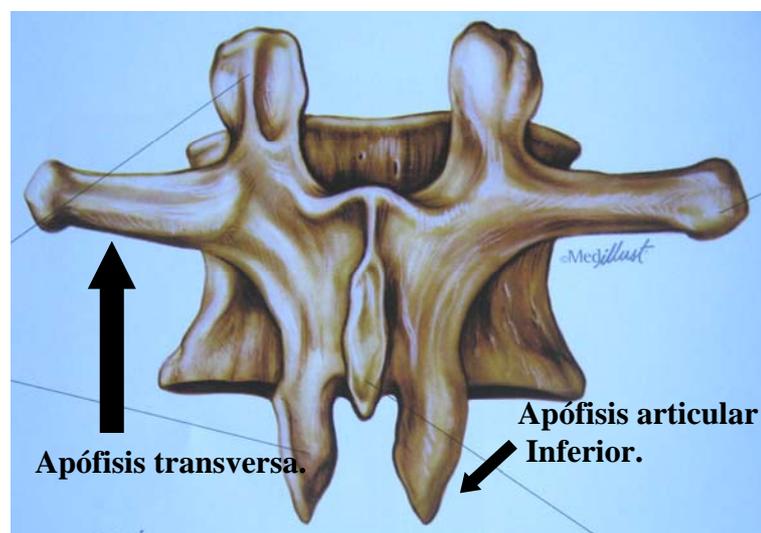


Imagen 9. Vértebra lumbar. Visión posterior (Schünke y cols., 2005).

Cerca de la unión de los pedículos con las láminas se encuentran las apófisis transversas laterales y las apófisis articulares superiores e inferiores.

La dimensión longitudinal de los pedículos es de aproximadamente la mitad de la de su correspondiente cuerpo vertebral. En su cara lateral los pedículos y sus apófisis articulares forman las escotaduras vertebrales superior e inferior. Como la base del pedículo se origina de la parte posterior del cuerpo vertebral en un punto algo cefálico, la escotadura vertebral inferior parece ser más profunda. En la columna vertebral articulada, las opuestas escotaduras superior e inferior constituyen los agujeros intervertebrales por donde pasan las raíces nerviosas y las estructuras vasculares desde los niveles medulares correspondientes hasta los segmentos corporales relacionados en el desarrollo.

A continuación se describe con más detalle las vértebras lumbares ya que se trata de este segmento de la columna vertebral donde con más frecuencia se van a realizar las técnicas quirúrgicas siendo imprescindible un adecuado conocimiento de esta región anatómica.

2.2.1 VÉRTEBRAS LUMBARES.

Las vértebras lumbares constituyen las últimas cinco de la columna presacra. Todas sus características se expresan en proporciones más abultadas, pero sus elementos diagnósticos esenciales son negativos; es decir, pueden distinguirse fácilmente de los demás elementos regionales por la falta de un agujero transverso, como ocurre en las vértebras cervicales, o por la falta de carillas articulares costales, que si las presentan las vértebras torácicas. Todas las estructuras asociadas con el arco vertebral son romas y sólidas. Los gruesos pedículos están ampliamente ubicados sobre las caras posterolaterales del cuerpo vertebral, y con sus láminas forman el macizo de un agujero vertebral triangular. Si bien, la escotadura vertebral inferior es más profunda que la superior, ambas contribuyen de modo sustancial a la formación del agujero de conjunción. Las apófisis transversas son planas y con forma de ala en las cuatro primeras vértebras lumbares, pero en la quinta tienen un aspecto de gruesos muñones redondeados. A parte de, por su tamaño relativo, las vértebras lumbares pueden reconocerse por sus apófisis articulares. El par superior nace de modo usual, de la unión de los pedículos con las láminas, pero sus carillas articulares son cóncavas y dirigidas hacia atrás y adentro, de modo que casi se encuentran enfrentadas. Las

apófisis inferiores son extensión de las láminas, con las superficies articulares dirigidas hacia abajo y afuera, por lo tanto miran a las carillas superiores de la siguiente vértebra inferior. Esta ordenación restringe la rotación y la flexión en la región lumbosacra. Los segmentos lumbares también poseen las apófisis mamilares más pronunciadas para el origen e inserción de las gruesas divisiones inferiores de los músculos de la masa lumbar (Rothman y Simeone., 1986) (Imagen 10).

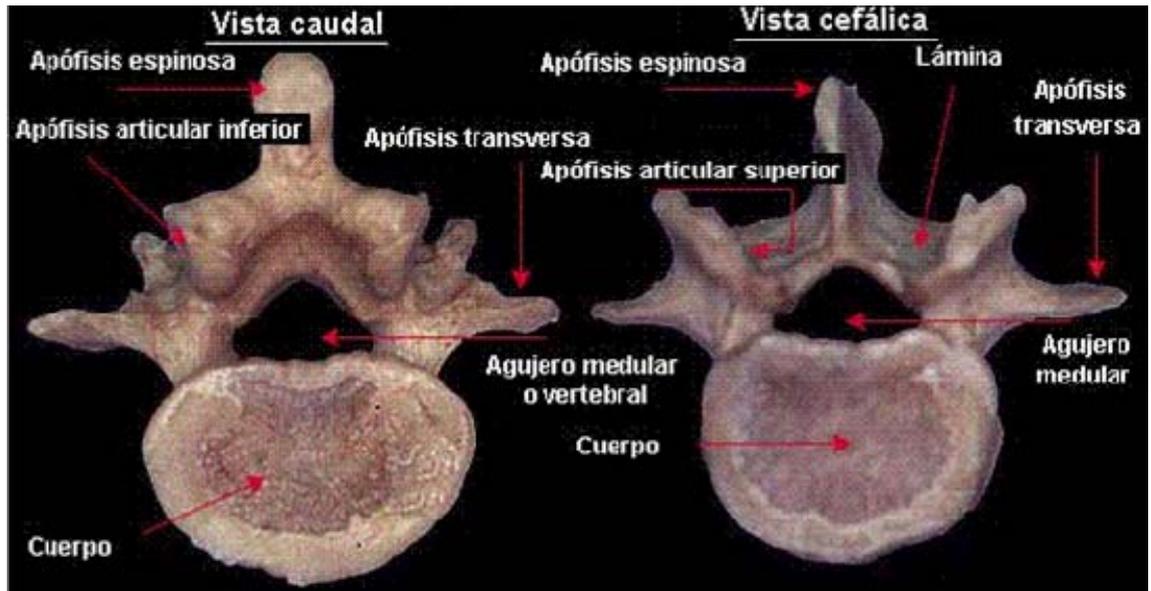


Imagen 10. Imagen en vista caudal y cefálica de una vértebra lumbar. (Imagen obtenida y modificada de internet:

<http://www.fhuce.edu.uy/antrop/cursos/abiol/practicos/troncimg/lumbar.jpgimgref=ht tp://biocuarto>).

Además de las estructuras óseas existen otras serie de estructuras ligamentosas que se encargan de unir las distintas vértebras entre si; estos ligamentos son: ligamento longitudinal anterior, longitudinal posterior, amarillos, intertransversos, interespinosos y el ligamento supraespinoso, los 3 primeros son ligamentos dobles, mientras que el ligamento supraespinoso es una estructura única (Imagen 11).

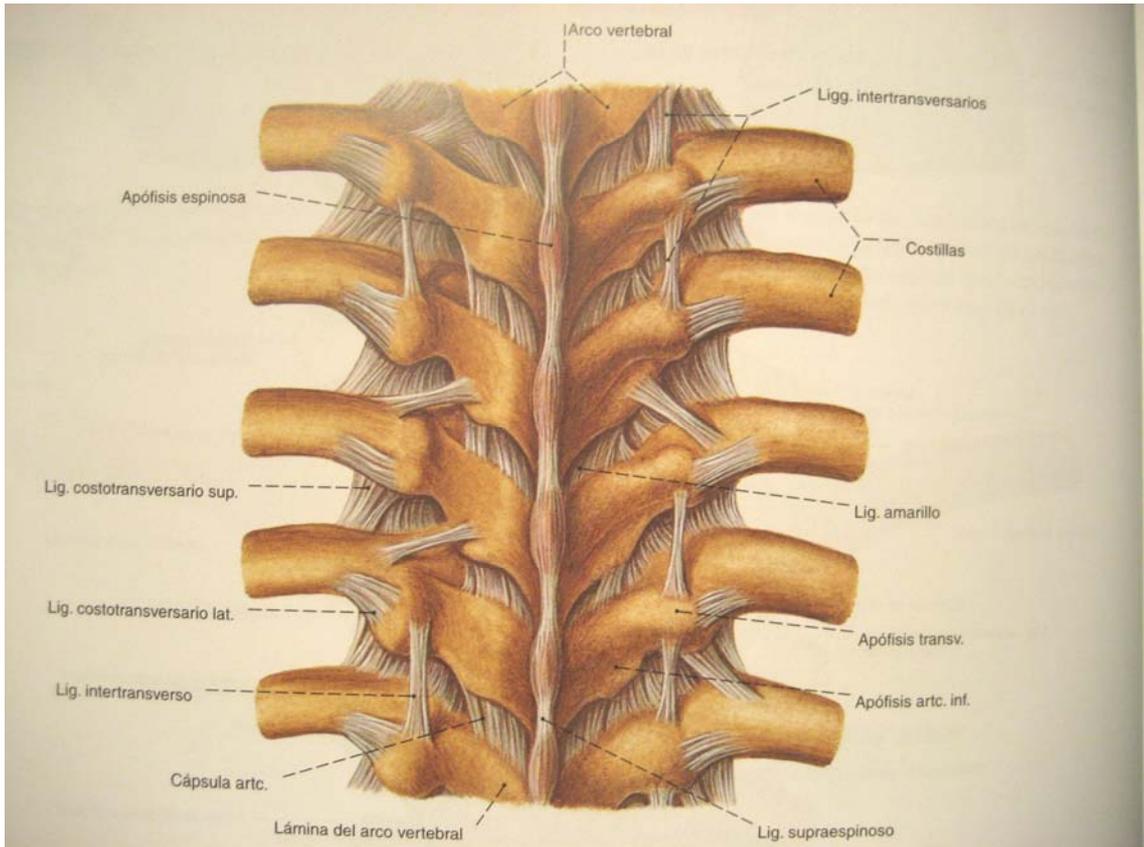


Imagen 11. Imagen de los ligamentos de la columna vertebral (Schünke y cols., 2005).

Los ligamentos amarillos puentean los espacios que existen entre las láminas de vértebras adyacentes desde la segunda vértebra cervical hasta el espacio lumbosacro. Hacia fuera cada ligamento amarillo se extiende hasta alrededor de las bases de las apófisis articulares, y puede encontrarse en la línea media donde casi se unen a nivel de las raíces de las apófisis espinosas, esta deficiencia central del ligamento amarillo permite el paso de pequeños vasos y facilita la introducción de la aguja durante la punción lumbar.

Los ligamentos intertransversos son conexiones fibrosas que existen entre las apófisis transversas. Son difíciles de distinguirse de las extensiones de las inserciones tendinosas de los músculos segmentarios y, en realidad, en algunas regiones pueden ser sólo eso. Entre las apófisis transversas cervicales, estos ligamentos aparecen constituidos por pocas fibras, delgadas y tirantes, y en el área dorsal se mezclan con los ligamentos intercostales. A nivel lumbar los ligamentos intertransversos se encuentran más separados, pudiendo ser aislados como auténticas bandas membranosas.

Los ligamentos interespinosos son grupos de fibras que conectan apófisis espinosas contiguas. Están situados en la línea media, entre el delgado par de músculos interespinosos

que unen los vértices de la columna vertebral. Sin embargo, las fibras de los ligamentos tienen una ordenación oblicua, de modo que conectan la base de las apófisis espinosas superiores con la cresta superior y el vértice de las apófisis espinosas inferiores siguientes (Putz y Pabst., 2004) (Imagen 12).

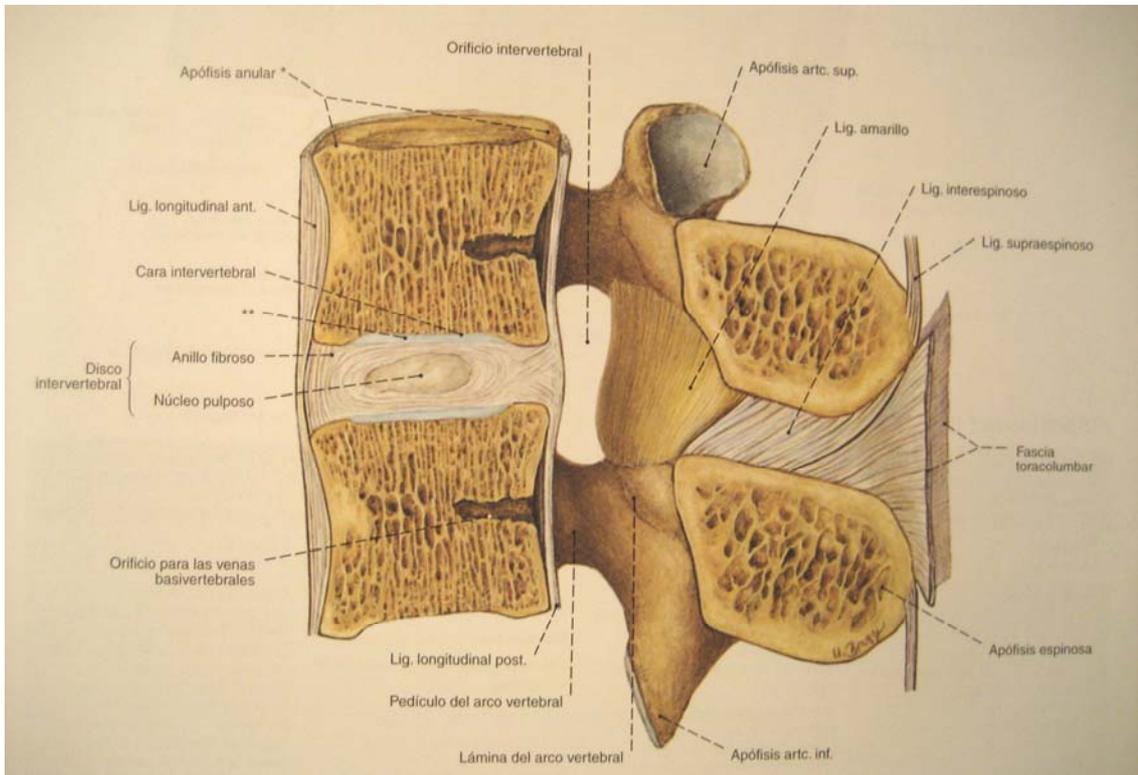


Imagen 12. Imagen lateral de la columna vertebral lumbar y sus ligamentos (Schünke y cols., 2005).

El ligamento supraespinoso es un cordón fibroso continuo que corre a lo largo de los vértices de las apófisis espinosas desde la séptima vértebra cervical hasta el extremo de la cresta espinosa del sacro. Como ocurre con los ligamentos longitudinales vertebrales, las fibras más superficiales del ligamento supraespinoso se extiende sobre varios segmentos espinales, mientras que las fibras más profundas, más cortas, unen solo dos o tres apófisis espinosas entre si.

Por último debemos destacar otra estructura fundamental en el raquis, se trata del disco intervertebral.

El disco intervertebral es el complejo fibrocartilagenoso que constituye la articulación entre los cuerpos vertebrales. Si bien proporciona una unión muy fuerte asegurando el grado de fijación intervertebral necesaria para la acción efectiva y para la

alineación protectora del canal neural, la suma de los movimientos limitados permitidos por cada disco consigue que la columna vertebral actué como un todo y sea posible su característico movimiento universal de flexoextensión. Cada disco está formado por dos compartimentos: la masa semilíquida interna, el núcleo pulposo, y su continente fibroso laminar, el anillo fibroso (Imagen 13).

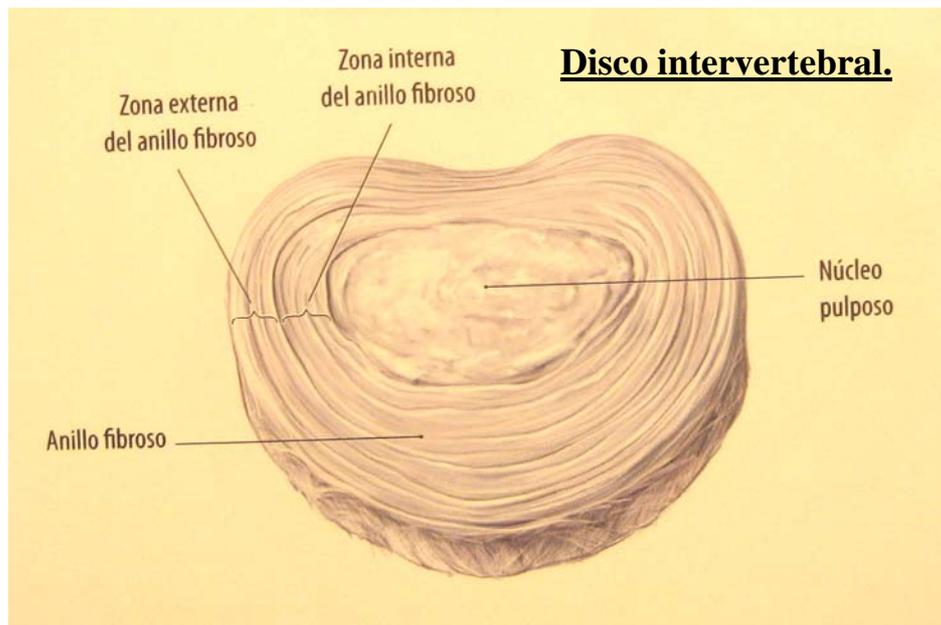


Imagen 13. Disco intervertebral (Schünke y cols., 2005).

Característicamente el núcleo pulposo ocupa una posición excéntrica dentro de los límites del anillo, en general, se encuentra más próximo al borde posterior del disco. Este núcleo responde como un líquido viscoso ante la presión aplicada; pero también presenta considerable rebote elástico y asume su estado físico original cuando se le deja de presionar.

El anillo está formado por una serie concéntrica de laminillas fibrosas, que encierran el núcleo y unen fuertemente los cuerpos vertebrales. Mientras la función esencial del núcleo pulposo es resistir y redistribuir las fuerzas compresivas en la columna vertebral, una de las principales funciones del anillo es soportar tensiones, provengan estas de la extensión horizontal del núcleo comprimido, de fuerzas tensionales aplicadas sobre la columna o de la separación de los cuerpos vertebrales en la cara convexa de la columna vertebral al realizar una flexión espinal. En un corte horizontal del anillo se observa que la laminilla individual que encierra al disco está compuesta por fibras brillantes que tienen

una dirección oblicua o en espiral respecto al eje de la columna vertebral. Como en el corte horizontal la forma del disco es de riñón y como el núcleo está desplazado hacia atrás, estas laminillas son más delgadas y más estrechamente apretadas entre el núcleo y la parte posterior del disco. Las bandas son más fuertes y se pueden individualizar mejor en el tercio anterior del disco (Imagen 14).

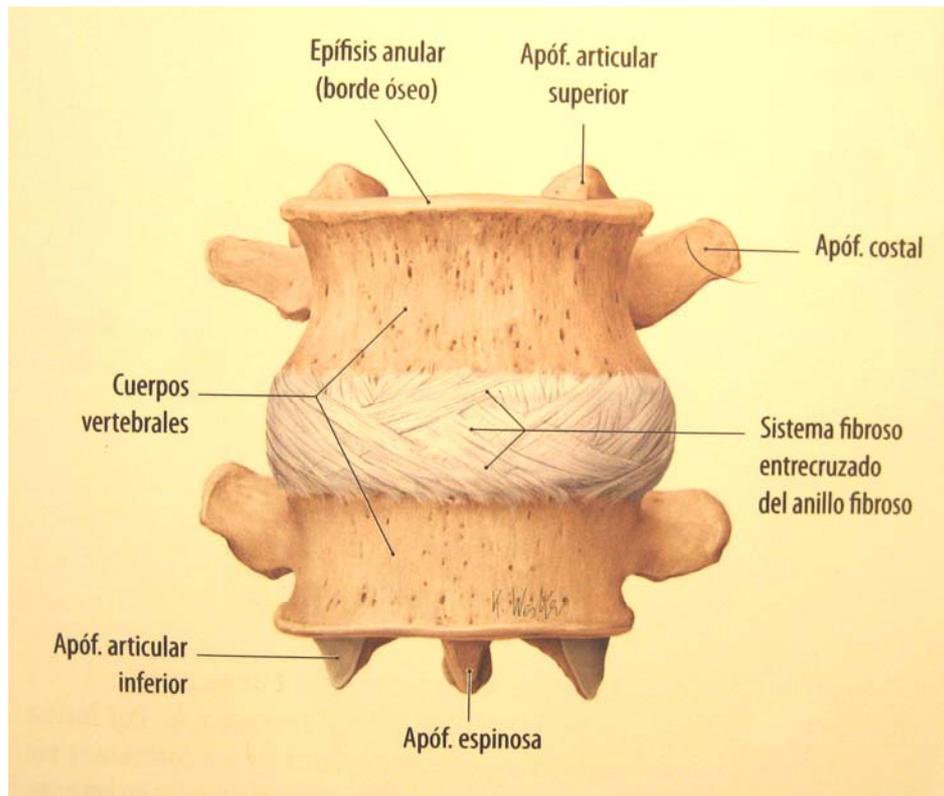


Imagen 14. Cuerpos vertebrales y disco intervertebral (Schünke y cols., 2005).

Sumando la altura de todos los discos, representan aproximadamente un cuarto de la longitud de la columna vertebral presacra, pero su grado de contribución no es uniforme en las diferentes regiones. A nivel cervical constituyen más de la quinta parte de la longitud, alrededor de la quinta parte en la columna dorsal y aproximadamente un tercio en la región lumbar. Los discos son más pequeños en la región cervical y su extensión lateral es menor que la del cuerpo vertebral debido a la presencia de las apófisis unciformes (elementos de unión vertebral a nivel cervical), mientras que en la región lumbar tienen forma de cuña, con el mayor ancho en la parte anterior, lo cual contribuye a la formación de la curva vertebral lordótica típica de dicho segmento.

El disco intervertebral es una estructura avascular debido a razones fisiológicas, ya que no hay ninguna pared vascular que pueda soportar las presiones a que se verían

sometidas estas estructuras. El disco intervertebral está adaptado funcionalmente a las presiones que recibe y esto influye en el proceso de nutrición del mismo. Ambos fenómenos, cambios de presión y nutrición discal, presentan una sutil dependencia, y si alguno de ellos se altera, se producirá a la larga la degeneración discal (Rothman y Simeone., 1986).

Si la fuerza a que se somete al disco es demasiado alta, se paraliza la difusión de sustancias desde el sistema venoso, principalmente de los senos venosos intervertebrales, produciéndose el retardo del metabolismo celular discal. Si el disco se encuentra sometido a presiones asimétricas, la actividad metabólica es mayor en las zonas de menor presión, esto es importante en las escoliosis o en los aumentos de lordosis a nivel de la columna lumbosacra. Además debido a la inclinación entre la quinta vértebra lumbar y la primera sacra de unos 140°, la compresión que sufre el disco no es igual en todas sus partes y esta es una de las razones por la cual este disco presenta una degeneración más precoz y más frecuente que el resto de los disco de la columna vertebral (Fernández-Irueñas, 1993).

La unidad funcional del raquis (UFR) esta constituida por dos vértebras contiguas y los elementos de unión entre ellas. Se trata de un complejo triarticular constituido por una primera articulación, el disco intervertebral y las otras dos articulaciones interapofisarias derecha e izquierda. La unidad funcional raquídea se divide en dos partes, la parte anterior constituida por el ligamentos vertebral común anterior, disco intervertebral, cuerpo y ligamento vertebral común posterior; y la parte posterior de la unidad funcional raquídea formada por los pedículos, láminas, facetas articulares y su cápsula, apófisis transversas, apófisis espinosa, ligamentos e inserciones musculares (Fernández-Irueñas, 1993) (Imagen 15).

Las facetas articulares son articulaciones de una movilidad limitada, clasificándolas, por tanto, como diartrodias, esto tiene una clara influencia sobre los movimientos que se producen en ellas. Durante la flexión de dos vértebras, las apófisis articulares inferiores de la vértebra superior se deslizan hacia arriba, produciéndose la separación de las apófisis articulares de la vértebra inferior. En los movimientos de extensión las apófisis articulares de la vértebra superior se encajan con las apófisis articulares de la vértebra inferior, produciéndose el deslizamiento de las facetas articulares hacia abajo. En la flexión lateral tiene lugar un deslizamiento desigual de las apófisis articulares, en el lado en que se produce la extensión lateral hay una traslación de la faceta articular superior hacia arriba,

mientras que la faceta contraria presenta un deslizamiento hacia abajo. Por tanto la flexión y extensión se producen por el deslizamiento de las carillas articulares, pero al mismo tiempo el disco intervertebral se deforma en el sentido opuesto al movimiento realizado. La flexión se encuentra limitada por las propias facetas articulares al llegar al máximo de su deslizamiento, pero al mismo tiempo se produce la actuación de los ligamentos y de las fibras más posteriores del anillo fibroso. La extensión esta controlada también por las carillas articulares con su propio deslizamiento y por los ligamentos vertebrales. Aunque nunca se alcanza el grado máximo de extensión, ya que la apófisis espinosa llega a contactar con su homónima inferior, en el movimiento de flexión se produce un desplazamiento asociado anterior del cuerpo vertebral (Denis, 1984) (Imagen 16).

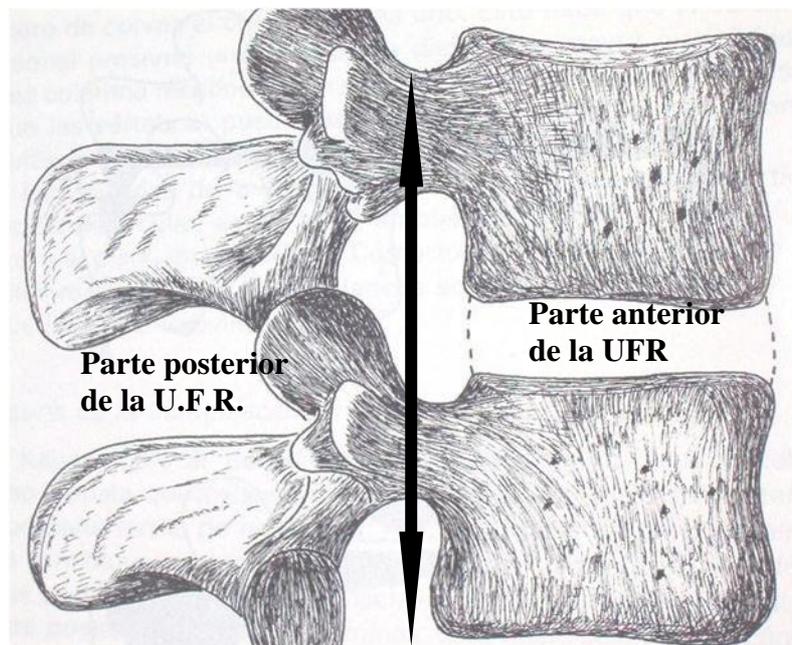


Imagen 15. Unidad Funcional Raquídea (UFR) (parte anterior y posterior).

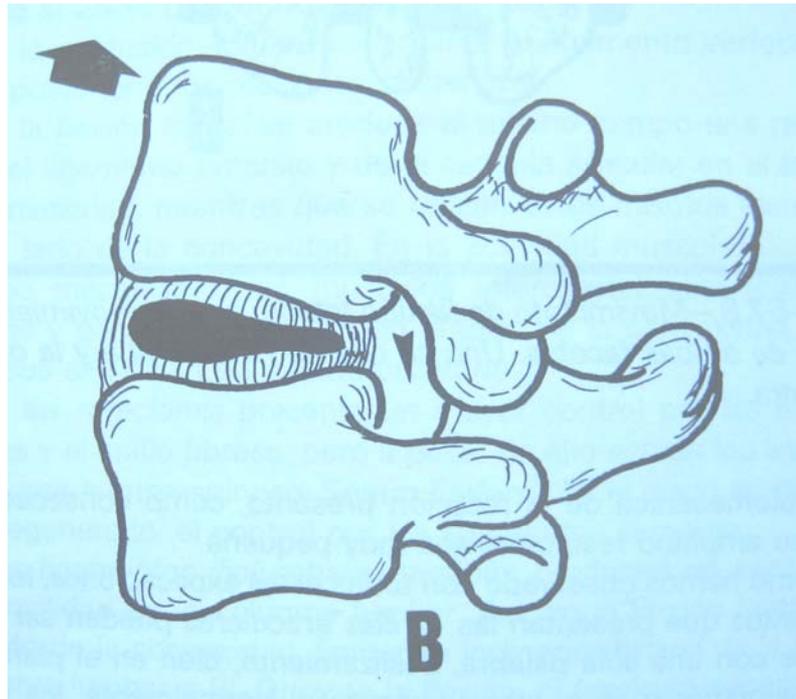


Imagen 16. Movimiento de extensión de la columna lumbar (Imagen obtenida de Fernández-Irueñas, 1983).

Junto con el disco intervertebral, al formar parte de la unidad funcional raquídea, las articulaciones facetarias también van a soportar las fuerzas de compresión, de forma que en bipedestación y con una lordosis normal estas facetas absorben el 16% de la carga que soporta el conjunto de la unidad funcional raquídea.

Al estudiar la fisiopatología de los procesos degenerativos de la columna vertebral, se observa que todos comienzan por una lesión menor de alguno de los elementos de la unidad funcional raquídea, ya sea del disco o de las facetas articulares. Al comienzo hay unos cambios mínimos, tanto a nivel del disco como de las articulares, pero con el tiempo estos cambios se vuelven severos en ambas formaciones anatómicas; en segundo lugar los cambios degenerativos que se producen en una unidad funcional se extienden progresivamente a otras unidades hasta la degeneración total del segmento o de la columna.

Las facetas articulares a pesar de su movilidad limitada poseen una constitución anatómica muy similar a la de las grandes articulaciones, presentando un cartílago articular o hialino, una cápsula con su membrana sinovial e incluso un pseudomenisco. El gran inconveniente funcional de estas pequeñas articulaciones son las fuerzas de presión y carga a que se encuentran sometidas, que son mucho más elevadas por unidad de superficie que en cualquier otra articulación del organismo, incluyendo la rodilla, cadera o tobillo que se

consideran clásicamente como las grandes articulaciones de carga. Esta presión por unidad de superficie aumenta de manera considerable en el caso de que el disco intervertebral deje parcialmente de desempeñar su función de soporte de carga. Cuando se produce este fenómeno, inicialmente se ponen en marcha una serie de modificaciones anatómicas en la columna vertebral que intentan defender a las apófisis articulares: hay una hipertrofia relativa de las láminas y el ligamento amarillo, pero este sistema de autodefensa se vuelve contra la columna ya que estas hipertrofias ocasionan la estenosis del canal vertebral. Posteriormente se produce un incremento de la membrana sinovial, esta alteración produce cambios en la composición y volumen del líquido sinovial, que parece ser el origen de las alteraciones degenerativas del cartílago articular que sufre un proceso de fibrilación, fisuración y finalmente destrucción total del mismo.

Desde el momento en que comienza la disminución y destrucción del grosor del cartílago se produce una laxitud capsular, tanto por este hecho patológico como también por el aumento del volumen del líquido articular. La consecuencia es que la articulación comienza a tener movimientos que pueden ser considerados como anormales, traduciéndose en una inestabilidad que puede llegar a producir una subluxación articular en los últimos grados de los movimientos. Se instaura de esta manera un proceso que podemos considerar como un círculo vicioso, la degeneración produce al comienzo una inestabilidad y esta, a su vez, aumenta el proceso degenerativo. La evolución del binomio degeneración-inestabilidad no presenta una secuencia indefinida, y llega un momento en que la artrosis producida estabiliza la articulación produciendo su rigidez.

A pesar de que las facetas articulares de una misma unidad funcional raquídea son simétricas y están situadas a un mismo nivel, es frecuente que presenten un proceso evolutivo degenerativo diferente. Este hecho fisiopatológico tiene una repercusión clínica, por ello resulta relativamente frecuente que el síndrome facetario (dolor causado por la degeneración de la faceta) sea unilateral o que el dolor sea más acusado en uno de los dos lados de la columna. Biomecánicamente esta degeneración asimétrica tiene su influencia, ya que aparece un componente rotatorio al existir una articulación más inestable que su homónima, traduciéndose en una aceleración del proceso patológico (Rothman y Simeone., 1986).

En lo referido a la degeneración discal su fisiopatología ha sido ampliamente estudiada debido a su complejidad y a la repercusión que tiene en la patología humana. El

suceso etiopatogénico primario de la degeneración discal es la pérdida insidiosa del contenido de agua en el núcleo pulposo, dicho proceso se inicia ya en la infancia y progresa continuamente a lo largo de la vida adulta, ocasionándose una aceleración del proceso en las últimas décadas de la vida. Estos hechos bioquímicos producen una serie de cambios biomecánicos en el disco. La propiedad principal del disco intervertebral, que es la distribución de las presiones que se ejercen sobre el, se altera sustancialmente al producirse su deshidratación. Este hecho fisiopatológico conlleva una serie de trastornos que pueden considerarse encadenados y a la vez interdependientes (Fernández-Irueñas, 1983):

1. Sobrecarga de las articulaciones facetarias que están relacionadas íntimamente con la rotura de las láminas del anillo fibroso.
2. Movimientos anormales a nivel de las articulaciones, con desarrollo de inestabilidad.
3. La posterior degeneración articular con disminución del diámetro del canal neural.

Todos estos procesos degenerativos del complejo triarticular son una fuente de dolor: ya sea por la herniación del núcleo pulposo que origina la clínica de hernia discal; por la degeneración discal y la lesión de las articulaciones facetarias asociadas causantes de la lumbalgia degenerativa o por la hipertrofia fundamentalmente de articulaciones facetarias y ligamentos amarillos que conducen a la estenosis del canal vertebral lumbar con el consiguiente compromiso radicular y/o medular asociado.

En algunas de estas entidades y una vez que acontecen estas modificaciones a nivel del disco, apófisis articulares y ligamentos, y a pesar de realizar tratamientos conservadores que incluyen medicaciones analgésicas y anti-inflamatorias, tratamientos fisioterápicos y rehabilitadores, etc., y ante el fracaso de los mismos, se hace necesario recurrir al tratamiento quirúrgico para eliminar el núcleo pulposo y liberar la raíz nerviosa atrapada en el caso de hernias discales; estabilizar la columna en el caso de lumbalgias degenerativas o descomprimir el canal vertebral en caso de estenosis del mismo.

2.3. DIAGNÓSTICO POR IMAGEN DE LA COLUMNA VERTEBRAL.

Gracias a los estudios complementarios de imagen tanto Tomografía Axial Computerizada (TAC) como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), actualmente tenemos una excelente visión del canal neural y de las estructuras que lo componen y podemos identificar la presencia de fibrosis epidural. Con estas pruebas de imagen se ha podido demostrar la presencia de esta fibrosis intracanal tras la realización de cirugía sobre el raquis, aunque no existe una correlación plenamente demostrada entre una mayor extensión de la fibrosis y la aparición de dolor lumbar y/o radicular de tipo crónico y la intensidad del mismo (Annertz y cols., 1995; Vogelsang y cols., 1999; Coskum y cols., 2000) (Imagen 17).



Imagen 17. Corte axial de columna lumbosacra. Estudio de TAC.

Varias han sido las técnicas utilizadas para el estudio de la columna vertebral intervenida. Las imágenes radiográficas únicamente nos permiten una aproximación de las estructuras óseas sin poder aportarnos ninguna información sobre la existencia o no de fibrosis epidural o la magnitud de la misma, posteriormente los estudios de TAC incrementaron la cantidad y calidad de los datos de las estructuras óseas, aportándonos además alguna información de los elementos neurales intracanales. Las asociaciones de

TAC y mielografía daban más datos sobre la presencia de recidivas herniarias intracanales pero el riesgo de estas técnicas era elevado. Fue la llegada de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) la que revolucionó todo el estudio de la columna vertebral ya sea operada o no.

La RMN es un método de estudio no invasivo, que no emplea radiaciones ionizantes (con lo que se evita el riesgo de las mismas) aportándonos unas claras imágenes tanto axiales, sagitales y coronales de todos los elementos intracanales, ya sea el cordón medular o las raíces nerviosas. Además esta técnica se puede asociar con el empleo de contrastes paramagnéticos intravenosos como el gadolinio que facilitan el estudio de la columna vertebral operada, convirtiéndose en el momento actual en el método de elección para el estudio de la misma.

El motivo más frecuente para el estudio mediante métodos de imagen de la columna operada es el síndrome de fracaso de la cirugía de columna, secundario a la cirugía de hernia discal, procesos degenerativos, inestabilidad o estenosis de canal; definiéndose como fracaso de la cirugía lumbar la aparición de nuevos síntomas dolorosos y la persistencia o recurrencia de los síntomas existentes previos a la cirugía.

La incidencia del síndrome de fracaso de la cirugía de columna varía entre el 10-30%. Las causas son múltiples, muchas de ellas relacionadas con la cirugía y otras no. Como causas quirúrgicas tenemos: fibrosis o cicatriz epidural, hematoma intracanal, recidiva herniaria, aracnoiditis, infección y la fistula de líquido cefalorraquídeo (LCR). Causas no quirúrgicas más frecuentes son: hernia discal en un lugar no operado, artrosis facetaria, estenosis de canal, espondilolisis con o sin espondilolistesis y el dolor referido de otras causas (LaRocca y MacNab., 1974; Kimm y Michelsen., 1992; Fischgrund, 2004).

Antes de poder interpretar anomalías en la imagen postoperatoria es necesario conocer las secuencias de acontecimientos demostrados por la RMN en la columna postoperada normal.

Elementos posteriores: el lugar de la cirugía es fácilmente identificable en las imágenes de RMN. Tanto los cortes sagitales como axiales muestran ausencia de estructuras normales (pérdida de la alta intensidad de la señal normal de la médula ósea en imágenes en T1 y de baja intensidad de señal del hueso cortical en T1 y T2, también

encontraremos ausencia del ligamento amarillo y disrupción de los planos grasos y musculares posteriores normales.

El lugar de la laminectomía sufre cambios progresivos a lo largo del tiempo. Imágenes obtenidas en el postoperatorio inmediato, demuestran tejido edematoso irregular, de intensidad de señal intermedia en T1 e hiperintensa en T2, que puede mostrar efecto masa, desplazando el saco tecal. En los meses siguientes la intensidad de señal se hace más homogénea en T1 y disminuye en T2, debido a la formación de tejido cicatricial, perdiéndose el efecto masa inicial. El saco tecal a menudo se desplaza posteriormente hacia el lugar de la laminectomía, pudiendo llegar a protruir en los tejidos blandos.

Debido a esta gran cantidad de cambios en los tejidos blandos epidurales y en el disco intervertebral, la RMN debe interpretarse con precaución en el periodo del postoperatorio inmediato. La RMN puede utilizarse en este periodo para excluir una hemorragia postoperatoria significativa en el lugar de la laminectomía, un pseudomeningocele o una infección del espacio discal. Son frecuentes pequeñas colecciones líquidas en los tejidos blandos posteriores tras la laminectomía. La intensidad de señal de los mismos variará dependiendo de su contenido, así las colecciones serosas presentan una intensidad de señal idéntica al LCR, y las colecciones serosanguinolentas mostraran un aumento de la intensidad de señal en T1 debido a los productos de degradación de la hemoglobina. No es posible la distinción entre pequeñas colecciones líquidas en el postoperatorio inmediato y colecciones infectadas mediante RMN basándose en su morfología o intensidad de señal.

La hemorragia típicamente muestra iso o hiperintensidad del espacio epidural en T1 y disminuye de intensidad de señal en gradiente de eco o T2 no debiendo confundirse con los injertos grasos colocados sobre la zona quirúrgica y utilizados por algunos cirujanos en un intento de evitar la formación de cicatriz epidural. El empleo de técnicas de supresión grasa permitirá esta diferenciación (Imágenes 18 y 19).



Imagen 18. Cortes sagitales de RMN en T2 de columna lumbosacra.

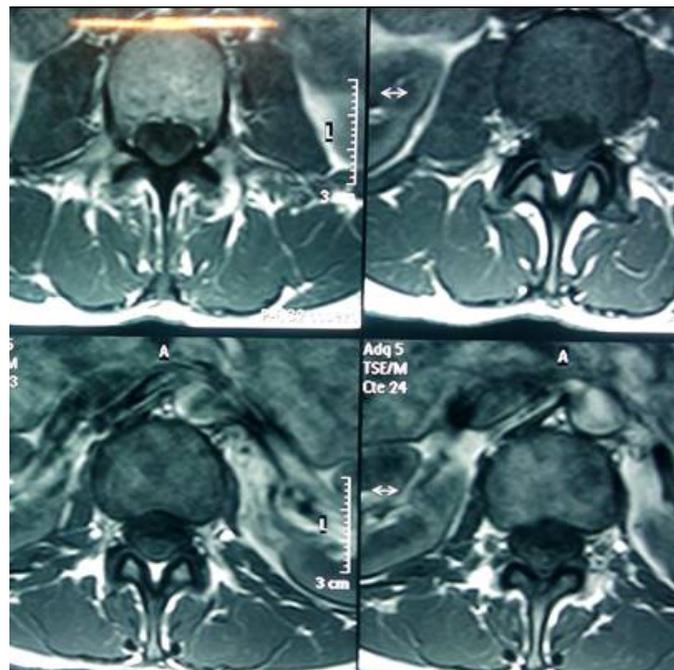


Imagen 19. Corte axial de RMN de columna lumbosacra.

La distinción entre fibrosis epidural y hernia discal persistente o recurrente representa la indicación más frecuente de RMN en la columna lumbar postoperada. La RMN sin contraste se ha demostrado, al menos equivalente al TAC con contraste en la distinción entre cicatriz y disco intervertebral, aportando la RMN la ventaja de ser una técnica que no utiliza radiaciones ionizantes. Con el uso de contrastes paramagnéticos,

como el gadolinio, la RMN muestra unos rangos de exactitud en esta distinción que varía entre el 96% y el 100% según las series (Huefthe y cols., 1988; Ross y cols., 1990).

En general la hernia discal aparece como un tejido blando, anómalo, contiguo con el disco original, de morfología nodular, liso y bien definido, típicamente isointenso en T1 e hipo o hiperintenso en T2 comparando con el disco intervertebral original. La variabilidad de la intensidad de señal del disco en secuencias en T2 se atribuye a las relativas diferencias de hidratación entre el disco remanente y el disco herniado. El tiempo transcurrido entre la herniación discal y la RMN también afecta al estado de hidratación del disco en intensidad de la señal en imágenes de T2. La presencia de efecto masa con desplazamiento de tejidos neurales es considerada una imagen típica de la hernia discal.

Tras la inyección de contraste paramagnético, como el gadolinio, el disco muestra ausencia de captación en el periodo postinyección temprana (6-10 min.) debido a su naturaleza avascular; sin embargo en imágenes tardías (20-30 min. tras la inyección) el material discal puede captarlo debido a su difusión dentro del disco desde el tejido cicatricial vascularizado adyacente. Si coexiste una gran cantidad de tejido cicatricial con un disco herniado relativamente pequeño, fenómenos de volumen parcial pueden oscurecer el material discal.

La captación del margen posterior del disco es un hallazgo frecuente postdiscectomía, de significado clínico desconocido. Probablemente represente cicatriz o tejido de granulación infiltrando el disco a través de un defecto en el anulus posterior.

Adicionalmente en estudios de RMN de seguimiento de una hernia discal recidivante puede aparecer captación del contraste por el material discal, debido a invasión por tejido cicatricial, en un intento de respuesta reparativa.

La fibrosis epidural se presenta en la mayoría de las columnas intervenidas y representa el reemplazamiento de la grasa epidural normal por tejido fibrótico postoperatorio. Morfológicamente esta fibrosis conforma una cicatriz epidural que generalmente aparece como una masa extradural de configuración irregular, con unos márgenes mal definidos y típicamente sin contigüidad con el disco. Las características de señal en RMN son variables y dependen de muchos factores. La retracción del saco tecal hacia este tejido anómalo, cuando esta presente, apoya el diagnóstico de cicatriz epidural,

sin embargo la cicatriz también puede presentarse con efecto masa sobre estructuras neurales adyacentes.

La fibrosis epidural capta contraste en el periodo de postinyección inmediata, con independencia del tiempo transcurrido desde la cirugía, debido a su abundante vascularización, constituyendo este el principal criterio diferencial con la hernia discal (Kaiser y Ramos., 1992).

2.4. SÍNDROME DE FRACASO DE LA CIRUGÍA DE COLUMNA.

Definimos el síndrome de fracaso de la cirugía de columna como la aparición de nuevos síntomas dolorosos y la persistencia o recurrencia de los síntomas existentes previos a la cirugía.

El papel de la fibrosis en el síndrome de fracaso de cirugía de columna es controvertido. Ha sido relacionada con resultado quirúrgico desfavorable y recurrencia de los síntomas pero no existe una correlación plenamente demostrada entre una mayor extensión de la fibrosis y la aparición de dolor lumbar y/o radicular de tipo crónico y la intensidad del mismo habiéndose afirmado, que ni la cantidad de cicatriz ni el grado de realce por contraste se relacionan directamente con el síndrome clínico (Hurme y cols., 1991; North y cols., 1991; Jinkins y cols., 1993; Annertz y cols., 1995; Grane y cols., 1996; Vogelsang y cols., 1999; Coskum y cols., 2000).

Hasta el momento no se ha demostrado que la fibrosis epidural aparezca con más frecuencia en pacientes sintomáticos o que la resección quirúrgica de la cicatriz conduzca a mejoría clínica.

En los estudios de RMN las características de la señal de la hernia discal son hipointensidad en T1 y T2, mientras que la fibrosis aparece iso o hipointenso en T1 e hiperintenso en T2. Tras la administración de Gadolinio como contraste se observa que en la fibrosis se produce un realce heterogéneo y no hay realce en el resto del disco o en la recidiva discal. La positividad de la RMN es de más del 90% para establecer el diagnóstico diferencial entre hernia discal y fibrosis epidural (Imágenes 20 y 21).

Otras causas del síndrome de fracaso de la cirugía de columna son la presencia de estenosis de canal, que consiste en la disminución del diámetro del canal vertebral con la consiguiente compresión de los elementos neurales tanto cordón medular como raíces nerviosas contenidas en el mismo. Dicha estenosis tras la cirugía, resulta de la suma de cambios degenerativos progresivos debidos al envejecimiento y al estrés mecánico sobreañadido sobre el complejo triarticular discovertebral como resultado de la cirugía. Ha

sido implicado como causa de síndrome de fracaso de cirugía de columna en un 50-60% de los casos (Burton y cols., 1981).

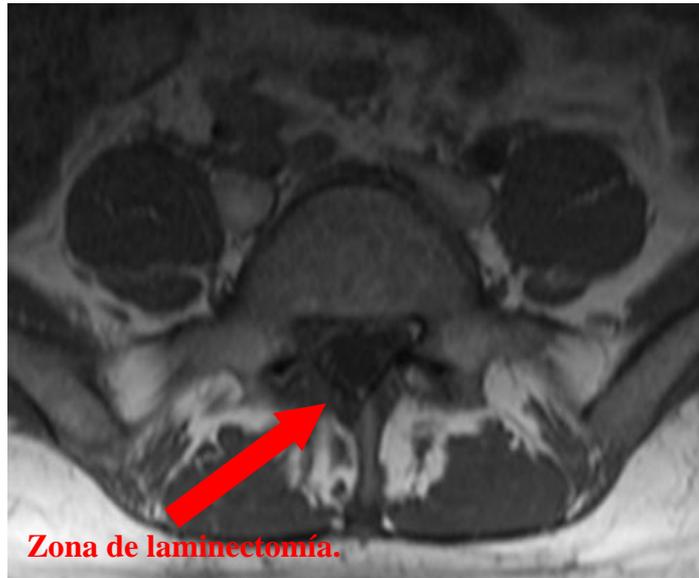


Imagen 20. Estudio de RMN tras laminectomía con ocupación del espacio epidural. Imagen sin contraste (imagen tomada de internet http://radpod.org/wp-content/uploads/2006/12/postop_back_arrows.JPG).



Imagen 21. Misma imagen de RMN esta vez realizada tras la administración gadolinio donde se puede observar la captación del mismo estableciéndose el diagnóstico de fibrosis epidural (imagen tomada y modificada de internet http://radpod.org/wp-content/uploads/2006/12/postop_back_arrows.JPG).

Esta estenosis afecta más frecuentemente al foramen de conjunción y al receso lateral debido a la combinación de hipertrofia de las carillas articulares, desplazamiento anterior de la carilla superior y protrusión del remanente del anillo fibroso debido a la

pérdida de altura del disco, menos frecuentemente la estenosis postoperatoria puede manifestarse como estrechamiento severo del canal central debido a cambios hipertróficos de las articulaciones interapofisarias y ligamentos amarillos. Puesto que durante la cirugía el ligamento amarillo se extirpa a nivel del disco herniado, la estenosis central afecta con más frecuencia a un nivel por encima o por debajo del espacio intervenido.

En el síndrome de fracaso de la cirugía lumbar, también se debe establecer el diagnóstico diferencial entre fibrosis epidural y la presencia de un pseudomeningocele que es una colección de líquido cefalorraquídeo (LCR) que resulta de un desgarro dural en el momento de la cirugía. En el caso de un pseudomeningocele, en RMN observamos un área redondeada, isointensa con el resto de LCR intramedular, posterior al saco tecal y en el lugar de la cirugía previa. La expansión del pseudomeningocele dural durante un periodo de tiempo origina una cápsula fibrosa que se distiende por la transmisión continua del latido del LCR. Puede observarse niveles líquido-líquido debido al depósito de productos sanguíneos. Los pseudomeningoceles deben ser también diferenciados de pequeñas evaginaciones laterales del saco tecal que son un hallazgo a veces frecuente tras la laminectomía.

La inestabilidad lumbar persistente o recurrente es otra causa de dolor postoperatorio en pacientes tras fusión quirúrgica lumbar. La valoración clínica de la inestabilidad postoperatoria es difícil y puede no ser posible diferenciarlo de los síntomas relacionados con la hernia discal o fibrosis epidural. La RMN proporciona una valoración no invasiva de la integridad funcional de la fusión espinal. En una fusión estable se observan bandas subcondrales de hiperseñal en secuencias en T1 en los platillos vertebrales. En imágenes en T2 estas bandas subcondrales son isointensas o débilmente hiperintensas comparadas con la médula ósea normal. Una fusión inestable generalmente se caracteriza por bandas subcondrales de baja intensidad de señal en secuencias T1, e hiperintensas en secuencias T2. Estos cambios presumiblemente corresponden a inflamación, hiperemia y/o tejido de granulación que resulta de un incremento del estrés bioquímico en el segmento espinal inestable.

La infección postoperatoria es una causa poco común pero importante de síntomas lumbares tras la cirugía espinal. Los pacientes con infección postoperatoria del espacio discal comienzan clínicamente con dolor lumbar severo semanas después de la cirugía. El diagnóstico a menudo se retrasa si los hallazgos de los estudio por imagen se atribuyen a

cambios normales del periodo postoperatorio inmediato. La RMN permite el diagnóstico temprano y es el mejor método para valorar la extensión de la afectación ósea y de partes blandas. Generalmente se observa afectación del disco, con osteomielitis vertebral adyacente o formación de absceso epidural. La infección del espacio discal se presentará como áreas de baja intensidad de señal en T1, con pérdida de la definición entre el disco y el platillo vertebral. En imágenes en T2 observamos un aumento de señal del disco y de la médula ósea de los cuerpos vertebrales adyacentes.

La discrepancia entre los distintos trabajos y la falta de una explicación clara acerca de esta recurrencia del dolor y la incapacidad tras la cirugía del raquis lumbar hace necesaria la realización de estudios, para intentar determinar el verdadero origen de este dolor por lo que los estudios experimentales son la primera fase para poder realizar posteriores ensayos clínicos en humanos que puedan discernir el origen de esta fibrosis y prevenir la recidiva del dolor debido a la misma.

No existe ninguna teoría que explique de una manera definitiva el origen de esta fibrosis epidural. Distintos autores afirman que la fibrosis epidural tendría su origen en la proliferación e invasión vascular y en la reacción inflamatoria de los tejidos blandos, fundamentalmente a nivel muscular, que recubren las estructuras medulares. Al realizar el abordaje quirúrgico para acceder al canal medular se originaría la lesión de estas estructuras musculares, en cuyo proceso reparativo se produciría una reacción inflamatorio-cicatricial que tiende a reparar esta estructura. Sería esta proliferación vascular junto a la reacción inflamatoria-cicatricial el origen de estos fibroblastos que migrarían a la zona del canal vertebral, proliferarían y terminarían creando este tejido cicatricial que envolvería a las estructuras neurales medulares y radicales (Fager y Freidberg., 1980; Burton y cols., 1981; Abdou y Hardy., 1999; Coskun y cols., 2000).

Este tejido fibrótico esta compuesto de manera fundamental de colágeno, que se trata de una molécula proteica que forma fibras, las fibras colágenas, estando presentes en cantidad variable en todos los tipos de tejido conjuntivo y es producida principalmente por los fibroblastos y también por otras estirpes celulares como condroblastos y osteoblastos. El colágeno está formado por una proteína precursora llamada tropocolágeno que mide alrededor de 300 nm de largo y 1,4 nm de diámetro. El tropocolágeno está formado por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas alfa, cada una de ellas constituida por un polipéptido, formado por una repetición en tándem de tres aminoácidos siendo muy ricas

en prolina o hidroxiprolina y glicina, cada una de un peso molecular de alrededor de 100.000 Da. Estas cadenas tienen una configuración helicoidal levógira (hélice de colágeno). Las tres cadenas se enrollan y se fijan mediante enlaces transversales para formar una triple hélice dextrógira con una distancia entre las vueltas de 8,6 nm (Brodsky y Persikov., 2005).

El colágeno en lugar de ser una proteína única, se considera una familia de moléculas estrechamente relacionadas pero genéticamente distintas, describiéndose varios tipos de colágeno, siendo los principales cuatro (Forriol, 1999):

Colágeno tipo I: Se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón y la córnea. Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras colágenas mayores. Sus subunidades mayores están constituidas por cadenas alfa de dos tipos, que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y en su secuencia. A uno de los cuales se designa como cadena alfa1 y al otro, cadena alfa2. Es sintetizado por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. Su función principal es la de resistencia al estiramiento.

Colágeno tipo II: Se encuentra sobre todo el en cartílago, pero también se presenta en la córnea embrionaria y en la notocorda, en el núcleo pulposo y en el humor vítreo del ojo. En el cartílago, forma fibrillas finas de 10 a 20 nm, pero en otros microambientes puede formar fibrillas más grandes, indistinguibles morfológicamente del colágeno tipo I. Está constituido por tres cadenas alfa2 de un único tipo. Es sintetizado por el condroblasto. Su función principal es la resistencia a la presión intermitente.

Colágeno tipo III: Abunda en el tejido conjuntivo laxo, en las paredes de los vasos sanguíneos, la dermis de la piel y el estroma de varias glándulas. Parece un constituyente importante de las fibras de 50 nm que se han llamado tradicionalmente fibras reticulares. Está constituido por una clase única de cadena alfa3. Es sintetizado por las células del músculo liso, fibroblastos, glía. Su función es la de sostén de los órganos expandibles.

Colágeno tipo IV: Es el colágeno que forma la lámina basal que subyace a los epitelios. Es un colágeno que no se polimeriza en fibrillas, sino que forma un fieltro de moléculas orientadas al azar, asociadas a proteoglicanos y con las proteínas estructurales laminina y fibronectina. Es sintetizado por las células epiteliales y endoteliales. Su función principal es la de sostén y filtración.

La composición de aminoácidos del colágeno es bastante particular. La glicina representa, en moles, aproximadamente 1/3 de los aminoácidos presentes. También contienen cantidades muy elevadas de prolina, y de hidroxiprolina (hasta el 10%), y es una de las pocas proteínas que contiene hidroxilisina.

Tampoco está demostrada que la sola presencia de este tejido fibrótico, formado por colágeno, en torno a la médula y las raíces nerviosas sea la única causa de la aparición del dolor, actualmente se piensa que este tejido fibrótico influiría en la movilidad de las estructuras neurales impidiendo los pequeños movimientos adaptativos de estas estructuras al realizarse los movimientos de la columna vertebral, siendo esta falta de movilidad y la adherencia a las estructuras próximas la causa del dolor. También se cree que esta estructura fibrótica alteraría el libre intercambio de los nutrientes y las sustancias de desecho fruto del funcionamiento de las estructuras neurales con lo que se alteraría el equilibrio celular y esto originaría dolor (Hernández y cols., 1990; Miyamoto y cols., 2003; Kulkarni y cols., 2007).

2.5. MÉTODOS DE PREVENCIÓN DE LA FIBROSIS EPIDURAL.

Para prevenir la aparición de esta fibrosis epidural debido a la lesión muscular y de partes blandas y siendo este el posible origen de la reacción inflamatoria-cicatricial, desde hace años se están perfeccionando las técnicas quirúrgicas en busca de una menor lesión y agresividad. El desarrollo de cirugías mínimamente invasivas y de mejores instrumentales quirúrgicos busca la menor lesión posible de las partes blandas y reducir, en la medida de lo posible, la reacción inflamatoria.

Otro campo de estudio se basa en la utilización de métodos de barrera a nivel local que frenen la progresión de la fibrosis desde las estructuras musculares situadas sobre el canal neural hacia el interior del mismo. Desde hace años se encuentran en estudio y uso clínico, distintas sustancias que actuarían como contención mecánica, colocados sobre el canal medular, en busca de evitar la progresión de la fibrosis dentro del canal neural. Se han utilizado injertos pediculados o libres de grasa, Politetrafluoretileno expandido (PFTEe®), láminas de Ácido Poliláctico (Macropore®), ADCON-L® (gel biorreabsorbible de gelatina y poliglicanos) etc., pero ninguno de estos métodos ha sido plenamente efectivo ni exento de riesgos como la aparición de hematomas y compresiones a nivel medular o radicular, infecciones, reacciones de cuerpo extraño, etc., por lo que su uso no se encuentra generalizado dentro de la práctica clínica actual (Cabezudo y cols., 1985; Songer y cols., 1990; Abitbol y cols., 1994; He y cols., 1995; Songer y cols., 1995; Alkakay y cols., 2003; Lee y cols., 2004; Liu y cols., 2006; Tatsuy y cols., 2006; Brzezicki y cols., 2008).

Otros métodos han sido probados para disminuir la presencia de la fibrosis epidural tras la cirugía, su uso no se basa en la utilización de sistemas barrera sino en la empleo de radiación ionizante en la zona quirúrgica para prevenir el desarrollo de la fibrosis epidural dado el efecto anti-inflamatorio y de inhibición de la proliferación celular causado por la radiación. Otras sustancias con efecto anti-inflamatorio utilizadas a nivel experimental como protectores de la fibrosis epidural han sido el activador tisular del plasminógeno, anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), compuestos mórficos, etc. (Gerszten y cols., 2000; Bora y cols., 2001; Kemaloglu y cols., 2003; Sabuncoglu y cols., 2007; Mastronardi y cols., 2008; Sandoval y Hernández-Vaquero., 2008).

Actualmente existen en estudio nuevas sustancias que intentan disminuir la presencia de fibrosis epidural, entre ellas se encuentra el uso de antibióticos como la Mitomicina C, interferón gamma, etc., con buenos resultados experimentales en la prevención de la fibrosis epidural (Lee y cols., 2004; Emmez y cols., 2008).

2.6. ÁCIDO HIALURÓNICO.

El ácido hialurónico (AH) es un glicosaminoglicano (GAG's) descubierto por Meyer y Palmer en 1934. Estos autores describieron el proceso para aislar lo que en aquel momento era un nuevo glicosaminoglicano obtenido del humor vítreo del ganado bovino. Mostraron que esta sustancia contenía un ácido urónico y un amino azúcar, pero no sulfóesteres. Así propusieron como nombre "ácido hialurónico", de "hialoide" (humor vítreo) más ácido urónico. En ese momento ignoraban que la sustancia que habían descubierto se convertiría en una de las más interesantes y útiles macromoléculas naturales (Meyer y Palmer., 1934).

A diferencia del resto de GAG's, como el condroitín sulfato, el dermatán sulfato o el keratán sulfato, el AH es el único no sulfatado y que, además, no presenta núcleo proteico ni es sintetizado por el aparato de Golgi. Aparece en forma de polianión y no como ácido libre. Generalmente, presenta alto peso molecular (PM), aunque también se encuentra en forma de oligosacárido. Es un polímero lineal, no ramificado, formado por la repetición de un disacárido constituido por N-acetilglucosamina y ácido glucurónico, unidos por enlaces glicosídicos β 1-4. Los disacáridos se unen por enlaces β 1-3, formando la cadena de AH (Weissmann y Meyer, 1954; Kakehi y cols., 2003; Prehm, 2006; Girish y Kemparaju., 2007) (Imagen 22).

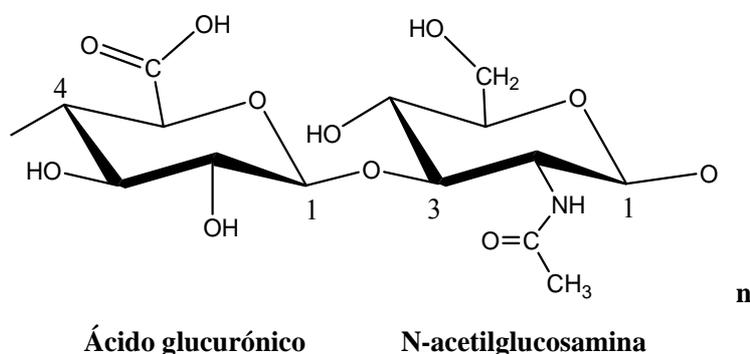


Imagen 22. Fórmula orgánica estructurada del ácido hialurónico. Su fórmula empírica es $(-4\text{Gl}_c\text{UA}\beta_1-3\text{Gl}_c\text{NA}_c\beta_1)_n$.

De entre los factores físico-químicos que caracterizan al AH y sobre el que se sustentan la mayoría de sus funciones fisiológicas, destacan sus propiedades reológicas, fundamentalmente su viscoelasticidad. El comportamiento reológico es decisivo en las aplicaciones del AH y su peso molecular acentúa su viscosidad. De hecho, en solución acuosa muestra un comportamiento muy viscoelástico y una gran capacidad para atrapar moléculas de agua, debido a su elevado peso molecular y al gran número de grupos cargados polares en su estructura. Dicha capacidad para englobar moléculas de agua ya fue señalada por Meyer y Palmer, indicando que el ácido libre es muy higroscópico pero no fácilmente soluble en agua, aunque las sales son muy solubles, formando soluciones de alta viscosidad (Meyer y Palmer., 1934; Gura y cols., 1998; Almond y cols., 2006; Blundell y cols., 2006; Ribeiro y cols., 2008).

En este sentido, estudios reológicos y de dispersión concluyen que las cadenas de AH son semiflexibles en solución. Así pues, el AH es una excelente molécula para rellenar espacios, pudiendo deformarse en situaciones de crecimiento rápido y remodelación tisular, a la vez que atrapa agua e iones con el fin de mantener la hidratación y proteger el tejido circundante. Su viscoelasticidad le permite moverse libremente en espacios vacíos, proporcionando a las células un lecho sobre el que moverse y mantenerlas parcialmente localizadas. La alta viscosidad del AH a bajos gradientes de velocidad y su comportamiento no Newtoniano a altos gradientes de velocidad, a menudo interpretados como la evidencia de la existencia de redes estables se deben simplemente a que la cadena forma un ovillo. Sin embargo, existen pocas evidencias de que se produzcan interacciones específicas entre las cadenas de AH en solución salina, por lo que su alta viscosidad no puede ser atribuida a la asociación de cadenas de AH. Por el contrario, el enorme volumen del AH y las interacciones intermoleculares transitorias, las cuales son más frecuentes con la superposición de dominios moleculares, determinan la viscosidad del AH (Gribbon y cols., 2000; Scott y Heatley, 2002; Cowman y Matsuoka., 2005; Almond, 2007).

El AH presenta una amplia distribución en los seres vivos. El AH aparece principalmente en matrices extracelulares y pericelulares, aunque también se ha demostrado que aparece intracelularmente, donde es catabolizado y desarrolla importantes funciones. En la mayor parte de los tejidos blandos, el AH aparece asociado a proteínas como consecuencia de interacciones de cargas positivas con cargas negativas. En tejidos duros, como la matriz del cartílago articular, el AH se presenta unido a través de una proteína de unión al agregán, proteoglicano formado por colágeno, condroitín sulfato y

keratán sulfato. Los complejos AH-agrecán presentan enormes PM's, mayores de 100 mDa que quedan embebidos en una estructura de colágeno. A pesar de que inicialmente se creyó que el papel del AH era servir únicamente como relleno del tejido conectivo, el estudio de proteínas de unión y receptores del AH han revelado sus numerosas funciones. Actualmente, se reconoce que este GAG's juega un papel fundamental en la transducción de la señal celular, en la motilidad celular, en procesos tumorales y en metástasis, entre otros (Tammi y cols., 2002; Schiller y cols., 2003; Weigel y DeAngelis., 2007).

En cuanto a la degradación y renovación del AH su catabolismo es un proceso rápido y continuo que básicamente se atribuye a las hialuronidasas, enzimas que catabolizan el AH y que están ampliamente distribuidas. La degradación del AH engloba distintos pasos. En la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos adultos, el AH presenta alto PM, contribuyendo a las propiedades mecánicas de la matriz. Para ser liberado de esta red firme, el polímero debe ser parcialmente degradado, facilitando así la internalización de cadenas de PM medio en las células a través de mecanismos fundamentalmente mediados por receptores del AH, o bien transferidos a la circulación que los lleva a órganos donde se degrada el AH, como nódulos linfáticos, riñón o hígado. De este modo, el AH es fragmentado en el compartimento lisosomal, donde se hidroliza en pequeños oligosacáridos por hialuronidasas intracelulares. Estos fragmentos son finalmente degradados en monosacáridos por exoglicosidasas presentes en los lisosomas. Estos monosacáridos pueden ser reutilizados para la síntesis de polisacáridos (Laurent y cols., 1998; Lepperdinger y cols., 2004).

Sin embargo, en el catabolismo del AH no sólo se ven implicadas las hialuronidasas, sino que se producen dos mecanismos simultáneos y fundamentales: la ya mencionada degradación enzimática y la degradación por especies reactivas del oxígeno (ERO's). En el cerebro, el pulmón o el intestino delgado, las hialuronidasas se expresan en muy baja concentración. Además, en el líquido sinovial de articulaciones no se detecta apenas actividad de la enzima, a pesar de que la renovación en dicho líquido es muy alta. De ahí que se crea que el catabolismo químico del AH es un proceso bien establecido en articulaciones susceptible de degradación por ERO's, de manera que en procesos inflamatorios como artrosis, artritis reumatoide o fibrosis quística, entre otros, se generan numerosas ERO's que son capaces de atacar y romper las cadenas de AH, disminuyendo su PM (Flugge y cols., 1999).

El ácido hialurónico está presente de forma natural en todos los organismos vivos, y es un componente universal de los espacios existentes entre las células de los tejidos (espacio extracelular). Es un polisacárido con una estructura química idéntica, independientemente de que se encuentre en el cuerpo de una simple bacteria o de un ser humano. El ácido hialurónico puede encontrarse en muchas zonas del organismo humano como son:

- Piel: en la cual crea volumen (sin el ácido hialurónico, la piel estaría seca, marchita y arrugada).
- Cuerpo vítreo: donde da forma y volumen a los ojos.
- Cartílagos, huesos y líquido sinovial: en los que tiene el papel de lubricante, de material de absorción de los traumatismos y de filtro entre otras funciones.
- Vasos sanguíneos: aportándolos su elasticidad y consistencia.
- Cordón umbilical: cuya función consiste en evitar que se interrumpa el contacto entre la madre y el feto.

La longitud molecular del ácido hialurónico varía según los tejidos y las especies, y también depende en gran parte de las condiciones en las que se encuentre el tejido en cuestión.

Su abundancia de cargas negativas determina que esté extraordinariamente hidratado, como ha sido comentado. Se trata de una verdadera "esponja molecular". Además, la presencia de ácido hialurónico en la matriz extracelular impide o dificulta la difusión de macromoléculas a su través. Por este motivo, se comporta como una eficaz barrera contra la difusión de macromoléculas. Todos estos efectos hacen que el AH también haya sido utilizado de forma experimental para favorecer la regeneración nerviosa del nervio periférico lesionado (Mast y cols., 1992; Silva y cols., 2003).

La molécula de AH es hidrófila y atrae moléculas de agua, lo cual significa que se disuelve fácilmente en el agua. En una solución, las moléculas de la cadena del ácido hialurónico, muy largas y delgadas, se retuercen y se doblan, adoptando la forma de un ovillo que se expande al azar. Estos ovillos de AH son tan grandes que, incluso en una baja concentración de cerca del 0,1% (1 mg/ml), las moléculas de AH ocupan toda la

solución. Con una concentración más elevada, los ovillos de AH se enredan y se entrelazan, formando un entretejido molecular flexible de moléculas enlazadas. Este entramado de moléculas de ácido hialurónico puede conservar grandes cantidades de agua, mientras hace posible que los metabolitos entren y salgan de las células.

El AH interviene en los procesos de reparación tisular, cicatrización (interviniendo en la migración de los fibroblastos y en la fibrogénesis) y por ello se postula su aplicación local como sustancia anti-inflamatoria y anti-edematosa sin efectos tóxicos o indeseables. El ácido hialurónico de bajo peso molecular se uniría a varios tipos de receptores de membrana: CD 44, receptor de hialurónico mediador de la movilidad (RHAMM) y la molécula de adhesión intercelular 1 (hialoadherina). La unión del receptor CD 44 y el ácido hialurónico de bajo peso molecular originan la proliferación celular fibrilar, pero la presencia de altas concentraciones de AH de elevado peso molecular inhibe la unión del AH de bajo peso molecular a dicho receptor CD 44, inhibiéndose secundariamente la proliferación celular de fibroblastos con la consiguiente disminución de la fibrosis. De la misma manera la interacción de oligómeros de ácido hialurónico de tres a diez disacáridos (O-HA) con el receptor CD 44 y el RHAMM induciría activación angiogénica y neovascularización local junto a activación de factores inflamatorios derivados de los macrófagos. Pero ante la presencia de altas concentraciones de ácido hialurónico de elevado peso molecular se inhibe la unión del O-HA con el receptor CD 44 y el RHAMM con lo que inhibe la reacción inflamatoria y el proceso neovascular y fibrótico. (Mohamadzadeh y cols., 1998; Siegelman y cols., 1999; Nandi y cols., 2000; Sheehan y cols., 2004; Tsuyoshi y cols., 2005).

El ácido hialurónico ya desde sus inicios fue utilizado con fines comerciales. En 1942 Endre Balazs solicitó una patente de utilización del mismo, como sucedáneo de la clara de huevo en los productos de pastelería. Llegó a ser el primer especialista del AH, y ha contribuido con descubrimientos relativos a este ácido, durante los últimos cincuenta años (Balazs y Delinger., 1993; Balazs y cols., 1967).

2.6.1. USOS TERAPEÚTICOS Y APLICACIONES DEL ÁCIDO HIALURÓNICO.

Los usos terapéuticos del AH están relacionados con sus propiedades físico-químicas, sus efectos fisiológicos y sus funciones celulares, las cuales dependen de su PM y de su capacidad para actuar como sustancia de relleno, viscosuplementadora, antioxidante, anti-inflamatoria, reguladora de la angiogénesis, proliferación tumoral y actividad antifibrótica, entre otras (Rooney y cols., 1995; Waddington y cols., 2000; Moseley y cols., 2002; Teder y cols., 2002; Schimizzi y cols., 2006; Slevin y cols., 2007; Heldin y cols., 2008).

Debido al amplio espectro de posibilidades de aplicación del AH, la fuente de obtención del mismo resulta muy importante. Su origen puede ser tanto biológico como biotecnológico, y las impurezas que presenta en función de la fuente de la que se extrae pueden ejercer efectos dispares (Shiedlin y cols., 2004).

La extracción del AH de fuentes biológicas conlleva no pocas dificultades. Este AH se extrae de globo ocular bovino, cresta de gallo, cordón umbilical y tejidos ricos en AH como piel o cartílago. A pesar de esta diversidad de fuentes de obtención del AH de origen animal, se presenta el inconveniente de prevenir la contaminación bacteriana durante la recogida, transporte y extracción del tejido, lo cual es realmente complicado y una de las razones por las cuales este AH presenta un inesperado bajo tamaño molecular. A pesar de estos problemas, buena parte del AH se sigue obteniendo a partir de dichas fuentes biológicas. Con el fin de preservarlo, en algunos casos se le añaden aditivos como glutaraldehído o formalina, los cuales también contribuyen a que se produzca el llamado “cross-linking” o dicho de otro modo, se facilita el entrelazado de cadenas de AH, con proteínas o ADN que todavía quedan como impurezas. Estos procesos suponen la obtención de preparaciones de alto PM que, presentan trazas animales que podrían llevar a reacciones alérgicas o a la inducción de citoquinas pro-inflamatorias, entre otros (Rychlý y cols., 2006).

La fabricación de AH por biotecnología a través del uso de bacterias que presentan cápsulas de AH, como *Streptococcus*, está siendo también muy utilizada actualmente. La gran ventaja que presenta esta tecnología frente a la extracción de AH de tejidos y órganos animales es la incapacidad del sistema inmune humano para discernir entre el AH bacteriano y el propio, evitando así la presencia de antígenos y, en consecuencia, las

posibles reacciones alérgicas. Estos AH presentan PM's elevados, del orden de MDa. No obstante, el riesgo de mutación de las cadenas bacterianas y la posible coproducción de diversas toxinas o inmunógenos dificulta la amplia aplicación del AH obtenido por fermentación bacteriana (Mendichi y Schieroní., 2002).

En cuanto a las aplicaciones del AH, son múltiples los campos donde su uso se encuentra ampliamente difundido, dentro de la cosmética el AH es el relleno facial más utilizado y esta presente en infinidad de cremas anti-envejecimiento e hidratantes.

Dentro de la cirugía estética, plástica y reparadora el AH es utilizado para atenuar defectos faciales, líneas de expresión y arrugas, así como para aumento de labios., asimismo también son empleados implantes mamarios de AH (Brandimarte, 1973; Weigel y cols., 1986; Oksala y cols., 1993).

Debido a la capacidad viscosuplementadora del AH su uso también se extiende al campo de la cirugía ortopédica y traumatología, y en concreto al tratamiento sintomático de la artrosis. La osteoartritis o artrosis es una de las enfermedades artríticas más comunes, afectando al 10% de la población mundial. La aparición de artrosis es progresiva con la edad y supone la pérdida de la funcionalidad articular. Se cree que el 50% de las personas mayores de 65 años presentan evidencias de artrosis de rodilla y casi el 100% de los mayores de 75 años muestran cambios en al menos una articulación (Schiller y cols., 2003).

Los tratamientos para estas dolencias engloban tanto los no farmacológicos (rehabilitación, pérdida de peso, etc.), como las terapias farmacológicas de tipo oral (glucosamina, condroitín sulfato, etc.), de tipo tópico y de tipo intraarticular (inyección intraarticular de AH).

El líquido sinovial de articulaciones artrósicas presenta un AH de bajo PM y a bajas concentraciones, modificándose las propiedades viscoelásticas del líquido, generando dolor y problemas de funcionalidad de la articulación.

La inyección intraarticular del AH o viscosuplementación es un tratamiento que se lleva realizando desde hace casi 40 años y está aprobado en muchos países, incluida la Unión Europea. Al igual que el resto de tratamientos para la artrosis, supone una terapia paliativa, no curativa, puesto que no se elimina la patología, pero sí se consigue recuperar

la funcionalidad de la articulación y se alivia el dolor. A nivel tisular, el efecto terapéutico de este tratamiento engloba la supresión de la degeneración del cartílago y la liberación de proteoglicanos de la matriz extracelular en el tejido cartilaginoso, la protección del cartílago articular y la normalización de las propiedades del líquido sinovial. Así pues, el papel fundamental del AH en viscosuplementación presenta dos aspectos, su efecto mecánico y lubricante, y su efecto farmacológico dadas sus propiedades anti-inflamatorias (inhibe los efectos de los mediadores de inflamación) e inmunoreguladoras (Ågerup y cols., 2005; Girish y Kemparaju., 2007).

La regulación del proceso inflamatorio por parte del AH se ha puesto de relieve en muchos estudios, observándose una atenuación de la inflamación en presencia de AH de alto PM, mientras que fragmentos de bajo PM ejercen efectos pro-inflamatorios y activan a las células inmunitarias por su unión a receptores, aumentando los niveles de citoquinas y ERO's, como anteriormente ha sido definido debido a la unión del AH a los diferentes receptores de membrana (CD 44, RHAMM, hialoaderinas, etc.). Basándose en esta capacidad de regulación del proceso inflamatorio el cual es parte fundamental de la reparación y cicatrización de los tejidos, el AH se utiliza para prevenir la aparición de fibrosis epidural tras cirugía a nivel de la columna vertebral ya sea a nivel lumbar, torácico o lumbar, o tras la realización de craneotomía con exposición del tejido neural cerebral para el tratamiento de tumores u otras patologías dentro del campo de la neurocirugía (Robertson y cols., 1999; Hieb y Stevens., 2001; Kato y cols., 2005; Massie y cols., 2005; Casalino-Matsuda y cols., 2009).

2.7. YKL 40.

La YKL 40 es una proteína que pertenece a la familia de las glicohidrolasas 18, también se llama glicoproteína del cartílago humano 39 (HCgp-39), y es liberada por distintas estirpes celulares como macrófagos, neutrófilos, condrocitos, células endoteliales y tumorales entre otras. Sus niveles se encuentran elevados en todos los procesos en los que se produce un elevado recambio celular y/o reacciones inflamatorias. Es un factor de crecimiento de células del tejido conectivo y células endoteliales, que también actúa como un potente factor de migración para las células endoteliales, con influencia también en la reorganización y remodelación de los tejidos, de hay su empleo como biomarcador en pacientes que sufren tumores, inflamación o incrementos del remodelado tisular (Roslind y Johansen., 2009).

No hemos encontrado estudios que relacionen directamente los valores YKL 40 con los niveles de fibrosis epidural tras cirugía raquídea, pero basándonos en los trabajos en los que se asocian niveles elevados de YKL 40 con presencia de fibrosis como ocurre en la fibrosis hepática causada por hepatitis ya sean de origen vírico o tóxico, o en otra serie de patologías con base inflamatoria o en las que existe un importante remodelación de los tejidos como el asma bronquial o la osteoartrosis, decidimos determinar los valores de glicoproteína YKL 40 a nivel de la zona de cicatriz epidural ya que al considerar, que en la cicatriz o fibrosis epidural se produce una reacción inflamatoria y “turn-over” celular aumentado podrían existir niveles locales elevados de YKL 40 y que estos variarían entre los diferentes grupos de estudio (Coskun y cols., 2007; Letuve y cols., 2008; Schiavon y cols., 2008; Johansen y cols., 2009; Zivanovic y cols., 2009).

2.8. METALOPROTEASAS (MMP's).

El colágeno es el componente fundamental de la matriz extracelular, y en la degradación de esta matriz están implicadas una serie de proteínas. Las metaloproteasas (MMP's) son unas proteínas que se encargan de la degradación de la mayoría de los componentes de la matriz extracelular, de la misma manera también actúan en la activación y procesamiento de la citocinas, factores de crecimiento, factores de migración celular, en la exposición de receptores de membrana, etc. El sistema de la MMP's lo forman más de 20 metalo-peptidasas zinc-calcio dependientes que poseen una actividad catalítica sobre los componentes de la matriz extracelular.

2.8.1. Estructura de las MMP's.

La familia de enzimas MMP's, también llamadas matrixinas, comparten una estructura similar en sus dominios. Todos los enzimas de esta familia poseen en común los siguientes elementos:

- 1. Péptido señal:* es la secuencia guía, responsable de la secreción de la molécula, no está presente en la forma inactiva del enzima.
- 2. Dominio proteolítico o catalítico:* contiene dos iones de zinc y al menos un ión de calcio. Uno de los iones de zinc está presente en el centro activo e implicado en el proceso catalítico de las MMP's. El segundo ión de zinc, también denominado zinc estructural, y el ión de calcio, están presentes en el dominio catalítico a unos 12 Å del ión zinc catalítico. El ión de zinc catalítico es esencial para la actividad proteolítica de las MMP's. Tres residuos de histidina y el zinc catalítico están conservados en todas las MMP's. Menos conocido es el papel del segundo ión de zinc y el del ión de calcio.
- 3. Dominio propéptido:* este dominio consiste en 80-90 aminoácidos que contienen un residuo de cisteína, el cual interactúa con el átomo de zinc del dominio catalítico a través de un grupo tiol. La proteólisis de este propéptido da

como resultado la activación del cimógeno. La activación puede darse por la acción de enzimas proteolíticos, agentes mercuriales o el calor.

4. *Dominio hemopexina/vitronectina*: está altamente conservado y muestra una secuencia similar a la proteína plasmática hemopexina. Se ha demostrado que este dominio juega un papel funcional en la unión al sustrato y/o en las interacciones con los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP's).

2.8.2. Substratos y nomenclatura de las MMP's.

Dependiendo de la especificidad del sustrato, la similitud de aminoácidos y los módulos de secuenciación identificables, la familia de las MMP's se puede clasificar en cinco subclases (Murphy y cols., 1990) (Imagen 23).

- 1. Colagenasas.**
- 2. Estreptomelisinias.**
- 3. Gelatinasas.**
- 4. Metaloproteasas de tipo membrana (MT- MMP's).**
- 5. Otras metaloproteasas.**

1. Colagenasas.

Fueron las primeras MMP's que se describieron. Forman parte de esta familia: MMP-1 (colagenasa 1), MMP-8 (colagenasa 2) y MMP-13 (colagenasa 3). Son las principales proteinasas secretadas, capaces de degradar colágeno nativo de los tipos I, II, III y V, y parecen jugar un papel crucial en la degradación de colágeno de la matriz extracelular (MEC) en varias situaciones fisiológicas y patológicas (Freije y cols, 1994).

MMP-1: La expresión de MMP-1 "in vivo" se ha observado en áreas con un remodelado rápido de la matriz extracelular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La MMP-1 la producen varios tipos celulares como fibroblastos, queratinocitos, condrocitos, monocitos, macrófagos, células musculares lisas, células endoteliales, polimorfonucleares, hepatocitos y células tumorales. Tienen como sustrato: colágeno I, II, III, VII, VIII, X, gelatina,

agrecán, serpinas, tenascina y α 2-macroglobulina. Puede ser activada por plasmina, calicreína y MMP-3 (Woessner, 1998).

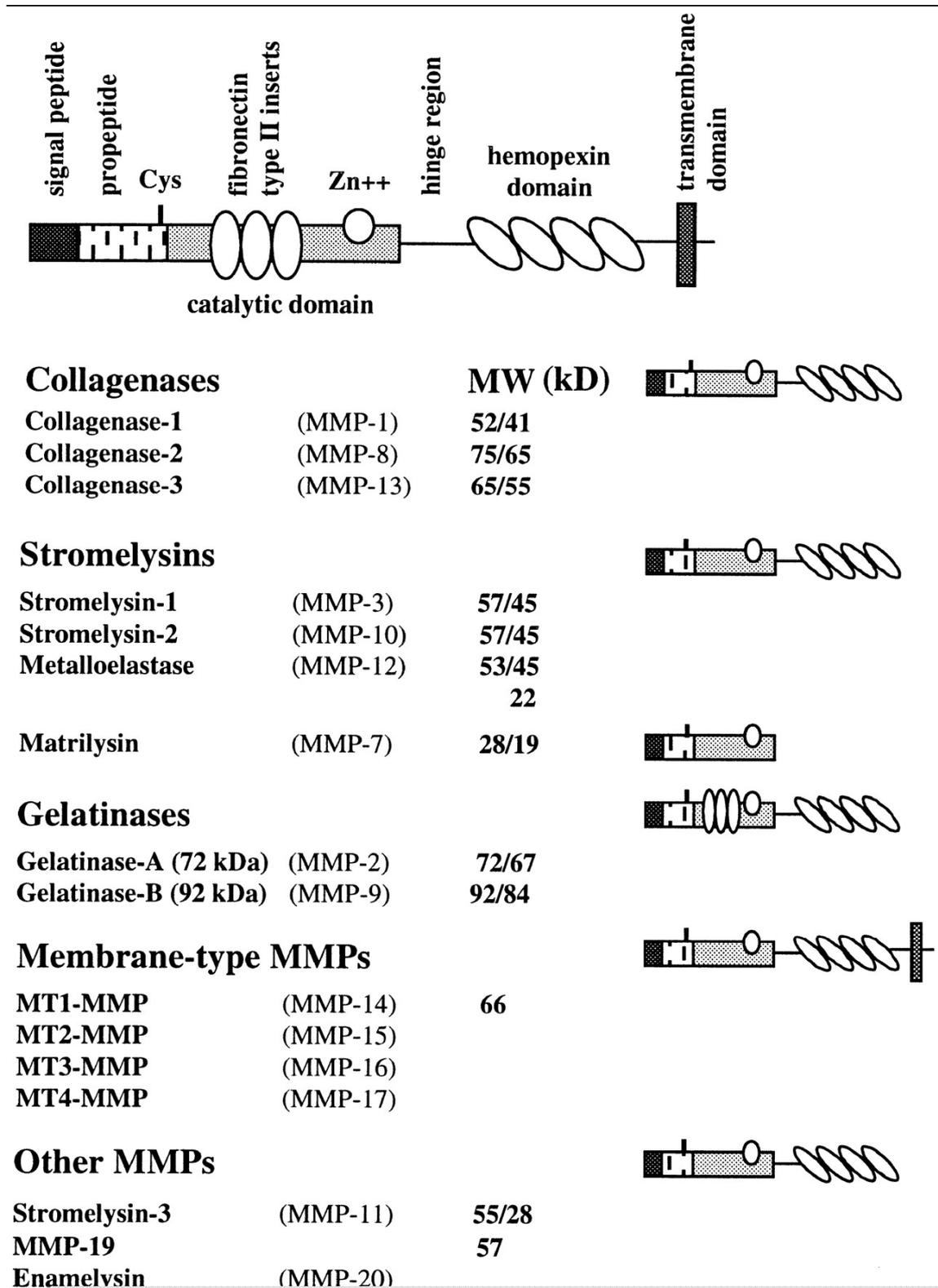


Imagen 23. Estructura de las MMP's (Westermarck y Kähäsi, 1999).

MMP-8: La sintetizan los leucocitos polimorfonucleares, que la liberan de los gránulos secretores bajo diversos estímulos, condrocitos, fibroblastos sinoviales y células endoteliales. Degrada los colágenos tipo I, II, III, VII, VIII y X; también puede actuar sobre agregán, elastina, fibronectina, gelatina, $\alpha 2$ -antiplasmina y $\alpha 1$ -antitrombina ($\alpha 1$ -AT). Puede ser activada por plasmina, MMP-3 y 10 (Hanemaaijer y cols., 1997).

MMP-13: Fue clonada originalmente de tejido de carcinomas de mama, comparada con otras colagenasas su especificidad del sustrato es excepcionalmente amplia incluyendo fibras de colágeno de los tipos I, II, III y XI, membrana basal y colágeno de cartílago de los tipos IV y X, colágeno tipo IX, gelatina, laminina, tenascina, agregán, fibronectina y PAI-2. La expresión de esta MMP está limitada sin embargo a situaciones en las que se requiere una remodelación rápida y efectiva del colágeno de la matriz extracelular por ejemplo en el desarrollo de médula fetal y en la remodelación post natal de esta. También se expresa en lugares con una excesiva degradación del colágeno de la matriz extracelular como en el cartílago osteoartítico, en úlceras crónicas cutáneas, úlceras intestinales, en líquido sinovial en pacientes con artritis reumatoide y en periodontitis, así como en tumores malignos como los carcinomas de mama. Puede ser activada por plasmina, MMP-2, 3 y 14 (Uitto y cols., 1998; Uria y cols., 1998; Johansson y cols., 2000).

2. Estreptomelisinias.

Dentro de este grupo de MMP's encontramos la MMP-3 (estreptomelisinina 1), la MMP-10 (estreptomelisinina 2) y la MMP-11 (estreptomelisinina 3). Tanto la MMP-3 como la MMP-10 son expresadas por fibroblastos y por células escamosas de la piel normales y transformadas. Pueden ser activadas por plasmina, calicreína, triptasa, elastasa y catepsina G (Saarialho-Kere, 1998).

MMP-3: Se expresa en células endoteliales, condrocitos, células tumorales, queratinocitos, macrófagos, fibroblastos y células musculares lisas. Degrada colágeno tipo II, III, IV, IX, X y XI y además agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-7, MMP-2 y MMP-9.

MMP-10: Degrada agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-1 y MMP-8.

MMP-11: Se clona inicialmente a partir de tejido de carcinoma de mama, se libera en forma tanto activa como inactiva. Su substrato son serpinas, degrada α -1-antitripsina, gelatina, fibronectina y proteoglicanos. Se ha visto que está implicada en la progresión de tumores malignos y su expresión se ha detectado también en lesiones arterioscleróticas humanas. En su regulación parece estar implicado el CD40-CD40L. Puede ser activada por convertasas parecidas a la furina (Schönbeck y cols., 1999).

3. Gelatinasas.

A este grupo pertenecen la MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B).

MMP-2: Se expresa en células endoteliales, condrocitos, polimorfonucleares, células tumorales, monocitos y macrófagos, fibroblastos, mastocitos y células musculares lisas. Los substratos de la MMP-2 son colágeno de los tipos I, II, III, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina-1, laminina-5, galectina-3, agregán, decorín, hialuridasa-versicán, proteínas unidas a proteoglicanos, osteonectina, GST-TNF/TNF péptido, IL-1 β , α 1-AT, MMP-1, MMP-9 y MMP-13. Puede ser activada por MMP-1, 7, 14, 15, 16, 24, 25 y trombina (Heppner y cols., 1996).

MMP-9: Se produce en queratinocitos, monocitos, macrófagos alveolares, leucocitos polimorfonucleares, células musculares lisas, macrófagos, fibroblastos y una gran variedad de células tumorales. La MMP-9 actúa sobre colágeno tipo IV, V, VII, X y XIV, gelatina, elastina, gectina-3, agregán, hialuronidasa-versicán, proteoglicanos unidos a proteínas, fibronectina, entactina, osteonectina, α 1-AT, MBP, IL-1 β y plasminógeno. Puede ser activada por plasmina, elastasa, MMP-2, 3 y 13. La expresión de MMP-9 en condiciones normales es baja, pero es inducida en caso de una elevada remodelación celular como ocurre durante el desarrollo embrionario, cicatrización o invasión tumoral (Pellikainen y cols., 2004; Patel y cols., 2005; Turpeenniemi-Hujane, 2005).

4. Metaloproteasas de tipo membrana (MT- MMP's).

El primer miembro de esta familia fue clonado a partir de células de cáncer de pulmón. Los miembros descritos son: MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2- MMP), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP), MMP-24 (MT5-MMP) y MMP-25 (MT6-MMP) (Sato y cols., 1994).

MMP-14, MMP-15, MMP-16: La forma activa de la MMP-14 actúa como receptor de membrana para el complejo formado por la forma latente de la MMP-2 y TIMP-2. MMP-14 y MMP-15 pueden activar a la pro-MMP-2 en la superficie celular, además ambas pueden degradar colágeno de tipo I, II y III, gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina y agregán. La MMP-14 in vivo se expresa en fibroblastos del estroma adyacentes al tumor y en células epiteliales malignas. Se ha demostrado la expresión de la MMP-14 por células musculares lisas y macrófagos en placas arterioscleróticas, además de estar regulada su expresión por moléculas inflamatorias en ambos tipos celulares. El papel funcional de MT-1, 2, 3 y 5 es común y parece ser la activación de la pro-MMP-2. Puede ser activada por convertasas (Rajavashisth y cols., 1999; Gilles y cols., 2001).

MMP-17: Ha sido clonada de una librería de cDNA procedentes de células de carcinoma de mama, además de encontrarse en estas células se ha visto que se expresa en pulmón, colon, ovario y tejido testicular así como en leucocitos. Su substrato parece ser gelatina. Es capaz de activar a la pro-MMP-2 a su forma intermedia de 68 kDa. Se inhibe con TIMP-1 y TIMP-2. Es la única proteinasa que se ancla a la membrana por una cola de glicosil fosfatidín inositol por tanto la parte hidrofóbica se ancla en el lumen del retículo endoplasmático al igual que el receptor de la uroquinasa (uPAR). Puede ser activada por convertasas (Puente y cols., 1996).

MMP-24: Activa la pro-MMP-2. En contraste con las demás MT-MMP puede solubilizarse o presentarse unida a la pared celular, dándole versatilidad y jugando un papel importante en la remodelación a nivel cerebral y durante el desarrollo embrionario. Puede ser activada por convertasas (Pei, 1999).

MMP-25: La MT6-MMP se ha identificado específicamente en leucocitos de sangre periférica. También llamada leucolisina. Su papel parece estar en la respuesta inflamatoria y su activación parece ser intracelular. Puede ser activada por convertasas.

5. Otras metaloproteasas.

Hay un grupo de MMP's que no pueden incluirse en la clasificación anterior. En este grupo se incluyen las siguientes MMP's: MMP-7 (matrilisina), MMP-12 (metaloelastasa de macrófagos), MMP-19 (RASI-1), MMP-20 (enamelisina), MMP-23 y MMP-26 (endometasa humana). Destacamos las más conocidas:

MMP-7: Esta MMP tiene como sustratos al colágeno tipo IV, X, agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-1, MMP-2, MMP-9, caseína, α 1-AT, plasminógeno y MMP-9/TIM-1. Juega un papel importante en la invasión de los carcinomas y la metástasis y parece además estar implicada en apoptosis de células epiteliales. Esta MMP tiene una gran afinidad por los proteoglicanos heparán sulfato que están alrededor de las células epiteliales y en la membrana basal. La unión de esta metaloproteinasa, además de otras, a estos heparán sulfatos del espacio extracelular puede prevenir la pérdida de enzimas y servir como reservorio y facilitar la regulación de sus niveles. Puede ser activada por plasmina y MMP-3 (Powell y cols., 1999).

MMP-12: Se ha demostrado la presencia de mRNA de esta metaloproteasa en la media de aneurismas y en enfermedad aórtica oclusiva. Por otra parte se ha observado un incremento de la expresión de MMP-12 en lesiones arteriales a nivel de aorta en conejo, concomitante con la generación de células espumosas. Degrada elastina, fibronectina, gelatina, laminina y colágeno tipo IV. Puede activarse con plasmina (Matsumoto y cols., 1998).

2.8.3. Activación de las MMP's.

Las MMP's solubles son secretadas al espacio pericelular como enzimas inactivos y su activación representa un importante nivel de regulación. En las formas zimógenas secretadas el pro-dominio (N-terminal) se pliega de forma que la cisteína interactúa con el zinc catalítico y actúa como escudo del centro catalítico. Esta conformación se mantiene gracias a las interacciones tiol entre los residuos de cisteína del prodominio y el átomo de zinc presente en el centro catalítico de todas las MMP's. La activación de los proenzimas se produce de forma secuencial.

Una activación parcial puede ocurrir cuando el prodominio es atrapado por otras proteasas como la plasmina, tripsina, calicreína, triptasa, quimasa y algunas MMP's o cuando la unión entre la cisteína y el zinc es interrumpida por componentes no proteolíticos como agentes reactivos del tiol y desnaturalizantes o por tratamiento con calor. Esta activación parcial induce cambios conformacionales que inducen la susceptibilidad del enzima para la rotura autocatalítica (Nagase y cols., 1997; Van Wart y Birkedal-Hansen., 1999).

También se han visto nuevos mecanismos de activación: MT1-MMP tiene la capacidad de activar la progelatinasa A en la superficie celular. Por otra parte el descubrimiento de asociaciones progelatinasa-TIMP-MT-MMP añade complejidad al proceso de activación, a bajas concentraciones de inhibidores titulares de metaloproteasas (TIMP's) en el complejo parece potenciarse la activación de la pro-MMP2 y a concentraciones altas podría inhibirse la actividad de MMP-2 (Sato y cols., 1994; Strongin y cols., 1995).

2.8.4. Inhibición de las MMP's.

La actividad de las MMP's se regula por su unión a los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP's) como forma de defensa ante los ataques enzimáticos producidos por las metaloproteasas. Se han caracterizado 4 miembros de la familia llamados: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Su estructura consta de dos dominios de pequeño tamaño. El dominio N-terminal consta de 125 aminoácidos y el C-terminal de 65 aminoácidos. Cada uno de ellos se estabiliza por tres puentes disulfuro. El dominio N-terminal es capaz una

vez aislado, de formar una molécula estable con capacidad para inhibir las MMP's. La expresión de los TIMP's en los tejidos también se controla durante la remodelación y en condiciones fisiológicas para mantener el balance en el metabolismo de la matriz extracelular. La rotura de este equilibrio induce un descontrol en el "turnover" de la matriz (artritis, cáncer, enfermedad cardiovascular, nefritis, desórdenes neurológicos, ulceración y fibrosis de tejidos) (Brew y cols., 2000).

El TIMP-1 y el TIMP-2 son capaces de inhibir la actividad de todas las MMP's conocidas en una unión estequiométrica de 1:1 y por tanto juegan un papel importante en mantener el balance entre la formación y la degradación de la matriz extracelular.

El TIMP-3 es el único miembro de la familia que se secreta de forma insoluble y se localiza exclusivamente en la matriz extracelular.

El TIMP-4 parece actuar en el mantenimiento de la homeostasis de la matriz extracelular.

Los TIMP-2 y 3 son inhibidores efectivos de las metaloproteasas de tipo membrana (MT-MMP's). Otro inhibidor de las MMP's es la $\alpha 2$ -macroglobulina, su acción es lenta y no es específica, es un inhibidor irreversible de proteasas activas incluyendo las MMP's. Se cree que el control que ejercen los TIMP's sobre la actividad de las MMP's es alrededor de las células, mientras que la de la $\alpha 2$ -macroglobulina tendría una función en los fluidos especialmente en los lugares con inflamación (Nagase y cols., 1997).

Tras esta descripción de la estructura de las MMP's, sus diferentes grupos y formas de activación e inhibición decidimos centrar el estudio de las MMP's en un tipo de colagenasa, la MMP-1, y un tipo de gelatinasa, la MMP-9. Ambas son producidas y liberadas por fibroblastos, entre otros tipos celulares, y su expresión se encuentra aumentada en situaciones de un elevado recambio de la matriz extracelular como ocurre en el tejido reparativo cicatricial y en determinado tipo de tumores. En nuestro estudio este tejido cicatricial rico en fibroblastos se encontraría en la zona de la cicatriz quirúrgica tanto a nivel cutáneo, muscular y en la zona del espacio epidural, lugar este último donde realizamos la medición de los niveles de MMP-1 y 9 (Wilson y cols; 2002; Impola y cols; 2004; Meneses y cols., 2005; Wu y cols., 2008).

Del mismo modo, al estudiar a dos tipos de MMP's diferentes, colagenasa (MMP-1) y gelatinasa (MMP-9), intentamos encontrar diferencias entre los distintos grupos de metaloproteasas que pudieran influir en la producción del tejido fibroso que aparece en la fibrosis epidural.

2.9. EL CONEJO COMO MODELO

EXPERIMENTAL.

En el estudio de la fibrosis epidural varios ha sido los animales utilizados como modelo experimental. Los animales más ampliamente utilizados han sido conejos y ratas pero también se han empleado perros. (Abitbol y cols., 1994; Gerszten y cols., 2000; Massie y cols., 2005; Herculano y cols., 2006; Liu y cols., 2006; Tatsui y cols., 2006; Temel y cols., 2006; Sandoval y Hernández-Vaquero., 2008; Sun y cols., 2008; Kurt y cols., 2009).

En nuestro estudio decidimos emplear el conejo como modelo experimental por las siguientes razones:

1. La primera de ellas, la facilidad de manejo al tratarse de un animal de pequeñas dimensiones y del que existe una amplia experiencia en su manipulación y cuidado.
2. En segundo lugar al realizar una revisión bibliográfica previa, son varios los trabajos en los que se utilizaba como animal de experimentación para el estudio de la fibrosis epidural al conejo.
3. En tercer lugar si realizamos un análisis de anatomía comparada entre el humano y el conejo podemos encontrar similitudes morfológicas en el segmento lumbar, aunque en el conejo dicho segmento lo constituyen siete vértebras lumbares y en el humano cinco, las semejanzas anatómicas son evidentes por la presencia de numerosas apófisis para la inserción de las estructuras musculares, un disco intervertebral y un canal vertebral englobado por los pedículos vertebrales y laminas como ocurre en el humano (Imágenes 24, 25 y 26).



Imágenes 24 y 25. Raquis lumbar del conejo.

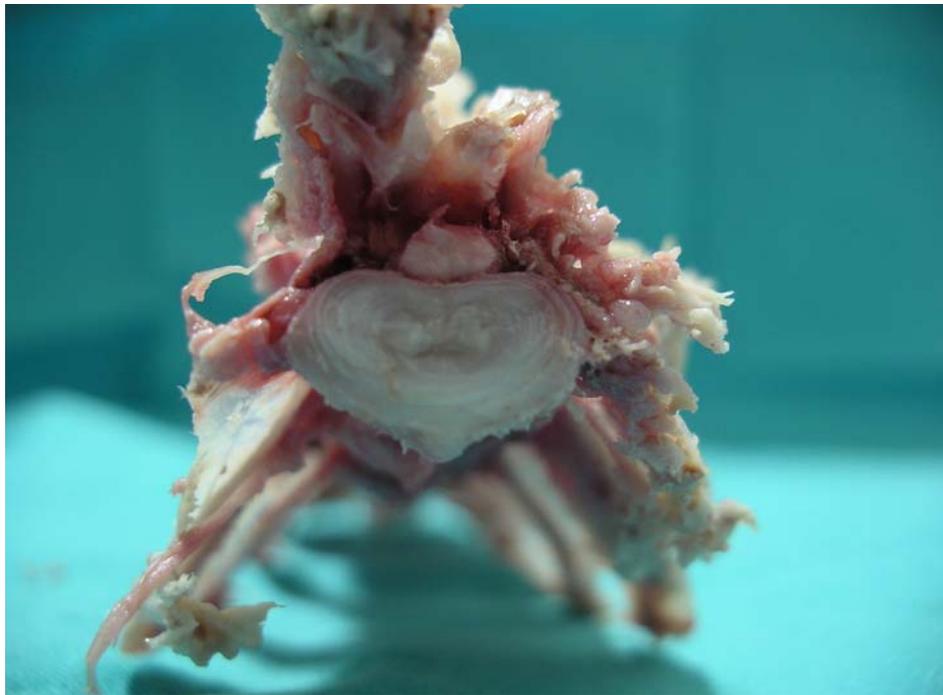


Imagen 26. Corte axial de la columna lumbar del conejo.

3. OBJETIVOS.

Los objetivos principales ya establecidos:

1º. Realización de un estudio experimental utilizando como modelo experimental el conejo, para intentar demostrar desde el punto de vista anatomo-patológico, bioquímico, inmunohistoquímico y de pruebas de imagen, la posible utilidad del ácido hialurónico como método de prevención de la fibrosis epidural.

2º. Comparación de distintos tipos de ácidos hialurónicos de diversos pesos moleculares en busca de diferencias en la prevención de la fibrosis epidural.

3º. Valoración de las posibles modificaciones a lo largo del tiempo en el desarrollo de fibrosis epidural presente dentro del canal neural.

Se realizarán mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Buscar diferencias entre el peso de tejido fibroso causante de la fibrosis entre los distintos tipos de AH y el grupo control.
2. Determinar mediante estudio de RMN la presencia, ausencia o diferencia en los niveles de fibrosis epidural tras la realización de laminectomías y posterior depósito de distintos tipos de AH a nivel lumbar en el animal de experimentación en comparación con un grupo control.
3. Comprobar, utilizando las imágenes de RMN, la existencia de variaciones en la presencia de fibrosis epidural a lo largo del tiempo en los distintos grupos de estudio.
4. Medición de los niveles de los productos de degradación del tejido fibroso, en concreto de la hidroxiprolina, como un marcador indirecto de la magnitud de la fibrosis intracanal.

5. Cuantificación mediante el estudio anatómo-patológico de las muestras de fibrosis, de diferencias en cuanto al número de fibroblastos entre los distintos grupos.
6. Análisis de los niveles de marcadores inflamatorios como la YKL 40 dado el origen inflamatorio de la fibrosis epidural.
7. Estudiar los niveles de marcadores de fibrosis como pueden ser la MMP-1 y MMP-9.

4. MATERIAL Y **MÉTODOS.**

4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para comprobar la hipótesis de que el AH disminuye la producción de tejido fibroso peridural realizamos un ensayo experimental utilizando como animal de estudio el conejo blanco de Nueva Zelanda, de aproximadamente dos kilogramos de peso y estabulados en el animalario de la Universidad de León (ULE), a los que intervenimos quirúrgicamente mediante una laminectomía parcial bilateral a nivel de la columna lumbosacra.

Los conejos se dividen en cuatro grupos de experimentación, solicitando previamente la oportuna autorización del comité de Ética de la Universidad de León (ULE) para este tipo de estudios. En el primero grupo, tras ser realizada la cirugía, se procede al cierre quirúrgico de la herida por planos (grupo control); en los otros grupos previamente al cierre de la herida y sobre la región dural, expuesta mediante la laminectomía, colocamos de manera aleatoria uno de los 3 tipos de AH a estudio.

Establecimiento de grupos experimentales y administración de AH:

El primero de los grupos es el denominado grupo control, formado por siete conejos a los que se realizó laminectomía parcial bilateral entre la séptima vértebra lumbar (L7) y la primera vértebra sacra (S1) con posterior cierre de la herida quirúrgica por planos, mediante la técnica habitual con puntos de aproximación de la musculatura lumbosacra y cierre de la fascia muscular, tejido celular subcutáneo y piel.

El segundo grupo lo forman seis conejos a los que se les realizó la misma técnica quirúrgica pero previamente al cierre de la zona quirúrgica se interpuso 0,5 ml de AH Adant® (TEDEC, SPAIN); (AH de peso molecular alrededor de 1.000.000 Da) sobre la zona dural expuesta.

El tercer grupo lo constituyen siete conejos intervenidos según la técnica quirúrgica habitual colocando en este caso sobre la zona epidural 0,5 ml de AH Durolane® (SIMTH&NEPHEW, USA); (AH estabilizado mediante tecnología NASHA®; que se comporta como un AH de alto peso molecular en cuanto a sus propiedades como

viscosuplementador, pero que resulta de un peso molecular aparente determinado por estudio de HPLC superior a 1.000.000 Da).

El cuarto grupo lo forman cinco conejos, en los que se depositó 0,5 ml de AH Hyalgan® (BIOIBERICA, SPAIN); (AH de peso molecular de 600.000 Da) en la zona de la laminectomía y se procedió al cierre posterior de la herida quirúrgica.

4.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS ÁCIDOS HIALURÓNICOS ESTUDIADOS.

Estos tres AH poseen una serie de características diferenciales en cuanto a su origen, peso molecular y estabilidad. En cuanto a su origen Adant® y Durolane® son AH obtenidos por biofermentación, mientras que Hyalgan® procede de cresta de gallo. Los pesos moleculares también hacen diferentes a estos AH: Adant® presenta un peso molecular de 900-1000 kDa, Durolane® también presenta un elevado peso molecular (peso molecular aparente superior a los 1000 kDa), siendo Hyalgan® el que presenta un menor peso molecular de los tres, situándose entre 500-730 kDa. Por último Durolane® es el único de estos tres AH que se encuentra estabilizado (Tabla 1).

<u>Ácido Hialurónico</u>	<u>Tipo.</u>	<u>Cross-linked.</u>	<u>Origen.</u>	<u>Peso molecular. (kDa)</u>
Adant®	Hialuronato sódico	NO	biofermentación	900-1.000
Durolane®	NASHA	SI	biofermentación	Alto peso molecular
Go-On®	Hialuronato sódico	NO	biofermentación	800-1.500
Hyalgan®	Hialuronato sódico	NO	Cresta de gallo	500-730
Ostenil®	Hialuronato sódico	NO	biofermentación	1.200
Suplasyn®	Hialuronato sódico	NO	biofermentación	500-800
Synocrom®	Hialuronato sódico	NO	biofermentación	1.600
Synvisc®	Hylan	SI	Cresta de gallo	6.000-7.000

Tabla 1. Tipos de ácidos hialurónicos y principales diferencias entre ellos (Prieto y cols., 2005).

4.3. TÉCNICA QUIRÚRGICA.

Los conejos estabulados en el animalario de la Universidad de León (ULE) se les someten, previamente a la cirugía, a un periodo de ayuno de 24 horas permitiéndose la ingesta de líquidos.

Treinta minutos antes de la intervención se realiza una premedicación anestésica de los animales mediante una inyección intramuscular de Acepromacina (0,5 mg/Kg) más Butorfenol (1mg/Kg) con el fin de tranquilizarlos; una vez conseguido se procede a la venopunción de una de las venas marginales de la oreja del conejo, colocándose un sistema de sueroterapia con suero glucosalino al 0,9% en ritmo lento de infusión.

Para anestesiarse al conejo inyectamos una dosis intramuscular de Ketamina 15 mg/Kg y se mantiene la anestesia mediante Isoflorano al 2% (Sistema semiabierto sin absorbente de CO₂ tipo T-AYRE y vaporizador de Isoflorano MDS-Matrix. Medical Inc. Dräger®) durante todo el tiempo quirúrgico (Imagen 27).



Imagen 27. Anestesia del conejo y preparación de la zona quirúrgica.

Se coloca el conejo en posición de decúbito ventral con flexión de las extremidades posteriores, con el fin de aumentar la lordosis lumbar, incrementándose así la distancia entre las apófisis espinosas y las láminas con el fin de facilitar la cirugía.

Se prepara el campo quirúrgico mediante rasurado de la zona a intervenir y se identifica el nivel de la cirugía mediante control radioscópico con aparato de Rayos X móvil (EOC Fluorostar 7900 compact General Electric®). Una vez identificado el nivel quirúrgico que corresponde al espacio discal entre la séptima vértebra lumbar (L7) y la primera vértebra sacra (S1), se procede a la desinfección de la piel realizando tinción de la misma con povidona iodada.

Seguidamente comenzamos la cirugía mediante una incisión cutánea desde la apófisis espinosa de la sexta vértebra lumbar a la zona sacra superior, tras disección de la piel y tejido celular subcutáneo, se identifica por palpación el espacio entre las apófisis espinosas de la séptima vértebra lumbar (L7) y de la primera vértebra sacra. Se procede a disección subperióstica a ambos lados del ligamento interespinoso desinsertando toda la musculatura paraespinal derecha e izquierda por disección roma hasta exponer el plano óseo que corresponde a las láminas izquierda y derecha de la séptima vértebra lumbar y su apófisis espinosa, y la zona dorsal y superior del sacro (Rodgers y cols., 2003).

Se reseca el ligamento supraespinoso entre la séptima vértebra lumbar y el sacro con lo que quedan claramente expuestas las láminas de la séptima vértebra lumbar y el ligamento amarillo que une las láminas de L7 con el sacro.

Mediante bisturí se realiza una pequeña incisión a nivel del ligamento amarillo hasta que nos permite la introducción de un laminotomo de Kerrison (ronger) de 1mm, con el que vamos retirando todo el ligamento amarillo entre la séptima vértebra lumbar y el sacro, exponiéndose justo debajo del mismo el saco medular. Una vez eliminado todo el ligamento amarillo y continuando con el laminotomo de Kerrison extirpamos la parte mas inferior de la lámina derecha e izquierda de la séptima vértebra lumbar, con el fin de ampliar la zona de exposición del saco medular (Imágenes 28 y 29).



Imagen 28. Preparación e instrumental quirúrgico.

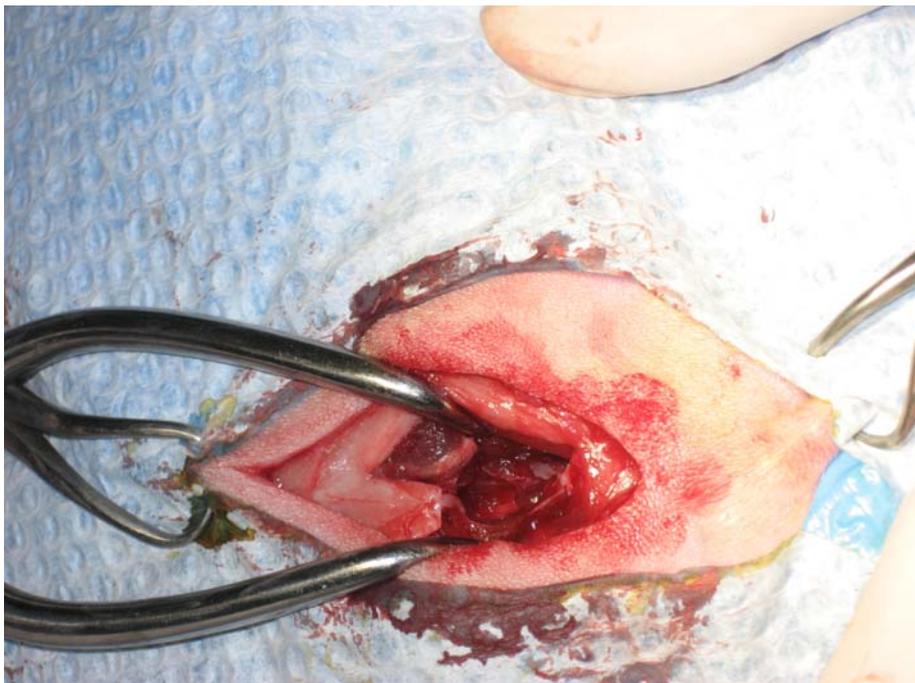


Imagen 29. Zona de laminectomía y exposición del saco dural.

Una vez retirado todo el ligamento amarillo y parte de las láminas de manera bilateral conseguimos una superficie más o menos cuadrangular de unos 0,7 x 0,7 cm en la que queda expuesto todo el saco medular.

Si el conejo pertenece al grupo control, tras la exposición del saco medular, se procede al cierre de la herida quirúrgica mediante puntos de aproximación de la

musculatura paravertebral derecha e izquierda y re inserción de la misma al ligamento supraespinal restante. Se realiza también cierre del tejido subcutáneo mediante sutura discontinua reabsorbible y del plano cutáneo mediante puntos discontinuos de seda.

Cuando la cirugía se realiza sobre uno de los conejos que pertenecen a alguno de los grupos de AH, el cierre de la herida quirúrgica se realiza de la misma manera que en los casos controles pero previamente al cierre, y de manera aleatorizada, se procede a depositar 0,5 ml del AH objeto de estudio (Adant®, Durolane® o Hyalgan®).

Tras cerrar la piel y antes de despertar al conejo se impregna la herida quirúrgica con povidona yodada. Posteriormente y tras un periodo de reanimación postanestésica se devuelve al conejo a su jaula del animalario.

En el periodo de despertar anestésico se inyectan una dosis intramuscular de analgésico (Carprofeno 4 mg/Kg/SC/24 h) y antibiótico (Enrofloxacin 5-10 mg/Kg/SC/24 h). Estas dosis analgésica y antibiótica se repiten una vez cada 24 horas durante 5 días para evitar la aparición de procesos infecciosos y proporcionar analgesia a los conejos intervenidos. Los puntos de sutura cutánea son retirados a los 7-10 días de la cirugía.

Únicamente existió un caso de lesión medular, que se produjo al realizar la laminectomía, tras la cual el conejo, que pertenecía al grupo control, sufrió una paresia de la extremidad inferior derecha, no reversible durante el periodo de evolución, pero que no obligo a retirar al conejo de su grupo de estudio.

Completada la cirugía se procede a la estabulación de los conejos en el animalario de la ULE durante un periodo de seis semanas siguiendo el protocolo de cuidado habitual de estos animales y las normas de la Universidad de León y SECAL (BOE 252; 2005).

Un día antes de que se cumplan las seis semanas tras la cirugía, se mantiene al conejo con dieta líquida en previsión de la nueva anestesia que se realizará al día siguiente.

Al cumplirse las seis semanas de la cirugía se procede a la realización de la primera RMN de control (RMN inicial).

Una vez completada esta primera RMN y tras el periodo de reanimación postanestésica, se devuelve al conejo a la estabulación en el animalario durante seis semanas más.

Transcurridas doce semanas desde la cirugía realizamos una segunda RMN de cada conejo (RMN final).

Acabada esta segunda RMN se procede a la eutanasia al conejo mediante la administración intravenosa de solución eutanásica compuesta de Embutramida, mebezonio yoduro y tetracaína clorhidrato (T-61®) a dosis de 0,3 ml/Kg de peso según las normas SECAL.

Tras la eutanasia, el conejo se coloca en la misma posición en que se realizó la cirugía y tras rasurar la zona quirúrgica se practica una nueva incisión cutánea más amplia sobre la cicatriz previa y se realiza la disección subperióstica de toda la musculatura paravertebral de la sexta y séptima vértebra lumbar y de la primera sacra, respetando el tejido cicatricial central existente.

Se procede a la exéresis en bloque de la columna vertebral comprendida entre el disco intervertebral L6-L7, el cuerpo de la séptima vértebra lumbar, el espacio interdiscal L7-S1 y la parte más superior del sacro.

Una vez que tenemos el bloque se realiza una sección del mismo, mediante bisturí, a la altura del disco intervertebral L7-S1 (a nivel ventral) y la zona quirúrgica (a nivel dorsal), de esta forma el bloque queda dividido en 2 segmentos, el superior que su parte más distal incluye parte de la zona quirúrgica y el bloque inferior que su parte proximal también incluye parte de la zona quirúrgica (Imagen 30).

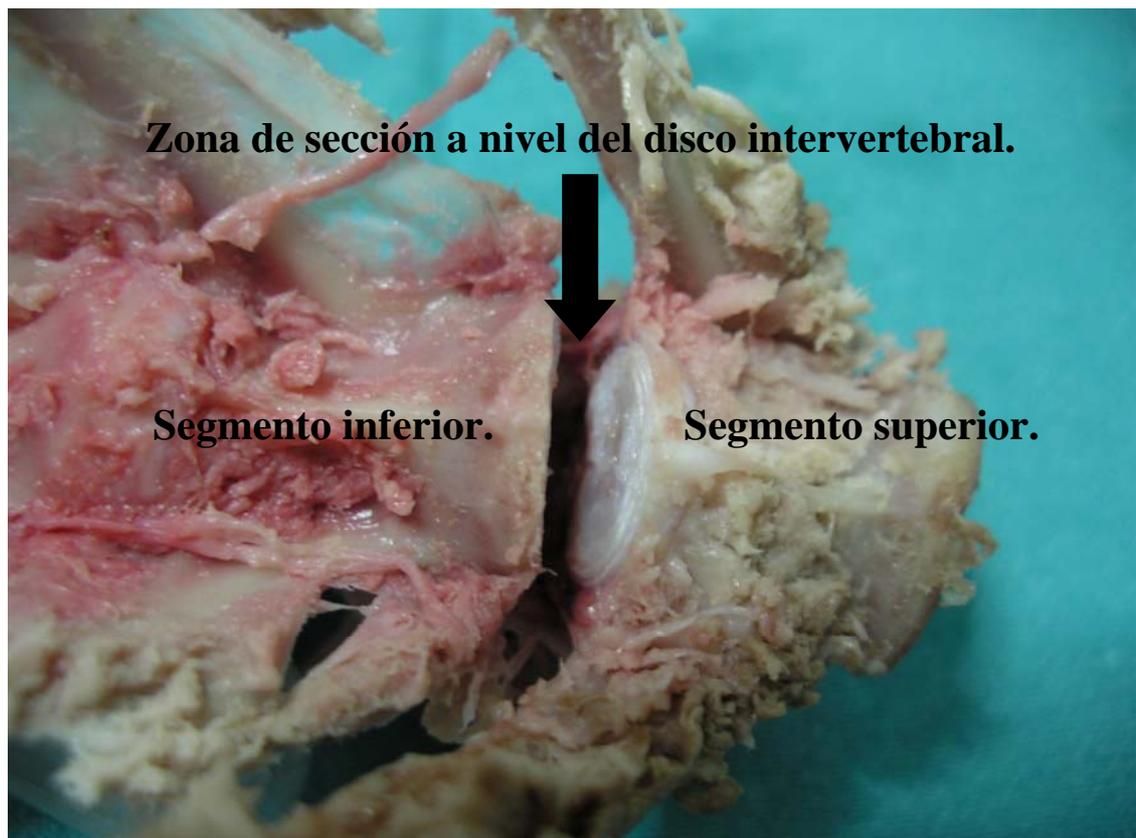


Imagen 30. Imagen de la columna vertebral del conejo con sección a nivel del disco intervertebral dividiendo la zona quirúrgica en dos segmentos uno superior y otro inferior.

El segmento superior del bloque se introduce en formol para su posterior estudio histológico, y el inferior se congela a -80°C para el estudio del peso de fibrosis intracanal, niveles de hidroxiprolina, YKL 40 y MMP-1 y 9.

4.4. DETERMINACIÓN DEL PESO DEL TEJIDO FIBROSO DENTRO DEL CANAL NEURAL.

Las muestras para el estudio del peso de tejido fibroso, YKL 40, MMP's 1 y 9 e hidroxiprolina se descongelaron previamente, y mediante disección en la zona quirúrgica con bisturí, se separó el tejido cicatricial que se encontraba dentro del canal vertebral del tejido neural, para aislar así el tejido a estudiar. Dicho tejido fibroso fue pesado en los distintos grupos con el fin de encontrar diferencias en la cantidad del mismo.

4.5. DETERMINACIÓN DE LA FIBROSIS

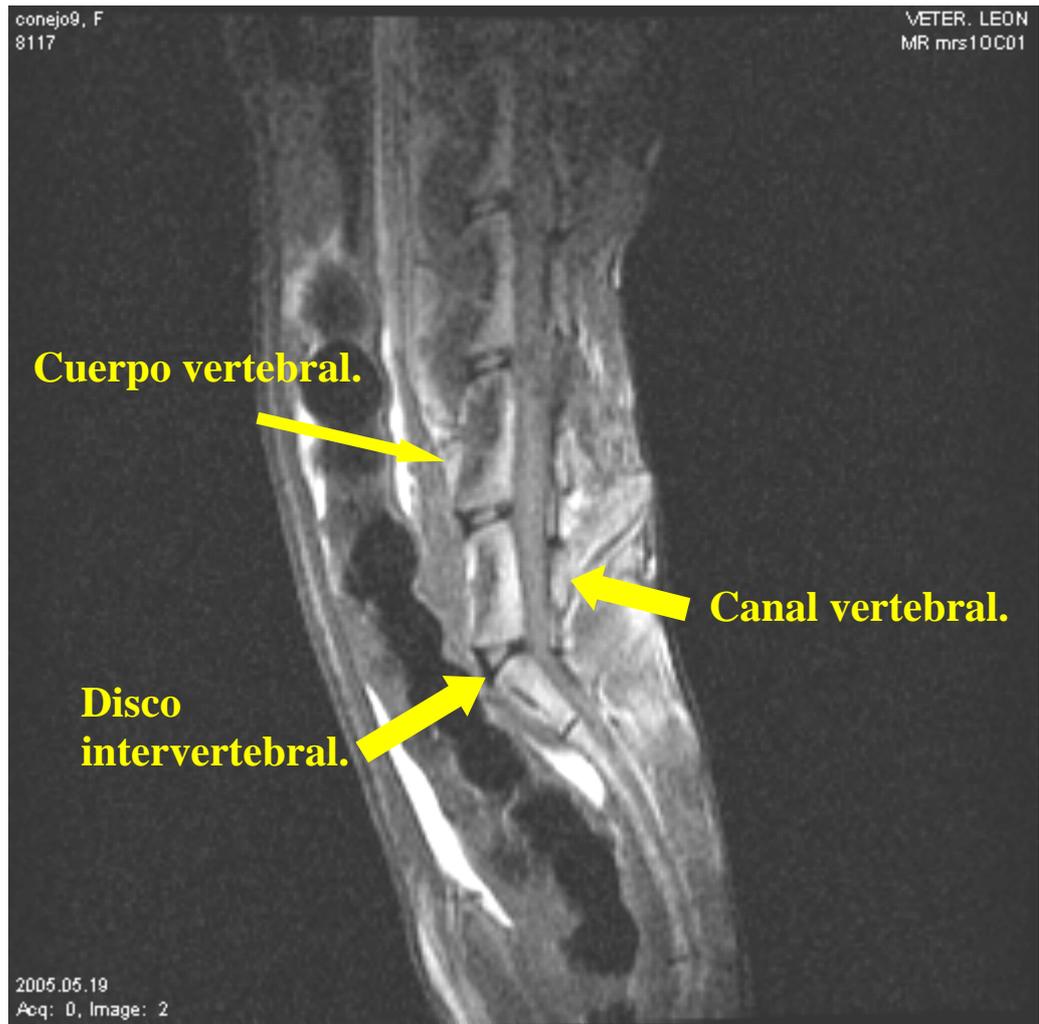
EPIDURAL MEDIANTE RESONANCIA

MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

En el presente trabajo hemos realizado un estudio mediante RMN de la columna lumbar del conejo intervenido, para poder identificar en primer lugar si existía fibrosis dentro del canal neural y en segundo lugar si se producían variaciones de la cantidad de la misma a lo largo del tiempo, para ello hemos realizado dos pruebas de RMN a cada conejo intervenido; la primera al mes y medio de la cirugía (RMN inicial) y la segunda a los tres meses de la misma (RMN final).

El estudio de RMN se realizó de la siguiente manera: los conejos un día antes de la misma se mantienen en dieta líquida como preparación previa a la anestesia que será necesaria. Una vez sedados y manteniendo la anestesia de la misma manera que en el acto quirúrgico se colocan en decúbito supino dentro del aparato de resonancia (GE Medical Systems Signa Profile 0.2 T®) ubicado en el área de Cirugía de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León.

Una vez posicionado el conejo de manera adecuada, se realiza la RMN. La primera serie nos sirve como localizador sagital y una segunda serie como localizador coronal, con estas dos series iniciales identificamos la columna lumbosacra del conejo y la zona quirúrgica. Una vez identificado el nivel de la cirugía se procede a realizar cortes axiales (de 1mm de espesor) de la zona quirúrgica tanto en secuencia T1 y T2. Después de estos primeros cortes axiales sin contraste, procedemos a la inyección intravenosa de contraste radiológico compuesto de gadopentetato de dimeglumina (Magnevist®, BAYER) a dosis de 0,1 ml/Kg de peso del conejo; el cual tras su difusión por todo el árbol vascular se depositará en mayor medida en aquellas zonas con un elevado aporte vascular como ocurre con el tejido fibroso. Gracias a este depósito de gadolinio en los tejidos fibrosos podemos realizar el diagnóstico diferencial entre una recidiva herniaria, en el que no se depositará gadolinio debido a su estructura avascular, ocurriendo lo contrario en el tejido fibroso.



Tras esperar un minuto después de la inyección del gadolinio para permitir la difusión del contraste por todo el organismo, se realiza una nueva serie de cortes axiales en T1 y T2 para intentar identificar la posible presencia y extensión de la fibrosis epidural en la zona quirúrgica (Imágenes 31 y 32).

Para establecer el estudio de las imágenes de RMN e intentar identificar diferencias entre los distintos grupos de estudio y el grupo control, se realizó un análisis detallado de las mismas.



Imagen 32. Imagen de RMN. Localizador coronal.

En las imágenes obtenidas en los cortes coronales en T1 y T2 con y sin contraste del área intervenida, dividimos el canal vertebral lumbar en 6 segmentos, para crear estos 6 segmentos trazamos un primera línea horizontal (línea continua) que divide el canal en dos segmentos, uno anterior y otro posterior; seguidamente trazamos dos nuevas líneas oblicuas en dirección anteroposterior (línea de puntos y línea de puntos y rayas) que se entrecruzan entre si y con la línea central, de esta forma queda dividido el canal vertebral en 6 segmentos: anterior derecho, anterior central, anterior izquierdo, posterior izquierdo, posterior central y posterior derecho, que supone una modificación sobre lo realizado por Ross y cols., en 1998 (Ross y cols., 1996; 1998, Llado y cols., 1999) (Imagen 33).

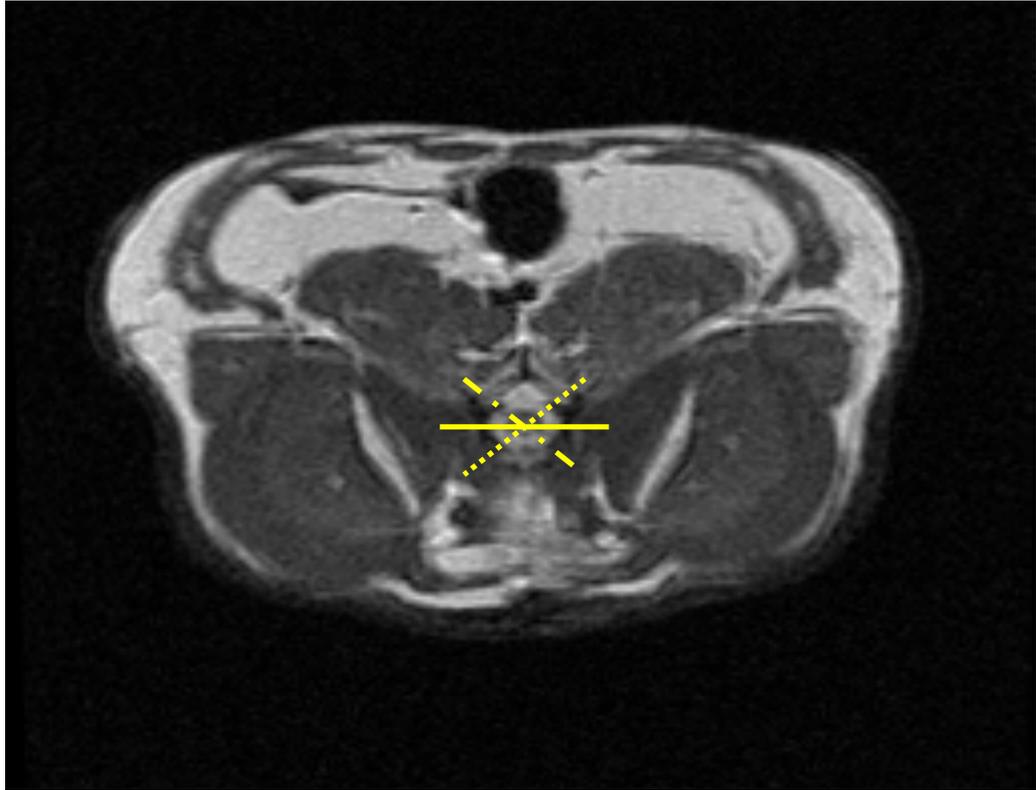


Imagen 33. Imagen de RMN. Corte axial. División del canal neural en 6 segmentos.

Para identificar la presencia de fibrosis epidural, y poder cuantificar el grado de la misma, asignamos la puntuación de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 en función de que la fibrosis epidural estuviera ocupando 1, 2 ó más de los segmentos en los hemos dividido el canal lumbar.

El estudio de las imágenes se realizó en dos momentos: el primero de ellos al mes y medio de la cirugía y el segundo a los tres meses de la misma y previo a la realización de la eutanasia del conejo. Al realizar este estudio de las imágenes de RMN en dos momentos pretendíamos identificar diferencias en la presencia de fibrosis entre los distintos grupos de estudio y el grupo control y si se producían modificaciones en la presencia o extensión de la fibrosis epidural a lo largo del tiempo dentro de los distintos grupos.

4.6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HIDROXIPROLINA MEDIANTE HPLC.

Dada la composición del tejido fibroso, fundamentalmente colágeno, medimos la cantidad del mismo dentro del canal neural en aquellos lugares donde habíamos realizado la laminectomía, pero debido a la dificultad para determinar de manera directa la cantidad de colágeno dentro del canal, se realizó un análisis indirecto de su cantidad mediante el estudio y medición de los niveles de sus productos de degradación, en este caso la determinación de los niveles de hidroxiprolina dentro del tejido fibroso mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) y determinar la existencia de diferencias entre los niveles de este metabolito de degradación del colágeno entre los distintos grupos de estudio (Woessner y cols., 1967; Abitbol y cols., 1994; Akesson y cols., 2005; Massie y cols., 2005).

4.6.1. Protocolo de degradación del tejido.

Se pesa el tejido fibrótico tomado de la zona quirúrgica y se homogenizan 5 mg de tejido con un Potter en 500 μ l de HCl 6N. Se toman 400 μ l del homogenizado y se coloca en un tubo de vidrio con tapa, en el que se añaden 3600 μ l de HCl 6N, y 100 μ l de Sarcosina 2mM como estándar interno.

Se cierran los tubos y se incuban 18 horas a 110°C en un Termoblock, tras lo cual los tubos se colocan a temperatura ambiente para enfriar, y se añaden 4 ml de NaOH 6N a cada tubo para neutralizar el ácido. Se agita con vortex durante unos segundos y se deja enfriar, tras lo que se ajusta a pH 9,5 \pm 0,5 con NaOH 6N. Se toman 2 alícuotas de 900 μ l de cada muestra y se mantienen a 4°C hasta la derivatización (Hutson y cols., 2003).

4.6.2. Soluciones de derivatización.

Para llevar a cabo el proceso de derivatización se requieren las siguientes soluciones:

1. Buffer borato:

- 0,7M de ácido bórico en agua destilada.

- Agua MilliQ.
- Se ajusta a pH 9,5 con una solución acuosa de NaOH.
- Llevar a 50 ml con agua MilliQ.

2. Solución OPA:

- 250 mg de o-phtalaldehido.
- 130 μ l de β -mercaptoetanol.
- 5 ml de acetonitrilo.

3. Reactivo de iodoacetamida:

- 700 mg de iodoacetamida.
- 5 ml de acetonitrilo.

4. Reactivo FMOC:

- 5 mM de FMOC (9-fluorenilmetilcloroformato).
- 10 ml de acetona.

5. Éter etílico.

4.6.3. Reacción de derivatización.

A la alícuota de 900 μ l de la reacción de degradación del tejido se le van añadiendo los 200 μ l de buffer borato, 100 μ l de la solución OPA, 100 μ l de reactivo de iodoacetamida y 300 μ l de reactivo de FMOC, agitando en un vortex durante 10 segundos y dejando 1 minuto de reposo tras la adición de cada una de las soluciones.

Finalmente se añaden 2 ml de éter etílico, y se agita fuertemente durante 30 segundos para lavar los contenidos del vial, se deja separar las fases y se retira la fase orgánica, y se repite nuevamente el lavado con éter y se recoge finalmente la fase acuosa para inyectarla en el HPLC.

4.6.4. Análisis por HPLC.

Para el análisis cromatográfico se empleó un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia de Waters® (Waters Corporation, Milford, MA; USA) compuesto por:

- Bomba de doble pistón “Waters 600E”.
- Inyector automático “Waters 717”.
- Detector de fluorescencia “Waters 474”.
- Registrador-Integrador con software “Waters Empower”.

La fase estacionaria fue una columna Sunfire™ con relleno C18 y 5 µm de diámetro de partícula y unas dimensiones de 250 x 4,6 mm (Waters Corporation, Milford, MA;USA), y la fase móvil utilizada en la determinación estuvo compuesta por una mezcla en relación (65/35) de los siguientes elementos:

- Componente A: Ácido acético glacial al 3% de tamponado con acetato sódico a pH 4,3.
- Componente B: Acetonitrilo.

Todos los solventes empleados para el análisis cromatográfico fueron de grado HPLC.

Se utilizó un flujo de 1 ml/min, con un tiempo total de cromatograma de 33 minutos y la temperatura de análisis de 25°C.

La detección de la fluorescencia se realizó a una longitud de onda de excitación de 265 nm y no se empleo filtro de emisión.

Los tiempos de retención de los distintos componentes fueron:

- L-Hidroxirolina.....6,8 minutos.
- D-Hidroxirolina.....9,1 minutos.
- Sarcosina.....16,5 minutos.
- Prolina.....22,9 minutos.

4.6.5. Cuantificación de las muestras.

La valoración de los analitos se realizó sobre soluciones patrón de los compuestos L-hidroxiprolina, D-hidroxiprolina y Prolina a concentraciones crecientes en una matriz, sometidas a los mismos procesos de derivatización que las muestras. Mediante regresión lineal de la representación gráfica de las concentraciones respecto a las áreas de los picos cromatográficos de cada compuesto y el área del Estándar Interno (Sarcosina), se obtienen las rectas de valoración para cada uno de los metabolitos en estudio y los coeficientes de correlación representativos de la linealidad del análisis. Dichas rectas de calibración junto con los coeficientes de correlación para cada tipo de matriz, son referidas en la tabla a continuación (Tabla 2).

COMPUESTO	RECTA DE VALORACIÓN	COEFICIENTE r^2
L-Hidroxiprolina	[L-Hyp] (μM) = 10,683 x RATIO - 0,145	0,995
D-hidroxiprolina	[D-Hyp] (μM) = 12,745 x RATIO + 0,004	0,999
Prolina	[Pro] (μM) = 10,857 x RATIO + 0,068	0,999

Tabla 2. Rectas de valoración de hidroxiprolina y prolina.

La transformación isomérica de L-hidroxiprolina en D-hidroxiprolina, se produce durante la degradación del cartílago en medios muy ácidos, tal y como ha sido descrita con anterioridad, por tanto en nuestro estudio se determinaron ambos isómeros y se tuvieron en cuenta a la hora de cuantificar los niveles de hidroxiprolina existentes en el estudio (Dziewiatkowski y cols., 1972; Hutson y cols., 2003) (Figura 1).

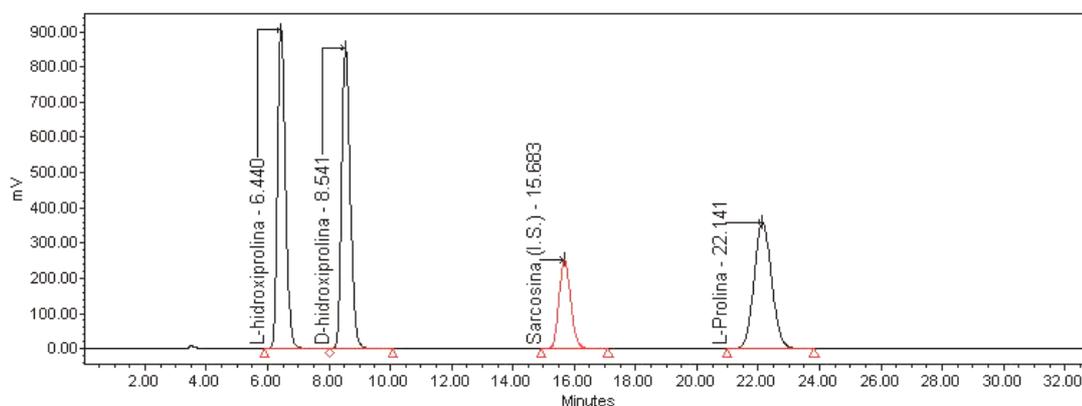


Figura 1. Cromatograma de la hidroxiprolina.

4.7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRA

PARA EL ESTUDIO ANATOMO-

PATOLÓGICO.

Las muestras para estudio anatómo-patológico, que corresponden a la parte superior del disco intervertebral L7-S1 y al segmento de la laminectomía, se introducen en una solución de formalina al 10% para su conservación. Posteriormente dichas muestras se depositan en un recipiente con solución decalcificante rápida DC3® (Labonord Templemars, Francia) durante un periodo de 48 horas, esto permite el adecuado procesamiento posterior de dichas muestras. Trascorridas las 48 horas se procede a realizar un corte mediante sierra manual de las muestras, y posteriormente se las incluye en parafina para seguidamente realizar secciones de las mismas de 3 micras y su tinción con hematoxilina-eosina.

El estudio de la fibrosis de cada muestra se determinó realizando la cuantificación del número de fibroblastos en 40X campos de magnificación en la zona de laminectomía que fue medida individualmente por dos observadores distintos. Esto fue repetido en tres campos, localizados en la zona media y en los márgenes de cada lugar en los que se había realizado la laminectomía. La media de los fibroblastos que se encontraban en los tres campos se recogió en cada uno de los conejos operados (He y cols., 1995; Hinton y cols., 1995).

El grado de fibrosis se estableció de la siguiente manera (He y cols., 1995):

1. Grado 1: la media de los fibroblastos de los tres campos era menor a 100 fibroblasto 40X.
2. Grado 2: la media de los fibroblastos se encuentra entre los 100 y 150 fibroblastos 40X.
3. Grado 3: la media de los fibroblastos es superior a los 150 fibroblastos.

4.8. DETERMINACIÓN DE LOS NÍVELES DE

YKL 40.

Basándonos en el hecho de que la YKL 40 se asocia a la presencia de fibrosis y que ella es la causa del dolor postquirúrgico en estos pacientes con un mal resultado tras la cirugía raquídea y bajo la premisa de que los conejos intervenidos no tenían ningún tipo de patología asociada a nivel hepático, pulmonar u osteoarticular generador de fibrosis que pudiera actuar como factor de confusión, decidimos realizar la determinación de los niveles de YKL 40 en los distintos grupos a estudio en busca de diferencias entre los niveles de YKL 40 de los mismos (Mehta y cols., 2008; Schiavon y cols., 2008).

4.8.1. Homogenización del tejido.

Se tomaron 20 mg de tejido fibrótico de cada conejo y se colocó en un tubo con 800 μ l de buffer de homogenización y se homogenizó utilizando un Polytron durante 1 minuto. El homogenizado se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se recogió y se guardó a -80°C hasta su utilización.

4.8.2. Determinación de la concentración de proteínas.

La determinación de proteínas está basada en el método de Bradford y se realizó utilizando un kit METRA™ YKL 40 EIA® (QUIDEL, San Diego, CA, USA), y empleando los patrones de globulina comercializados junto al kit para la realización de la recta patrón.

4.8.3. Determinación de la proteína YKL 40.

Se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit como se describe a continuación: se atemperaron los pocillos recubiertos con estreptavidina a temperatura ambiente y se añadieron 20 μ l de las muestras, de los estándares y de los controles a los

distintos pocillos, tras ello se añadieron 100 μ l de Solución de Captura, que contiene anticuerpos monoclonales anti-YKL 40 conjugados con biotina a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tras esta incubación se eliminó el líquido de los pocillos y se hicieron cuatro lavados con 250 μ l de tampón de lavado cada vez. Se eliminaron los residuos del tampón de lavado y se añadieron 100 μ l de enzima conjugada recién reconstituida a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

De nuevo se eliminó el líquido de los pocillos y se hicieron otros 4 lavados, con 250 μ l de tampón de lavado cada vez, y se eliminaron los residuos del tampón de lavado. Se añadieron 100 μ l de la solución del sustrato a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se añadieron 100 μ l de solución de parado a cada pocillo y se leyó la absorbancia a 405nm con un lector de placas de la casa Bio-Tek® (Instruments, Winooski, VT, USA) en los 15 minutos siguientes a la adición de dicha solución.

Empleando la recta patrón de calibración, calculada mediante regresión lineal a partir de los estándares analizados, se calculó a partir de la absorbancia de cada muestra la concentración de YKL 40 presente en cada muestra. La cantidad de YKL 40 se relativiza en función de la concentración de proteínas existentes en el homogenizado, expresándose finalmente los resultados como ng de YKL 40 por mg de proteína en el homogenizado.

4.9. DETERMINACIÓN DE LOS NÍVELES DE MMP'S (MMP-1 Y MMP-9).

El estudio de las MMP's se centró en un tipo de colagenasa, la MMP-1, y un tipo de gelatinasa, la MMP-9. Ambas se producen y liberan por fibroblastos, entre otros tipos celulares, y su expresión se encuentra aumentada en situaciones de un elevado recambio de la matriz extracelular como ocurre en el tejido reparativo cicatricial y en determinado tipo de tumores. En nuestro estudio este tejido cicatricial rico en fibroblastos se encontraría en la zona de la cicatriz quirúrgica tanto a nivel cutáneo, muscular y en la zona del espacio epidural, lugar este último donde realizamos la medición de los niveles de MMP-1 y 9 tras la degradación del tejido fibrótico.

4.9.1. Degradación del tejido fibrótico.

Parte del tejido fibrótico, que hemos extraído de la zona quirúrgica y que va a ser estudiado, se somete a digestión durante 6 horas a 37°C en un tampón fosfato salino a pH 7,4 y con 0,1 mg/ml de hialuronidasa y 2 mg/ml de colagenasa tipo IIS, empleándose 0,5 ml de tampón con enzimas por cada 10 mg de tejido fibrótico. Las muestras se centrifugan 5 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se almacena a -80°C hasta su utilización para determinar las metaloproteinasas de matriz por ELISA.

4.9.2. Determinación de MMP-1 y de MMP-9.

La determinación de estas metaloproteinasas de matriz se realizó mediante los kits Enzolyte Plus 520 MMP-1® y Enzolyte Plus 520 MMP-9® respectivamente (Anaspec, San José, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante como se describe a continuación. Dichos kit están diseñados para la detección específica de MMP 1 y 9 activada en muestras biológicas, medios de cultivo, suero, plasma, líquido sinovial y homogeneizado de tejido. Para la medición de la señal de fluorescencia generada se emplea un lector de placas (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) (Dean y cols., 1989; Martel-Pelletier y cols., 1994).

4.9.3. Detección de la MMP-1.

4.9.3.1. Preparación de los estándares para la curva patrón:

Partiendo de la muestra inicial de MMP-1 estándar a (10 µg/ml) y empleando el buffer de dilución suministrado en el kit, se realizó una dilución 1:50 para obtener una solución a concentración 200 ng/ml, a partir de la cual y mediante diluciones seriadas de 1:2, se obtuvieron los estándares a concentración (100; 50; 25; 12,5; 6,25 y 3,125 ng/ml) que se emplearon para realizar la recta patrón utilizando el buffer de dilución como control blanco (Figura 2).

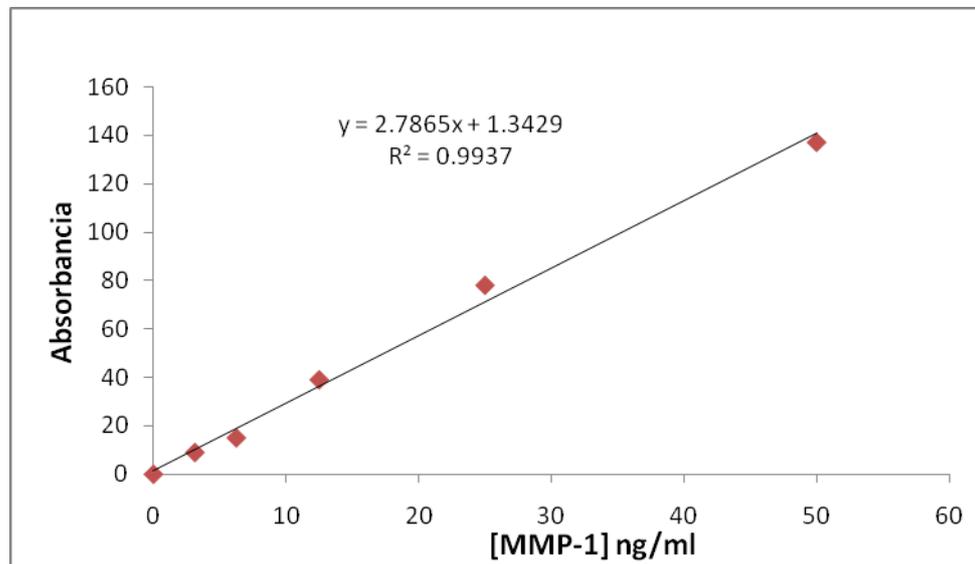


Figura 2. Recta patrón para la determinación de los niveles de MMP-1.

4.9.3.2. Desarrollo del ensayo.

Se añadieron 100 µl de muestra, MMP-1 estándar y control blanco en los pocillos que tienen el anticuerpo monoclonal anti-MMP-1 adherido al fondo. Se cubrió el pocillo con una tira adhesiva para prevenir la evaporación y se incubó la placa en un agitador de placas a 50 rpm a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminó el líquido sobrante y se lavó 4 veces con 200 µl de buffer de lavado cada pocillo, retirando el líquido sobrante al finalizar los lavados.

4.9.3.3. Activación de la pro-MMP-1 por APMA.

Se diluyó la solución comercial 100 Mm de APMA (4 acetato aminofenilmercurio) de la que dispone el kit en el buffer de ensayo a una concentración final 1 mM, y se añadieron 100 μ L de esta concentración 1 mM de APMA por pocillo, la placa se cubrió con una tira adhesiva para prevenir la evaporación y se incubó la placa a 37°C durante tres horas. Al final de esta incubación se lavaron cuatro veces los pocillos con 200 μ L de buffer de lavado.

Se añadieron 100 μ L de solución de sustrato de MMP-1 en cada pocillo y se dejó incubar 16 horas a temperatura ambiente en oscuridad y finalmente se midió la señal fluorescente con un lector de placas Bio-Tek (Instruments, Winooski, VT, USA).

4.9.4. Detección de la MMP-9.

La detección de la MMP-9 siguió los mismos pasos que la de MMP-1, realizando los pasos que describe el fabricante del kit, pero con el empleo de anticuerpos y sustratos adecuados para la MMP-9 y con un tiempo de activación por APMA de sólo 1 hora de incubación, tal y como indica el fabricante.

Los datos de fluorescencia obtenidas fueron transformados en concentraciones de MMP-1 o MMP-9 respectivamente, empleando la curva de calibración obtenida con los patrones y siendo después expresados como ng de la metaloproteinasa por mg de tejido fibrótico (Figura 3).

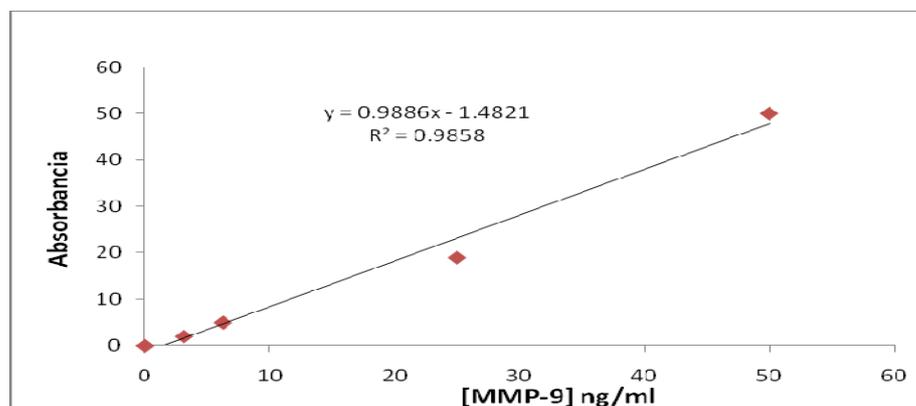


Figura 3. Recta patrón para la determinación de los niveles de MMP-9.

4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se expresan como Media \pm SD. Mediante el empleo del software STATISTICA for Windows Versión 5.5 (2000) (StatSoft, Inc. Tulsa, OK; USA), se estableció la significación estadística de las diferencias existentes entre los grupos de experimentación mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) siendo determinadas las diferencias estadísticas mediante el test de Newman-Keuls considerándose el valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Las comparaciones entre el grupo control con cada grupo tratado con AH se realizaron mediante un test t de Student para dos muestras independientes, considerando el valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Los resultados correspondientes del estudio anatómico-patológico y del estudio de imágenes de resonancia magnética nuclear fueron analizados estadísticamente con métodos no paramétricos: la prueba de Kruskal-Wallis como análisis global para probar si un grupo de datos proviene de la misma población y, la comparación entre los distintos grupos con respecto al grupo control, mediante la prueba de la U de Mann-Whitney.

5. RESULTADOS.

5.1. RESULTADOS DEL PESO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO FIBROSO DENTRO DEL CANAL NEURAL.

Los pesos del tejido dentro del canal neural obtenidos en los distintos grupos fueron los siguientes (Tablas 3, 4, 5 y 6):

GRUPO CONTROL.

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>PESO</u>		
		<u>TEJ (mg)</u>	<u>MEDIA</u>	<u>SD</u>
CONTROL	1	122,20	119,49	23,35
CONTROL	2	127,63		
CONTROL	3	90,50		
CONTROL	4	151,90		
CONTROL	5	118,90		
CONTROL	6	137,30		
CONTROL	7	88		

Tabla 3. Peso del tejido fibroso en grupo control.

GRUPO ADANT®.

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>PESO</u>		
		<u>TEJ (mg)</u>	<u>MEDIA</u>	<u>SD</u>
ADANT	1	74,52	93,16	41,19
ADANT	2	99,60		
ADANT	3	102,36		
ADANT	4	55,76		
ADANT	5	167,20		
ADANT	6	59,55		

Tabla 4. Peso del tejido fibroso en grupo Adant®.

GRUPO DUROLANE®.

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>PESO</u>		
		<u>TEJ (mg)</u>	<u>MEDIA</u>	<u>SD</u>
DUROLANE	1	97,82	100,87	27,15
DUROLANE	2	101,30		
DUROLANE	3	127,90		
DUROLANE	4	125,40		
DUROLANE	5	62,64		
DUROLANE	6	123,50		
DUROLANE	7	67,55		

Tabla 5. Peso del tejido fibroso en grupo Durolane®.

GRUPO HYALGAN®.

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>PESO</u>		
		<u>TEJ (mg)</u>	<u>MEDIA</u>	<u>SD</u>
HYALGAN	1	56,08	57,50	4,63
HYALGAN	2	58,70		
HYALGAN	3	63,26		
HYALGAN	4	59		
HYALGAN	5	50,50		

Tabla 6. Peso del tejido fibroso en grupo Hyalgan®.

Si expresamos estos datos de forma gráfica obtenemos la siguiente distribución de los resultados de los distintos grupos (Figura 4).

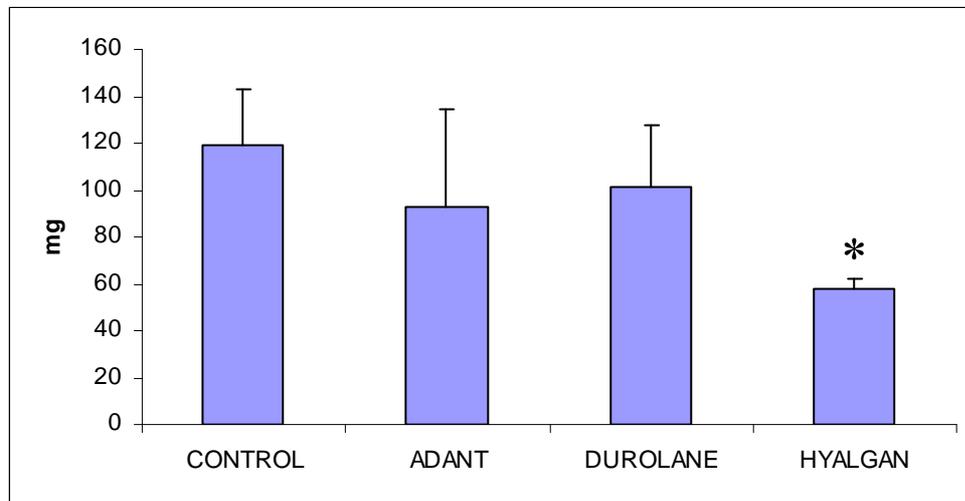


Figura 4. Representación gráfica del peso del tejido fibroso dentro del canal neural.
(* Diferencias significativas ($p < 0,05$) con el grupo Control según el test t de Student).

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) siendo determinadas las diferencias estadísticas mediante el test de Newman-Keuls considerándose el valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo (Anexo Ia).

Al realizar el estudio estadístico mediante un test t de Student para dos muestras independientes, considerando el valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo, encontramos diferencias en el peso del tejido fibroso entre el grupo Hyalgan® y el grupo control® ($p = 0,007$) (Anexo Ib)

5.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LAS IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

Las imágenes 34, 35, 36, 37 y 38 recogen diferentes estadios del estudio y se corresponden con cortes axiales a nivel de T1 y de T2 de la zona quirúrgica. En ellas se observan tanto la ausencia como la presencia de fibrosis intracanal. Así como la captación del contraste (gadolinio) en la zona muscular, en la zona de la laminectomía e interior del canal neural.

Los resultados de la cuantificación del estudio de la extensión de la fibrosis epidural realizado en las imágenes de RMN al mes y medio (RMN inicial) y a los tres meses de la cirugía (RMN final) con la metodología correspondiente, descrita en el apartado 4.5 del capítulo de Material y Métodos, son los siguientes (Tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14) (Imágenes 34, 35, 36, 37 y 38):

5.2.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE RMN EN EL GRUPO CONTROL.

<u>RMN INICIAL.</u>			<u>RMN FINAL.</u>		
<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>RMN mes y medio</u>	<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>RMN FINAL</u>
CONTROL	1	2	CONTROL	1	1
CONTROL	2	2	CONTROL	2	2
CONTROL	3	2	CONTROL	3	3
CONTROL	4	0	CONTROL	4	0
CONTROL	5	2	CONTROL	5	1
CONTROL	6	0	CONTROL	6	0
CONTROL	7	1	CONTROL	7	2

Tabla 7. Valores de RMN inicial en el grupo control.

Tabla 8. Valores de RMN final en el grupo control.

5.2.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE RMN EN EL GRUPO ADANT®.

El grupo Adant® lo componen 6 conejos y la puntuación medida en las RMN iniciales y finales son las siguientes:

<u>RMN INICIAL.</u>			<u>RMN FINAL.</u>		
<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>RMN mes y medio</u>	<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>RMN FINAL</u>
ADANT	1	1	ADANT	1	3
ADANT	2	1	ADANT	2	1
ADANT	3	0	ADANT	3	0
ADANT	4	1	ADANT	4	0
ADANT	5	2	ADANT	5	1
ADANT	6	1	ADANT	6	1

Tabla 9. Valores de RMN inicial en el grupo Adant®.

Tabla 10. Valores de RMN final en el grupo Adant®.

5.2.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE RMN EN EL GRUPO DUROLANE®.

El grupo Durolane® lo componen 7 conejos y la puntuación medida en las RMN iniciales y finales son las siguientes:

<u>RMN INICIAL</u>			<u>RMN FINAL.</u>		
<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>RMN mes y medio</u>	<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>RMN FINAL</u>
DUROLANE	1	0	DUROLANE	1	0
DUROLANE	2	1	DUROLANE	2	1
DUROLANE	3	0	DUROLANE	3	1
DUROLANE	4	0	DUROLANE	4	1
DUROLANE	5	2	DUROLANE	5	1
DUROLANE	6	1	DUROLANE	6	0
DUROLANE	7	2	DUROLANE	7	0

Tabla 11. Valores de RMN inicial grupo Durolane®.

Tabla 12. Valores de RMN final en el grupo Durolane®.

5.2.4. RESULTADO DEL ESTUDIO DE RMN EN EL GRUPO HYALGAN®.

El grupo Hyalgan® lo componen 5 conejos y la puntuación medida en las RMN iniciales y finales son las siguientes:

RMN INICIAL.

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>RMN mes y medio</u>
HYALGAN	1	0
HYALGAN	2	0
HYALGAN	3	0
HYALGAN	4	1
HYALGAN	5	0

Tabla 13. Valores de RMN inicial en el grupo Hyalgan®.

RMN FINAL.

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>RMN FINAL</u>
HYALGAN	1	0
HYALGAN	2	1
HYALGAN	3	0
HYALGAN	4	0
HYALGAN	5	0

Tabla 14. Valores de RMN final en el grupo Hyalgan®.

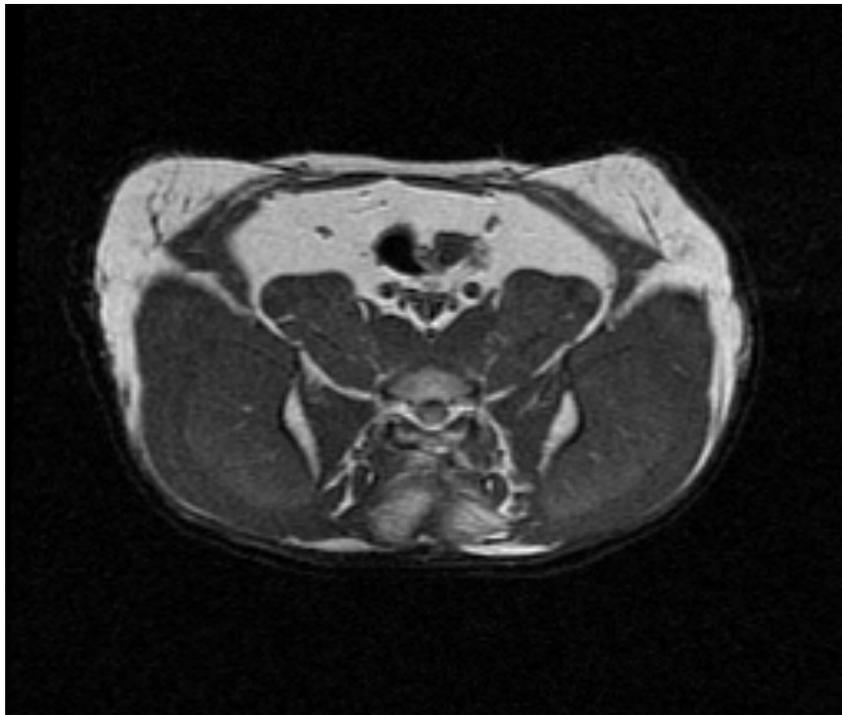


Imagen 34. Corte axial de RMN en T1 sin contraste. Ausencia de fibrosis intracanal (grado 0).

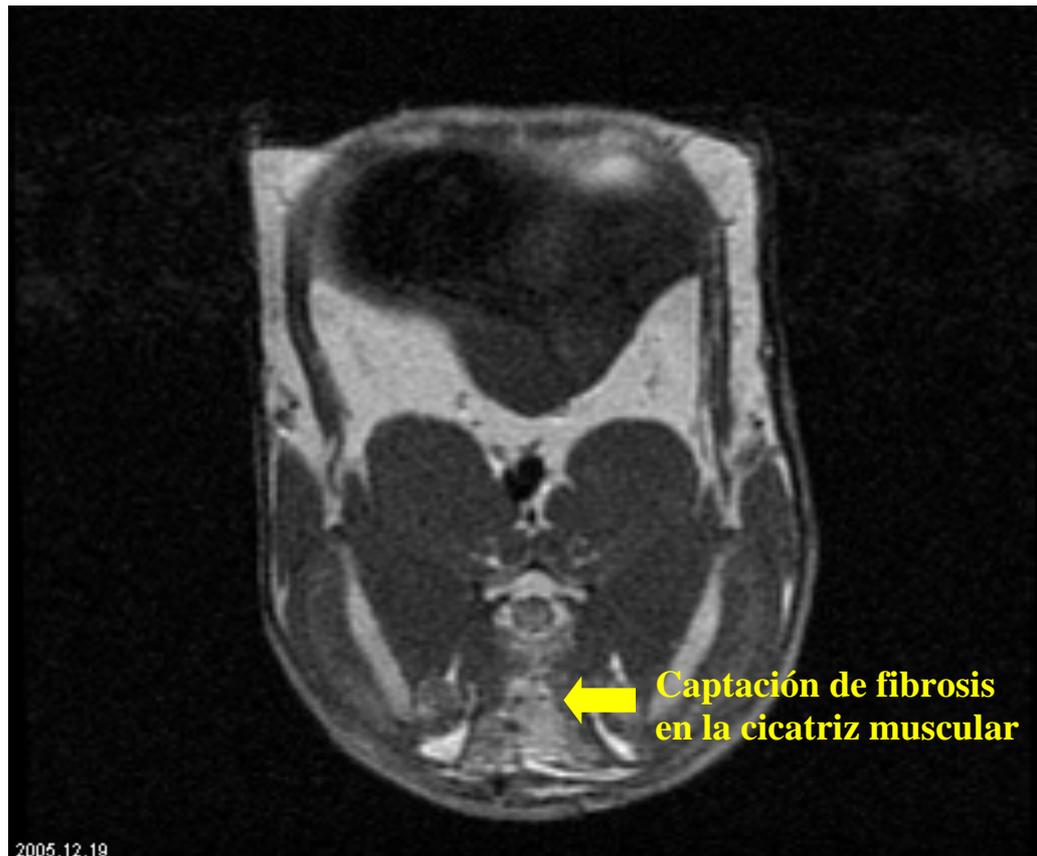


Imagen 35. Corte axial de RMN en T1 con contraste. Captación de gadolinio en la zona de cicatriz muscular y ausencia de captación dentro del canal neural (grado 0).

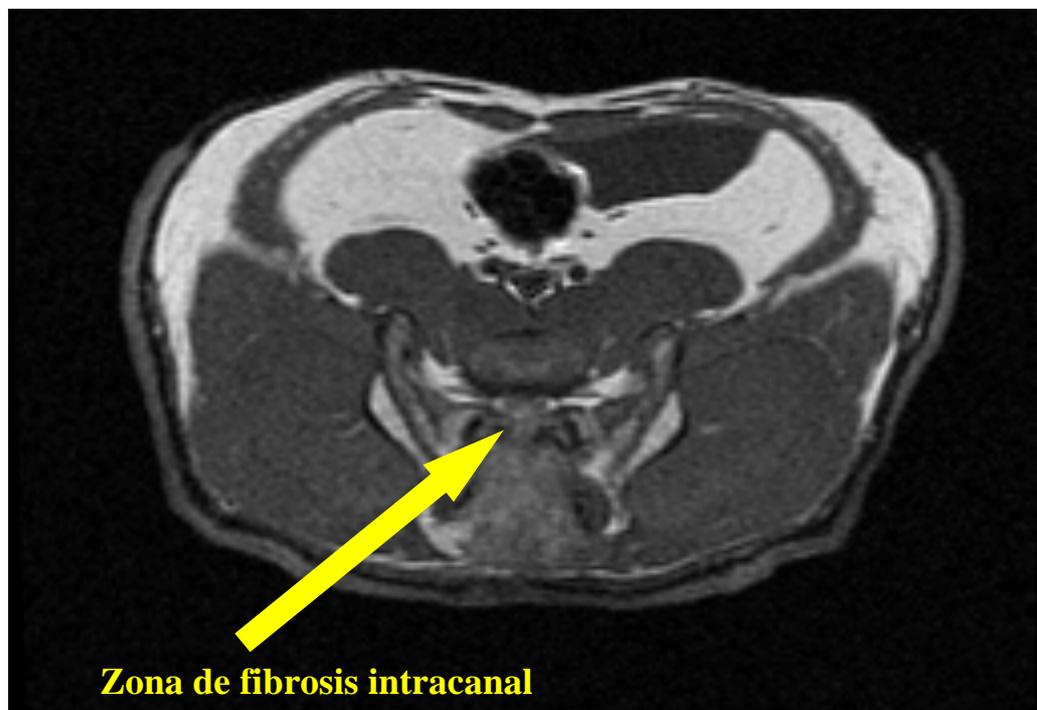


Imagen 36. Corte axial de RMN en T1 sin contraste. Zona quirúrgica y presencia de fibrosis intracanal.

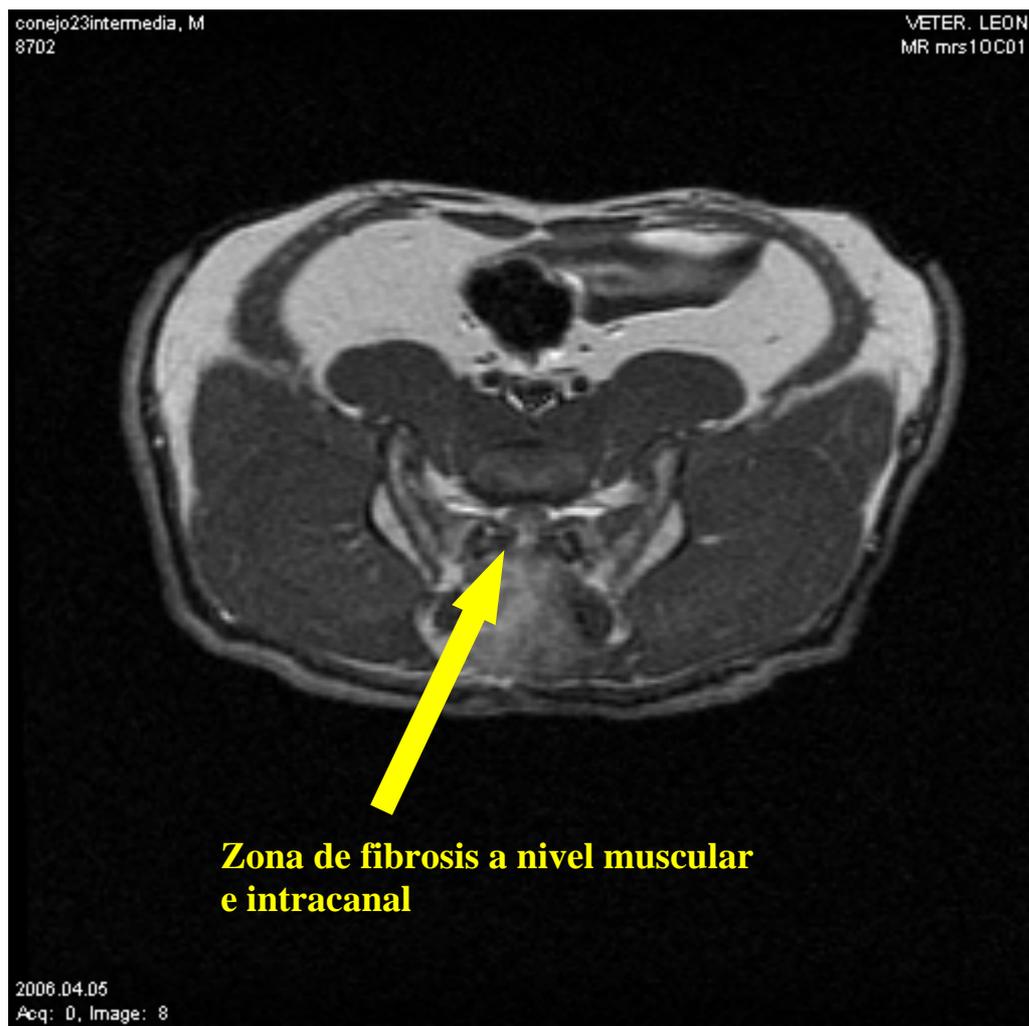


Imagen 37. Corte axial de RMN en T1 con contraste del mismo conejo apreciándose la captación tanto en la zona muscular como en la zona de la laminectomía e interior del canal neural.

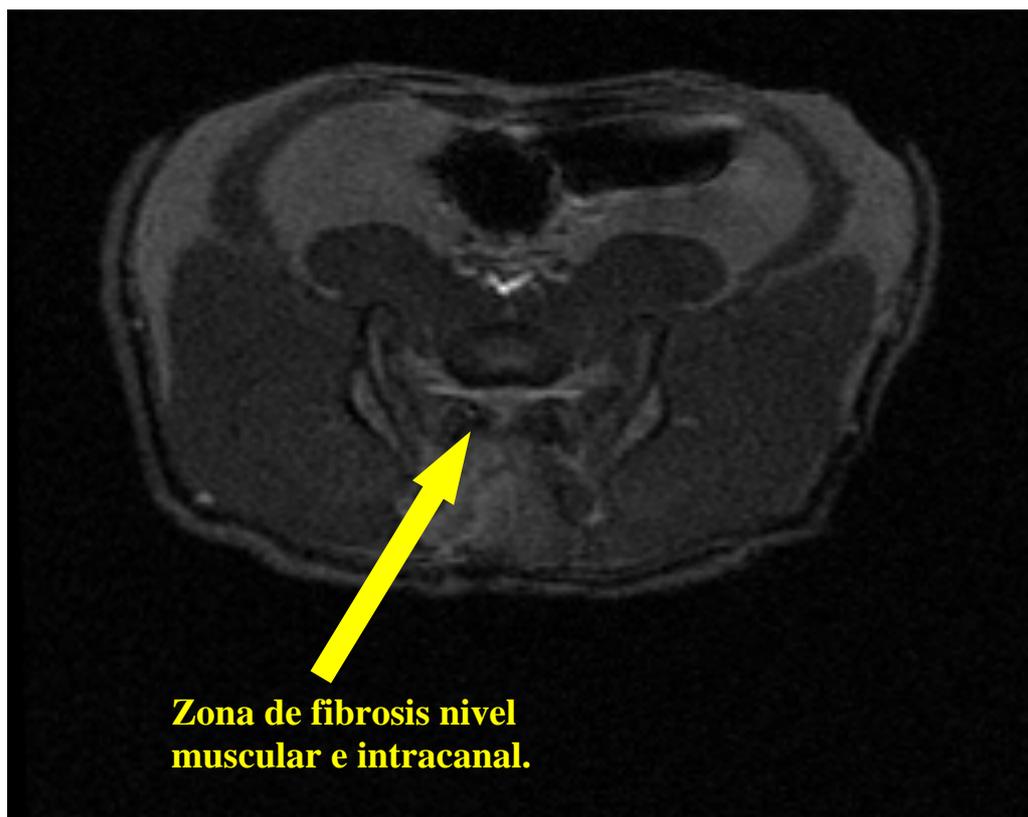


Imagen 38. Imagen de RMN en T2 con contraste de la misma zona quirúrgica donde se observa el tejido fibroso intracanal.

La representación gráfica de los resultados de la extensión de la fibrosis en los distintos grupos de estudio es la siguiente:

Grado 0 de fibrosis:		Grado 4 de fibrosis:	
Grado 1 de fibrosis:		Grado 5 de fibrosis:	
Grado 2 de fibrosis:		Grado 6 de fibrosis:	
Grado 3 de fibrosis:			

La medición de la cantidad de fibrosis intracanal en el momento inicial (al mes y medio de la cirugía) y en el momento final (a los tres meses de la cirugía) para los distintos grupos de estudio es la siguiente:

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE RMN INICIAL Y FINAL EN LOS DISTINTOS GRUPOS DE ESTUDIO.

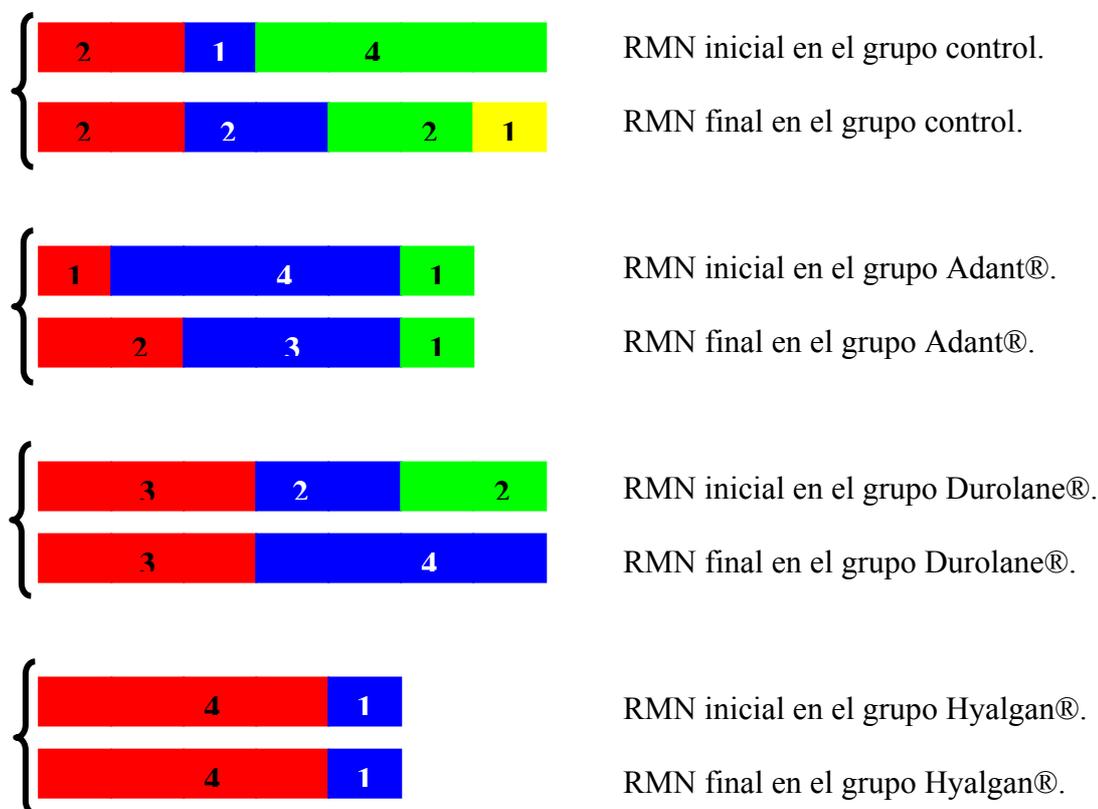


Tabla 15. Representación gráfica de los valores de fibrosis en el estudio de RMN inicial y final en los diferentes grupos de estudio.

RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS IMÁGENES DE RMN.

Se realizaron análisis estadísticos no paramétricos considerando grupos de muestras independientes: Kruskal-Wallis para la comparación de los 4 grupos de estudio a tiempo inicial y final, y la U de Mann-Whitney para la comparación por pares de cada uno de los grupos de estudio, así como para las diferencias en cada grupo entre el análisis inicial y final (Anexos IIa, IIb y IIc).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el análisis de Kruskal-Wallis ni a tiempo inicial ni a tiempo final entre los distintos tratamientos entre sí, ni frente al control (Anexos IIIa, IIIb y IIIc).

El análisis mediante la U de Mann-Whitney por pares no demostró ni a tiempo inicial ni a tiempo final diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en ninguna de las asociaciones.

La comparación dentro de cada grupo entre la situación inicial y final tampoco detectó diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de la U de Mann-Whitney.

A la luz de estos resultados en los que no existen diferencias entre el grado de fibrosis entre los distintos grupos de estudio de AH y el control ni al mes ni a los tres meses de la cirugía, y la comprobación de que la fibrosis no variaba en cada grupo ya fuera control o AH entre la fibrosis que presentaban al mes y medio y los tres meses, decidimos que podíamos doblar el número de conejos pertenecientes a cada grupo, considerando los resultados al mes y medio y a los tres meses como un único grupo con el objetivo de aumentar el número de datos para cada grupo. De esta forma al realizar nuevamente el análisis de Kruskal-Wallis encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ($p = 0,018$).

Los diagramas de barras recogen la medición de la cantidad de fibrosis intracanal conjunta, al mes y medio de la cirugía y en el momento final (a los tres meses de la cirugía), para los distintos grupos de estudio (Tabla 16).

**RESULTADOS DEL ESTUDIO DE RMN INICIAL MÁS FINAL EN LOS
DISTINTOS GRUPOS DE ESTUDIO.**

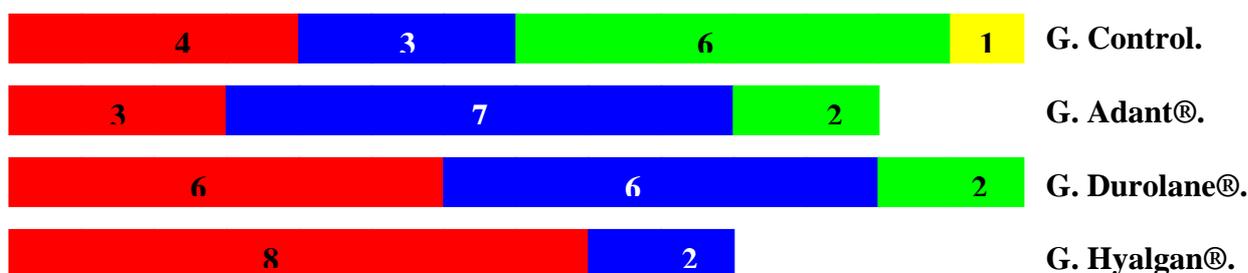


Tabla 16. Representación de los resultados de la medición de fibrosis en la RMN inicial más la final en los diferentes grupos de estudio.

La comparación por pares mediante la U de Mann-Whitney determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p=0,012$) entre el grupo control y el grupo Hyalgan® (Anexos Va, Vb y Vc).

5.3. RESULTADO DE LOS NIVELES DE HIDROXIPROLINA.

Los valores medidos de hidroxiprolina en el tejido fibroso intracanal mediante estudio de HPLC fue el siguiente en los cuatro grupos de estudio (control, Adant®, Durolane® e Hyalgan®).

CANTIDAD DE HIDROXIPROLINA (ng hidroxiprolina/mg de tejido fibroso)
(Tabla 17 y Figura 5).

Hidroxiprolina

	n	ng hidroxiprolina/ mg de tejido. (Media±DE)
CONTROL	7	121,62 ± 49,42
ADANT®	6	44,93 ± 38,12
DUROLANE®	7	48,10 ± 40,13
HYALGAN®	5	63,59 ± 50,87

Tabla 17. Niveles de hidroxiprolina en los distintos grupos de estudio.

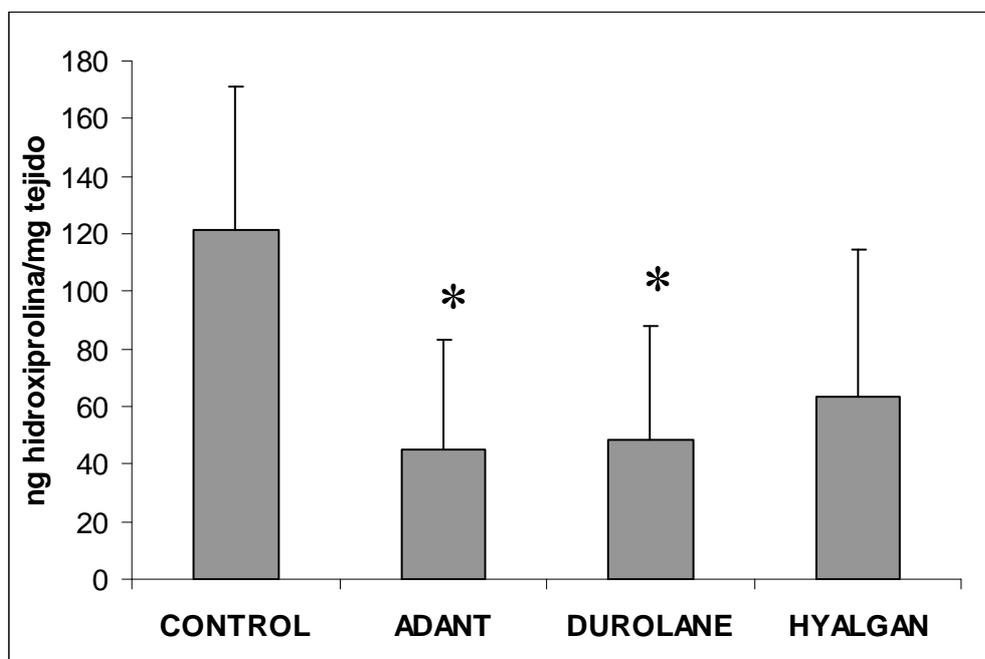


Figura 5. Representación gráfica de los niveles de hidroxiprolina.
(* Diferencias significativas ($p < 0,05$) con el grupo Control según el test t de Student).

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) siendo determinadas las diferencias estadísticas mediante el test de Newman-Keuls considerándose el valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo, para la cantidad de hidroxiprolina existente dentro del tejido fibroso desarrollado tras la laminectomía entre los conejos del grupo control ($121,62 \pm 49,42$) y los grupos de conejos tratados tanto con Adant® ($44,93 \pm 38,12$), como con Durolane® ($48,10 \pm 40,13$) y con Hyalgan® ($63,59 \pm 50,87$) (Anexo VIa).

Al realizar el estudio estadístico mediante un test t de Student para dos muestras independientes, considerando el valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo, encontramos diferencias entre el grupo Control® y el grupo Durolane® ($p=0,019$) y entre el grupo Control® y Adant® ($p=0,012$). No encontrándose estas diferencias entre el grupo Control® e Hyalgan® (Anexo VIb).

5.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO ANATOMO-PATOLÓGICO.

Los resultados del estudio histológico de las muestras de los conejos de los diferentes grupos, en función del número de fibroblastos encontrados (40x campos de magnificación) se recoge en las imágenes 39, 40, 41, 42 y 43 que muestran los diferentes grados de fibrosis alcanzados y en las Tablas 18, 19, 20 y 21.

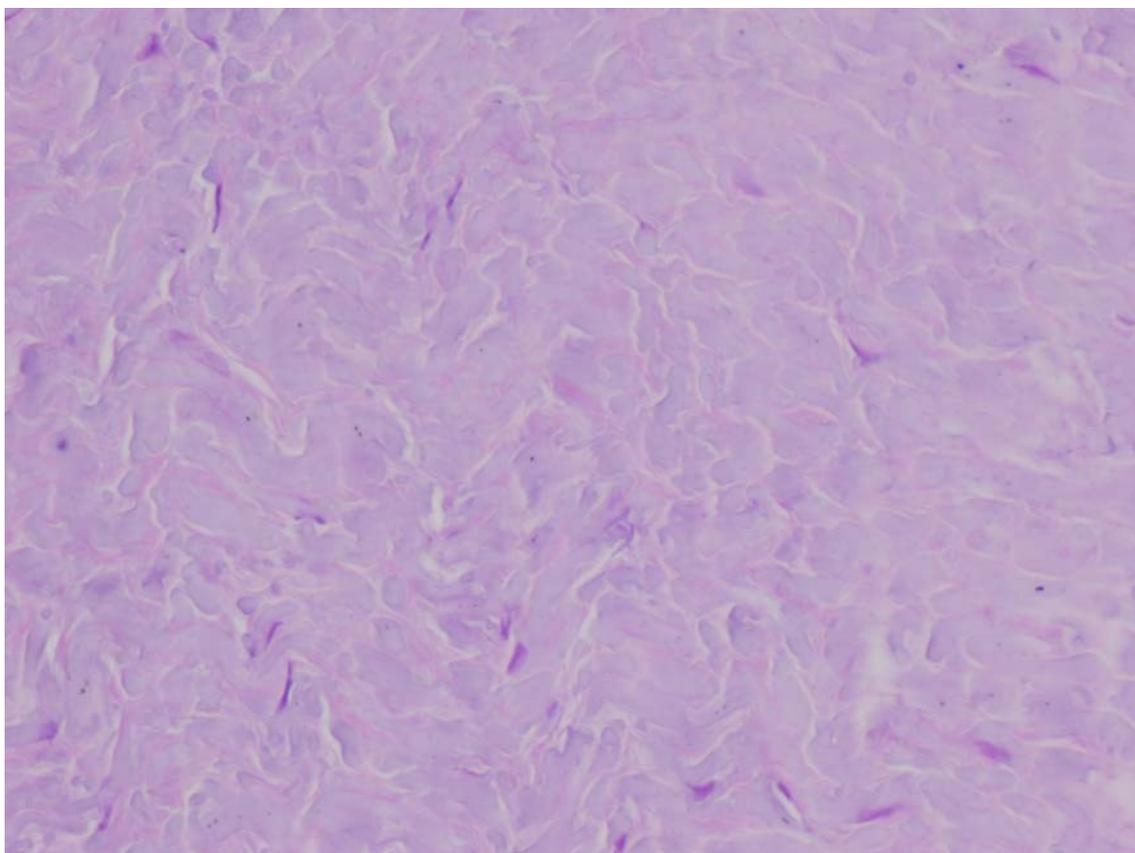


Imagen 39. Imagen de anatomía patológica. Grado 1 de fibrosis. Menos de 100 fibroblastos (por campo de magnificación 40x).

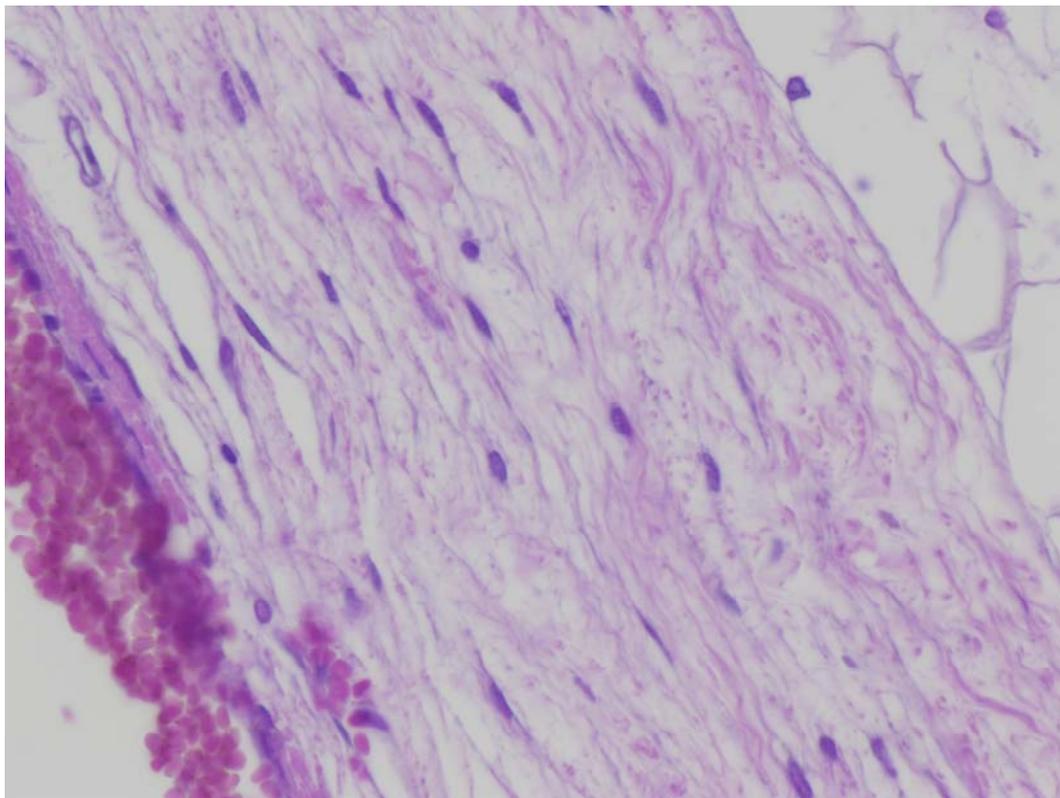


Imagen 40. Imagen de anatomía patológica. Grado 2 de fibrosis. 100-150 fibroblastos (por campo de magnificación 40x).

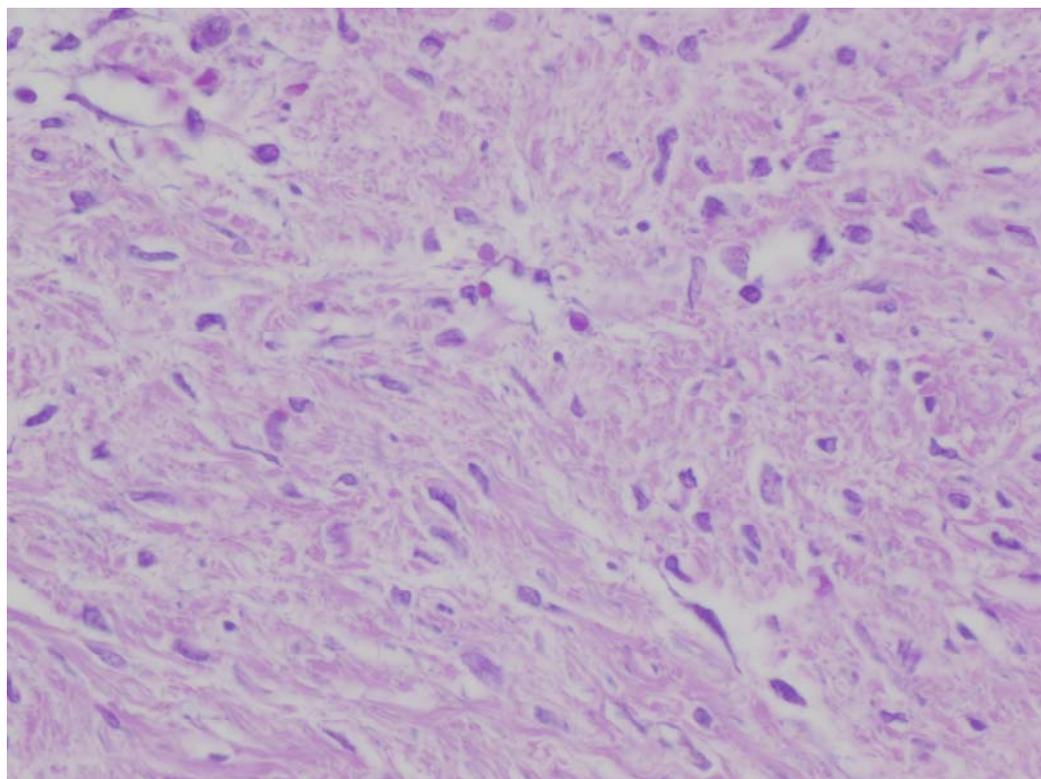


Imagen 41. Imagen de anatomía patológica. Grado 3 de fibrosis. Más de 150 fibroblastos (por campo de magnificación 40x).



Imagen 42. Banda de tejido fibroso dentro del canal vertebral rodeando el tejido neural.

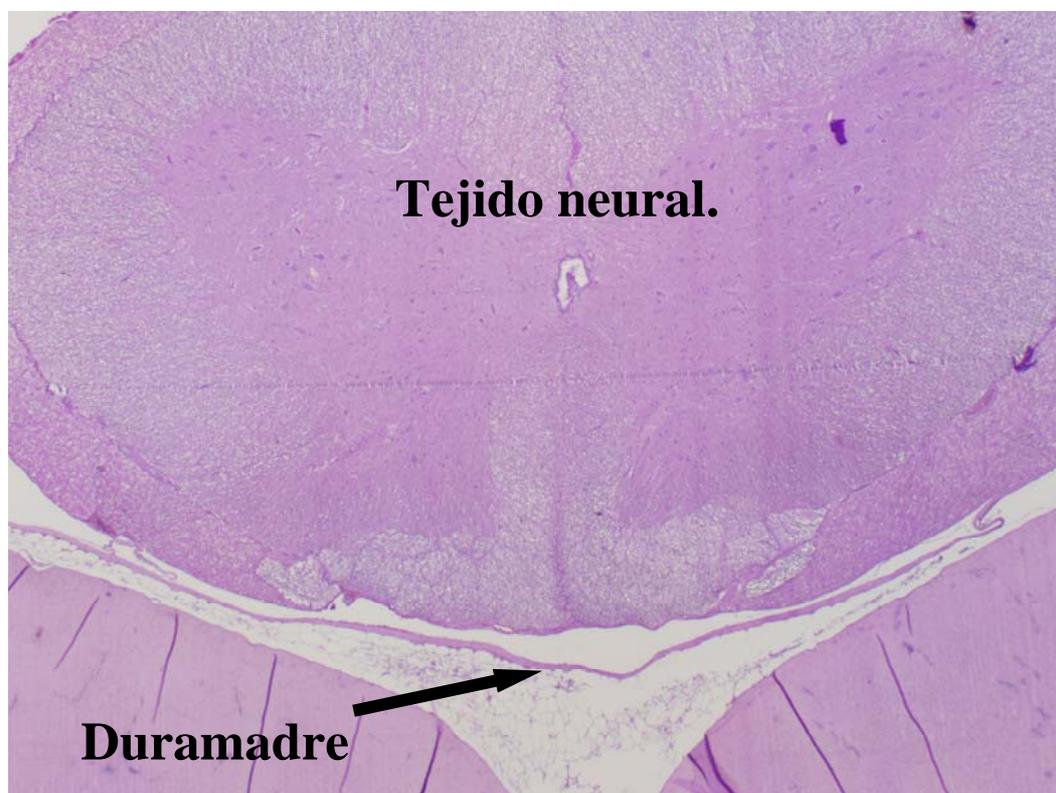


Imagen 43. Estudio de anatomía patológica. Tejido neural rodeado de duramadre.

GRUPO CONTROL

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>GRADO DE FIBROSIS</u>
CONTROL	1	3
CONTROL	2	1
CONTROL	3	3
CONTROL	4	3
CONTROL	5	2
CONTROL	6	2
CONTROL	7	3

Tabla 18. Resultados del estudio anatómo-patológico en grupo control.

GRUPO ADANT®.

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>GRADO DE FIBROSIS</u>
ADANT	1	3
ADANT	2	1
ADANT	3	1
ADANT	4	1
ADANT	5	1
ADANT	6	1

Tabla 19. Resultados del estudio anatómo-patológico en grupo Adant®.

GRUPO DUROLANE®.

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>GRADO DE FIBROSIS</u>
DUROLANE	1	1
DUROLANE	2	1
DUROLANE	3	1
DUROLANE	4	1
DUROLANE	5	2
DUROLANE	6	1
DUROLANE	7	1

Tabla 20. Resultados del estudio anatómo-patológico en grupo Durolane®.

GRUPO HYALGAN®.

<u>GRUPO</u>	<u>CONEJO</u>	<u>GRADO DE FIBROSIS</u>
HYALGAN	1	1
HYALGAN	1	1
HYALGAN	3	1
HYALGAN	4	1
HYALGAN	5	1

Tabla 21. Resultados del estudio anatómo-patológico en grupo Hyalgan®.

La representación gráfica de los resultados del estudio anatómo-patológico es la siguiente (Tabla 22):

Grado 1 de fibrosis: 

Grado 2 de fibrosis: 

Grado 3 de fibrosis: 

GRADO DE FIBROSIS EN EL ESTUDIO ANATOMO-PATOLÓGICO.

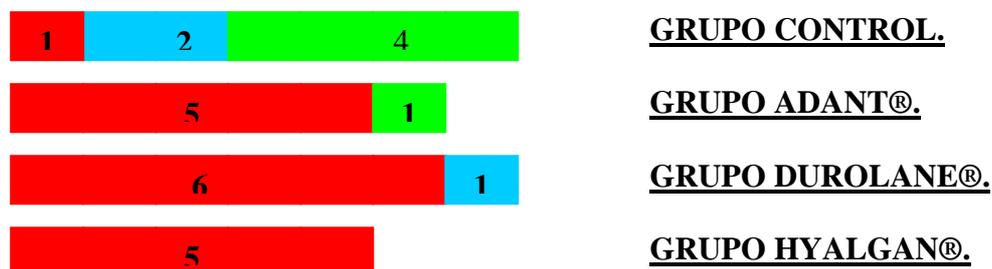


Tabla 22. Representación gráfica de los valores de estudio de anatomía patológica en los diferentes grupos de estudio.

El análisis de Kruskal-Wallis muestra diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos ($p=0,0049$) y la comparación por pares mediante la U de Mann-Whitney determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo Control y los grupos con tratamiento de Adant®, Durolane® e Hyalgan® (Anexos VIIa, VIIb y VIIc).

5.5. RESULTADOS DE LOS NIVELES DE YKL 40.

Los resultados obtenidos de la determinación de los niveles de YKL 40 en los diferentes grupos fueron los siguientes (Tabla 23 y Figura 6):

YKL 40.

	n	ng YKL-40/ mg proteína (Media±DE)
CONTROL	7	1,83 ± 1,07
ADANT®	6	2,08 ± 0,83
DUROLANE®	7	2,00 ± 1,50
HYALGAN®	5	2,32 ± 1,11

Tabla 23. Valores de los niveles de YKL 40 en los distintos grupos de estudio.

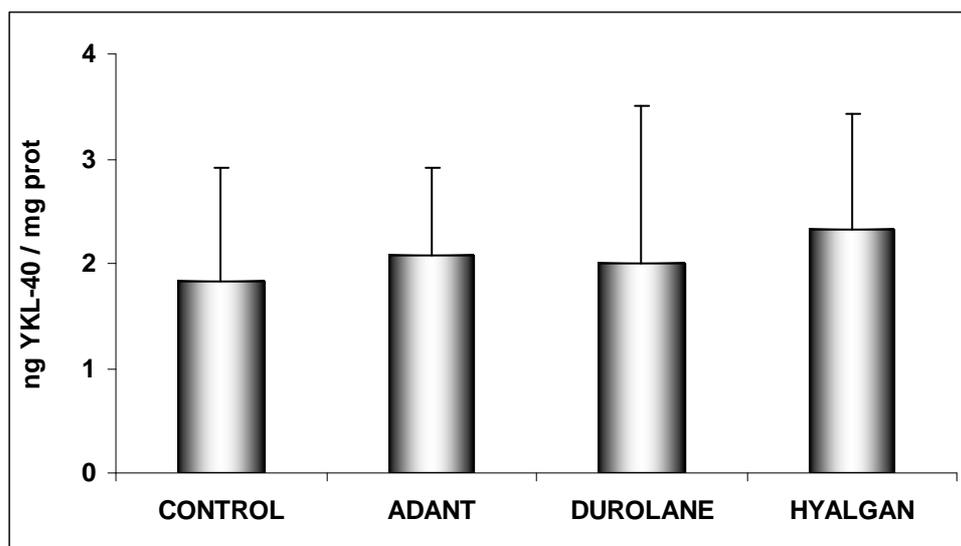


Figura 6. Valores de YKL 40 en los distintos grupos de estudio.

Los resultados se expresan en ng de YKL 40 por mg de proteína. Los resultados del análisis estadístico mediante ANOVA y del test t de Student para muestras independientes, considerando el valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo, no mostraron en ningún caso diferencias entre el grupo Control y los otros 3 grupos de AH del estudio (Anexos VIIIa y VIIIb).

5.6. RESULTADOS DE LOS NIVELES DE MMP-1 Y MMP-9.

Al realizar el estudio de los niveles de MMP's, nos encontramos con varios inconvenientes. En primer lugar al ser el estudio que realizamos en último lugar (tras determinar los niveles de hidroxiprolina y de YKL 40) la cantidad de tejido para analizar fue pequeño. A pesar de este impedimento y siendo conscientes de que los resultados no tendrían tanta validez debido al bajo tamaño muestral de los grupos, que quedo reducido a 3 en cada uno de los grupos, decidimos realizar su estudio buscando la aparición de alguna tendencia en los resultados que pudieran ser la base de futuros estudios en los que nos centraríamos en la determinación específica de estos niveles de MMP's 1 y 9.

En segundo lugar los Kit utilizados para la determinación de los niveles de MMP's 1 y 9 eran específicos para la determinación de MMP's de origen humano, de forma que los Kit poseen un anticuerpo monoclonal antihumano, por lo que al realizar el estudio desconocíamos la capacidad de dichos Kit para la determinación de MMP's de origen no humano como ocurría en este caso donde queríamos identificar MMP's de conejo, por otro lado en el caso de que los Kit fueran capaces de identificar este tipo de MMP's desconocíamos si la sensibilidad para cuantificar sus niveles es la misma que la que los Kit describen para la MMP's de origen humano. La determinación de los niveles de MMP-1 en el grupo control y en el resto de grupos de estudio fue la siguiente (Tabla 24 y Figura 7):

5.6.1. Niveles MMP-1.

MMP-1		
	n	ng MMP1/ mg tejido (Media±DE)
CONTROL	3	0,45 ± 0,03
ADANT®	3	0,54 ± 0,14
DUROLANE®	3	0,28 ± 0,08
HYALGAN®	3	0,67 ± 0,25

Tabla 24. Valores de MMP-1 en los distintos grupos de estudio.

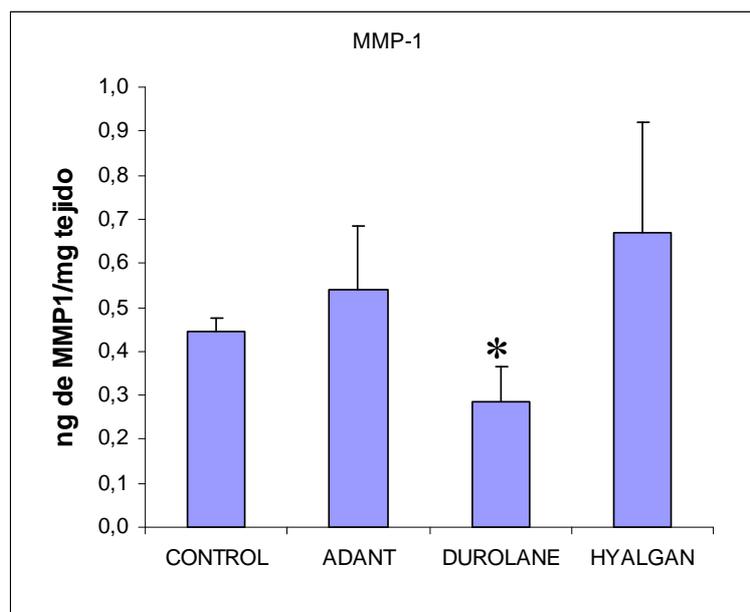


Figura 7. Valores de MMP-1 en los distintos grupos de estudio.

(* Diferencias significativas ($p < 0,05$) con el Grupo Control según el test t de Student)

Los resultados se expresan en ng de MMP-1 por mg de tejido fibroso. No se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de experimentación mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para la cantidad de MMP-1 dentro del tejido fibroso. Sin embargo, al realizar el estudio estadístico mediante un test t de Student, considerando el valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo, encontramos diferencias entre el grupo Control y el grupo Durolane® ($p = 0,033$) con una menor presencia de niveles de MMP-1 en el grupo Durolane® ($0,45 \pm 0,03$ vs $0,28 \pm 0,08$) (Anexos IXa y IXb).

5.6.2. Niveles de MMP-9.

Los valores obtenidos de la determinación de los niveles de MMP-9 en los distintos grupos de estudio fue (Tabla 25 y Figura 8):

MMP-9		
	n	ng MMP9/ mg tejido (Media±DE)
CONTROL	3	1,05 ± 0,68
ADANT®	3	0,95 ± 0,27
DUROLANE®	3	0,73 ± 0,47
HYALGAN®	3	0,75 ± 0,11

Tabla 25. Valores de MMP-9 en los diferentes grupos de estudio.

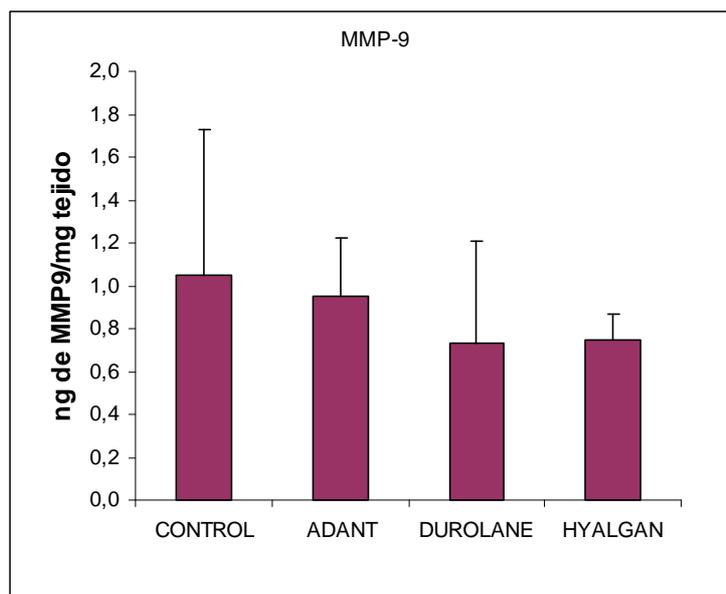


Figura 8. Valores de MMP-9 en los diferentes grupos de estudio.

Los resultados del análisis estadístico mediante ANOVA y del test t de Student para muestras independientes, considerando el valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo, no mostraron en ningún caso diferencias entre el grupo Control y los otros 3 grupos de AH del estudio (Anexos Xa y Xb).

6. DISCUSIÓN.

Debido a la alta prevalencia del dolor lumbar, dorsal y cervical en la población mundial, el estudio de la patología de la columna y de sus opciones de tratamiento tanto conservador como quirúrgico y sus costes, tanto sanitarios: gasto farmacéutico, ingresos hospitalarios, ortesis, etc., como sociales: bajas laborales, incapacidades, etc., ha sido ampliamente realizado en la literatura (Deyo y Tsui-Wu., 1987; Gross y cols., 2006; Kovacs y cols., 2007).

Al realizar la valoración del tratamiento quirúrgico de la patología del raquis se observó la existencia de una serie de pacientes en los que a pesar de un adecuado diagnóstico de su patología, de una correcta técnica quirúrgica y con independencia de la cirugía realizada, ya fuera discectomía, descompresión o fusión vertebral, la evolución de dichos pacientes no era satisfactoria. El empleo de nuevos métodos de diagnóstico por imagen, fundamentalmente la RMN, vino a explicar la posible causa de esta mala evolución, se trataría de la aparición de un tejido cicatricial en la zona quirúrgica que estaría implicado en la mala evolución de estos pacientes (Fager y Freidberg., 1980; Ross y cols., 1996; Abdou y Hardy., 1999; Vogelsang y cols., 1999; Coskun y cols., 2000).

LaRocca y McNabb en el año 1974 sugirieron que el origen de esta fibrosis estaría en la invasión de fibroblastos procedentes de la musculatura lumbar que alcanzarían el espacio epidural creando una membrana en torno a las estructuras neurales. Songer y cols., (1995), afirmaban que esta fibrosis se generaba al sustituirse la grasa epidural, que en condiciones normales se encuentra dentro del canal neural, por hematoma originado en la zona quirúrgica. Al producirse la respuesta reparativa el hematoma, se reabsorbería y sería reemplazado por tejido de granulación el cual contiene fibroblastos que formarían este tejido fibroso cicatricial.

Basándose en estas teorías de la migración de fibroblastos desde la musculatura lumbar y de la producción de una reacción inflamatoria en la zona operada como origen de esta fibrosis epidural, comenzaron los estudios para intentar encontrar algún método o sustancia que fuera capaz de prevenir la aparición de la fibrosis epidural.

A lo largo de los años se han empleado distintos elementos para prevenir la fibrosis epidural como depósitos de grasa sobre la zona quirúrgica, láminas de ácido poliláctico, geles reabsorbibles, etc., que actuarían como una barrera física ante la progresión de los fibroblastos desde el tejido muscular. Del mismo modo compuestos con capacidad anti-

inflamatoria ya sea local o sistémica como los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), interferón gamma, mitomicina C, etc., también han sido empleados en la prevención de la fibrosis epidural (Cabezudo y cols., 1985; Abitbol y cols., 1994; Bora y cols., 2001; Lee y cols., 2004; Sandoval y Hernández-Vaquero., 2008).

A pesar de todas las investigaciones realizadas aún no se ha encontrado la forma ideal de prevenir la aparición de la fibrosis epidural y los efectos perjudiciales asociados a la misma. Desde hace varios años se encuentra en estudio el empleo del ácido hialurónico (AH) como elemento protector ante la fibrosis basado en un doble efecto, en primer lugar el efecto anti-inflamatorio demostrado en otras patologías como al osteoartritis donde se emplea el AH para el tratamiento de la mismas, y por otro lado, debido a sus propiedades físico-químicas actuaría como barrera a la progresión de los fibroblastos (Abantagelo y O'Regan., 1995; Coleman y cols., 1999; Díaz y cols., 2005).

Con el presente trabajo y los estudios que en el se realizan pretendemos añadir información sobre el uso del AH como método de prevención de la fibrosis epidural en un animal de experimentación, en concreto el conejo blanco de Nueva Zelanda, que sirvan como base para futuros estudios clínicos en humanos.

6.1. EL CONEJO COMO MODELO

EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA

FIBROSIS EPIDURAL.

En el estudio de la fibrosis epidural a lo largo de los años se han empleado varios tipos de animales de experimentación.

De manera general los animales de experimentación más empleados han sido perros (Abitbol y cols., 1994), ratas (Massie y cols., 2005; Schimizzi y cols., 2006) y el conejo blanco de Nueva Zelanda (Tsuyoshi y cols., 2005; Tatsui y cols., 2006; Zhao y cols., 2006; Sandoval y Hernández-Vaquero., 2008).

El empleo del conejo blanco de Nueva Zelanda en nuestra opinión presenta ventajas sobre el resto de modelos debido a:

1. El amplio conocimiento sobre la fisiopatología del mismo y su manejo tanto a la hora de realizar las técnicas anestésicas, como de su cuidado durante el periodo de estabulación previo a la cirugía y una vez realizada la misma.
2. El tamaño del animal que permite que la técnica quirúrgica no precise de medios especiales para su realización como microscopio, gafas de aumento, etc.
3. Por la similitud entre la anatomía del conejo y la del humano a nivel lumbosacro; a pesar de que el conejo tiene siete vértebras lumbares y el humano cinco en ambos son plenamente identificables los elementos óseos vertebrales como son: el cuerpo, pedículos, láminas, apófisis espinosas y ligamento amarillo, del mismo modo la musculatura paravertebral lumbar también tiene una importante analogía.

A pesar de estas similitudes entre la anatomía vertebral humana y la del conejo existen una serie de rasgos diferenciadores, la diferencia fundamental se encuentra en que mientras que en el ser humano la médula espinal finaliza a nivel de la duodécima vértebra torácica o la primera vértebra lumbar, en el conejo la médula espinal se extiende hasta la segunda vértebra sacra con lo que su movilización lateral para el acceso al disco intervertebral lumbar, en caso de abordajes posteriores de la columna vertebral, genera en muchas ocasiones lesiones neurológicas severas y permanentes en el conejo.

6.2. PRESENCIA Y PESO DEL TEJIDO FIBROSO INTRACANAL.

No hemos encontrado estudios en la literatura que realicen una determinación directa del peso del tejido fibroso dentro del canal neural como la hemos realizado nosotros, debido posiblemente a que como ocurrió en nuestro examen, la diferenciación entre el tejido fibroso intracanal, el tejido nervioso y la grasa epidural sea difícil de establecer en las distintas muestras y al importante grado de unión entre el tejido fibroso y el neural que dificulta su separación. Del mismo modo podría existir una diferencia de criterio entre los investigadores del estudio a la hora de determinar que es tejido fibroso y que tejido neural. A pesar de todo ello y debido a que en nuestro ensayo la toma de todas las muestras de tejido fibroso del canal neural y la separación entre fibrosis y tejido neural fueron realizadas por un mismo autor, con lo que eliminamos la diferencia inter-observador, decidimos estudiar la existencia de diferencias en cuanto a la cantidad de tejido fibroso dentro del canal neural. El estudio ANOVA realizado para comparar el peso de dicho tejido en los distintos grupos señaló la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos experimentales respecto del grupo control (Tablas 3, 4, 5 y 6 y figura 4). Cuando se realizó un test t de Student entre el grupo control y cada uno de los grupos tratados sólo existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para el grupo Hyalgan®. ($119,49 \pm 23,35$ mg vs. $57,50 \pm 4,63$ mg). El Hyalgan®, se trata del AH de menor peso molecular de los estudiados (Tabla 1); además en dicho grupo fue evidente una mejor y más fácil diferenciación entre el tejido neural y el fibroso posiblemente debido al menor grado de adherencia entre los mismos en comparación con el resto de grupos a estudio (Anexos Ia y Ib).

Estos datos coinciden con los que posteriormente obtuvimos en cuanto al grado de desarrollo de la fibrosis epidural evaluado por RMN. Estableciéndose un resultado paralelo con ambas metodologías. Este resultado coincidente marca una tendencia que tendría que ser estudiada más ampliamente en nuevos estudios con un mayor grupo de animales considerando las diferencias existentes entre los distintos tipos de AH en cuanto a su peso molecular ya que Hyalgan® se puede considerar un AH de bajo peso molecular, Adant® de un peso intermedio y Durolane® de elevado.

A la hora de buscar una posible explicación a estos resultados también es interesante destacar la diferencia entre estos AH en cuanto a su origen. De los tres AH estudiados, Hyalgan® es el único de origen animal, en concreto se obtiene de la cresta de gallo, mientras que los otros dos grupos de AH, Adant® y Durolane®, se obtienen por biofermentación (Tabla 1).

6.3. RMN DE LA COLUMNA LUMBAR

INTERVENIDA.

Con respecto al empleo de RMN para la determinación del grado de fibrosis epidural tras la cirugía raquídea, se trata del método más fiable para el estudio de la misma tanto en los estudios clínicos en humanos como en los realizados en animales de experimentación (Kaiser y Ramos., 1994; Coskum y cols., 2000; Tatsui y cols., 2006).

A pesar de la existencia de estudios de RMN para la determinación de fibrosis epidural en animales de experimentación, el elevado coste de la misma y el pequeño tamaño del animal, en nuestro caso el conejo Nueva Zelanda, que se encuentra en el límite de resolución de estudio de nuestro aparato de RMN, limita en gran medida el uso de esta técnica de imagen a pesar de que es la manera más sensible y fiable de cuantificar la presencia y magnitud de la fibrosis epidural.

Aprovechando la posibilidad que teníamos del uso de un aparato de RMN y siendo conscientes de que nos encontramos en el límite de resolución de nuestro aparato debido al pequeño tamaño del animal de experimentación empleado. Decidimos realizar un doble estudio: en primer lugar, si existía diferencias en la cantidad de fibrosis epidural entre los distintos grupos y en segundo lugar, si se producían diferencias en los niveles de fibrosis epidural a lo largo del tiempo. Con esto pretendíamos descubrir si la fibrosis es un proceso de aparición precoz o tardía en el tiempo y si varía la cantidad de la misma como respuesta adaptativa a su presencia.

A diferencia de los trabajos realizados por Llado y cols., (1999), que divide el canal vertebral en tres segmentos para analizar la extensión de la fibrosis y de Ross y cols., (1998), que divide el canal en cuatro cuadrantes, nos decidimos a subdividir el mismo en 6 segmentos buscando una mayor distinción del grado de extensión de la fibrosis en busca de diferencias entre los distintos grupos (Imagen 33).

La no existencia de diferencias entre el grado de fibrosis epidural al mes y medio y a los tres meses en ninguno de los grupos de estudio nos orienta a pensar que la fibrosis epidural sería un proceso de inicio precoz y relacionado posiblemente con la reacción

inflamatoria inicial (Tablas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15). Estos datos no concuerdan con los aportados por Shih y cols., (2004), que afirman en su estudio sobre prevención de fibrosis epidural también realizado en conejos, una disminución de la cantidad de fibrosis a lo largo del tiempo, en concreto desde el primer al tercer mes de evolución de la cirugía. En este estudio de Shin y cols., (2004), no se especifica el tipo de AH empleado con lo que las discrepancias con nuestros resultados podrían deberse al empleo por su parte de AH de muy elevado peso molecular que podrían influenciar en la evolución de la fibrosis epidural a lo largo del tiempo (Anexos IIa, IIb, IIc, IIIa, IIIb, IIIc, IVa, IVb, IVc y IVd).

Nuestros resultados demuestran que la formación de fibrosis una vez que acontece no sufre importantes modificaciones a lo largo del tiempo ya que no existen diferencias entre el grado de fibrosis aparecido al mes y medio en comparación con la medición realizada a los tres meses de la cirugía en ninguno de los grupos, tanto control como los de los distintos tipos de AH. En los estudios estadísticos realizados comparando el desarrollo de fibrosis inicial, con la fibrosis final en los distintos grupos experimentales se evidenció la no existencia de diferencias significativas (Tablas 15 y 16). Este resultado nos permitió realizar un análisis estadístico conjunto considerando los valores obtenidos en los dos periodos (inicial, al mes y medio de la cirugía y final a los tres meses de la misma) con el objetivo de ampliar el número de muestras y obtener una mayor potencia en el análisis.

Los resultados del análisis estadístico conjunto muestra que el grupo Hyalgan® es el que menor extensión de fibrosis epidural presenta obteniéndose diferencias estadísticamente significativas frente al grupo control al realizar una comparación por pares mediante el test U de Mann-Whitney ($p=0,012$) (Anexos Va, Vb y Vc).

Los resultados obtenidos del estudio del peso del tejido fibroso dentro del canal neural y de imagen, mediante el análisis de las imágenes de RMN, muestran que el Hyalgan® originaría un menor grado de fibrosis en comparación con el resto de AH, aunque estos dos estudios presentan un mayor sesgo de los resultados debido a la diferenciación subjetiva que se realiza entre el tejido neural y el fibroso a la hora de determinar su peso. Del mismo modo el estudio de RMN presenta una gran dificultad para su valoración debido en primer lugar a la limitación técnica debido al pequeño tamaño de nuestro animal de experimentación que se encuentra en el límite de resolución de nuestro aparato de RMN y en segundo lugar a la complejidad de diferenciación entre el tejido

fibroso y el neural, a pesar del empleo de contraste paramagnético, en este caso gadolinio, que realza las zonas fibrosas.

A pesar de todas estas dificultades y como anteriormente se comentó en el caso de los resultados obtenidos de el peso del tejido fibroso dentro del canal neural, el distinto origen del AH Hyalgan® (origen animal) y su ausencia de estabilización, podrían tener influencia en los resultados por lo que sería necesario realizar nuevos y más amplios estudios que confirmen o desestimen esta tendencia que observamos en nuestros resultados.

6.4. NIVELES DE HIDROXIPROLINA.

El empleo de la hidroxiprolina como marcador indirecto del tejido cicatricial que constituye la fibrosis ha sido utilizado en otros estudios previos, al ser la hidroxiprolina el producto de degradación fundamental del tejido fibrótico, compuesto principalmente por colágeno. Nuestros resultados confirman los datos de otros autores sobre el efecto protector del AH frente a la fibrosis, ya que en todos los grupos de estudio disminuyeron los niveles de hidroxiprolina medidos por HPLC en comparación con el grupo control (Abitbol y cols., 1994; Massie y cols., 2005).

El empleo de la hidroxiprolina como marcador indirecto del tejido cicatricial que constituye la fibrosis ha sido utilizado en otros estudios previos (Abitbol y cols., 1994; Topsakal y cols., 2004; Massie y cols., 2005). Nuestros resultados coinciden con los de Topsakal y cols., (2004), en la disminución de la cantidad de hidroxiprolina en la zona de la laminectomía cuando se deposita una sustancia barrera. En su estudio colocaron láminas de Septraflim o de Gore-Tex en la zona de la laminectomía y lo compararon con un grupo control, observando una disminución de los niveles de hidroxiprolina en los dos grupos de estudios en comparación con un grupo control. Del mismo modo Massie y cols., (2005), obtuvieron disminución de los niveles de hidroxiprolina en la zona de laminectomía al utilizar como barrera antifibrótica un AH de elevado peso molecular, atribuyendo esta disminución de los niveles de hidroxiprolina a una reducción de la reacción inflamatoria y al efecto de interposición que realiza el AH impidiendo la migración y proliferación de fibroblastos.

Los resultados de nuestro estudio muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA) con descensos de los niveles de hidroxiprolina de alrededor de un 50% en los grupos experimentales, aunque existe una importante variación entre los grupos como lo demuestran la magnitud de sus desviaciones estándar (Tabla 17). Esta variación es la causa de que cuando se efectúa la comparación de los distintos grupos con el control mediante el test t de Student solo se observen estas diferencias ($p < 0,05$) entre el control y los grupos Adant® y Durolane®. A la luz de los resultados obtenidos (Figura 5) se valida el efecto protector frente a la fibrosis de los tres tipos de AH. Este resultado pone en evidencia que el origen del AH, tampoco tendría influencia sobre la disminución de los

niveles de hidroxiprolina, ya que Durolane® y Adant® son obtenidos por biofermentación, mientras que Hyalgan® procede de la cresta de gallo. Tampoco el hecho de la estabilización que presenta el Durolane® para evitar su degradación y que no poseen los otros dos grupos de AH influiría en la disminución de la cantidad de hidroxiprolina en el tejido fibroso (Anexos VIa y VIb).

6.5. ESTUDIO ANATOMO-PATOLÓGICO.

Los estudios de anatomía patológica han sido utilizados ampliamente para la valoración de la fibrosis epidural y de todas aquellas sustancias que pretende prevenir su formación. Ya en el año 1991 Kitano y cols., realizaron un estudio en conejos sobre la prevención de la fibrosis epidural tras la aplicación de carboximetilcelulosa en la zona lumbar intervenida, observando la disminución de la misma con respecto a un grupo control.

La determinación de la cantidad de fibrosis epidural en la zona quirúrgica intervenida se ha realizado de distinta manera en los diferentes trabajos. Yucesoy y cols., (2000), clasificaron el grado de fibrosis en 4 grados; en el grado 0 la duramadre se encontraría libre de tejido fibroso, en el grado 1 sólo se observaba una delgada banda de tejido fibroso sobre la duramadre, en el grado 2 presentaba una adherencia entre fibrosis y duramadre que ocupaba menos de dos tercios de la zona de laminectomía y en el grado 3 el grado de adhesión era mayor y afectaba a toda la zona de la laminectomía.

En el trabajo realizado por Gerszten y cols., (2000), para estudiar el efecto de bajas dosis de radiación sobre la prevención de la fibrosis epidural en perros, utilizaron otra forma de cuantificar la fibrosis epidural basándose en los trabajos de He y cols., (1995), y Hinton y cols., (1995). Ellos hacen una determinación del número de fibroblastos que aparecen en la fibrosis, estableciendo tres grados: grado 1 cuando existe menos de 100 fibroblastos por 40X campos de magnificación; grado 2 cuando el número de fibroblastos se encuentra entre 100 y 150; y grado 3 cuando existen más de 150 fibroblastos.

Nos decidimos por el método de Gerszten y cols., (2000), para la determinación anatomo-patológica de la fibrosis epidural y tras el estudio estadístico mediante el test de Kruskal-Wallis para la comparación de los 4 grupos de estudio y una U de Mann-Whitney para la comparación por pares de cada uno de los grupos de estudio, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo Control y los grupos con tratamiento de Adant®, Durolane® e Hyalgan® (Tablas 18, 19, 20, 21 y 22) (Anexos VIIa, VIIb y VIIc).

Sobre las hipótesis para justificar el efecto protector del AH sobre la generación de fibrosis epidural podemos realizar las siguientes consideraciones:

La primera sería el efecto barrera que el AH crea entre los músculos erectores del raquis y la zona de la laminectomía, evitando que los fibroblastos migrados desde esta musculatura se depositen sobre el tejido neural conformándose la fibrosis epidural. El AH debido a su viscosidad dificultaría la migración de los fibroblastos sobre todo en las primeras horas postintervención (debido a la vida media que presenta el AH). Al dificultarse el movimiento de los fibroblastos, la presencia de los mismos en la zona de la laminectomía sería menor y debido a ello también disminuiría la cantidad de fibrosis epidural.

En segundo lugar y basándonos en que la fibrosis epidural forma parte y se produce por una reacción inflamatoria, el AH tiene un efecto anti-inflamatorio como demuestra su utilización en los procesos osteoartrosicos articulares en los que se produce una importante reacción inflamatoria. La presencia de el AH en la zona de la agresión quirúrgica implicaría una disminución de la reacción inflamatoria al influir en la regulación de la migración extracelular de las células inflamatorias como son los monocitos y macrófagos con lo que la producción de fibrosis estaría disminuida en presencia del AH (Schiller y cols., 2003; Agerup y cols., 2005; Girish y Kemparaju., 2007).

La disminución de la fibrosis epidural en los tres grupos de estudio de AH con respecto al grupo control, con independencia del peso molecular que presente el AH, nos demuestra que el papel protector ante la fibrosis epidural no estaría marcado por el peso molecular que presente el AH, siendo este papel protector un efecto genérico de todos los tipos de AH con independencia de su peso molecular, origen animal o por biofermentación o su grado de estabilización.

6.6. YKL 40.

Esta proteína llamada también glicoproteína del cartílago humano 39 (HCgp-39) ha sido muy estudiada dentro del campo de la medicina y es un marcador de multitud de patologías en las que existe un elevado recambio celular y/o procesos inflamatorios. Es segregada por distintos tipos de células como macrófagos, neutrófilos, condrocitos, fibroblastos, endotelio y células tumorales.

Los estudios de Roslind y Johansen., (2009), destacan la influencia de la YKL 40 como un marcador de peor pronóstico en ciertos tipos de tumores neurológicos como el glioblastoma debido al importante recambio celular que existe en los mismo. Dentro del campo de la osteoartritis, Zivanovic y cols., (2009), relacionaron elevados niveles de YKL 40 con estadios más avanzados de la enfermedad y mayor grado de destrucción del cartílago articular.

Otros importante campo de estudio de la YKL 40 es el asma bronquial que se caracteriza por una reacción inflamatoria y remodelado del tejido de la vía aérea y por tanto la YKL 40 se esta empleando como marcador para identificar pacientes con dicha enfermedad y su grado de afectación (Chupp y cols., 2007; Letuve y cols., 2008; Hartl y cols., 2009).

En el estudio y seguimiento de la hepatitis y cirrosis hepática ya sea vírica o tóxica también tenemos estudios donde se encuentra implicada la YKL 40. En el trabajo de Metha y cols., (2008), se intenta su empleo como un marcador no invasivo y por tanto alternativa a la biopsia hepática, en el caso de la fibrosis secundaria al virus de la hepatitis C.

Basándonos en esta elevación de los niveles de YKL 40 que se produce en las reacciones inflamatorias como la que ocurre en la fibrosis epidural nos decidimos a estudiar sus niveles en el tejido fibroso epidural en busca de diferencias entre los grupos. Los análisis estadísticos realizados ANOVA y test t de Student, descartaron la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de estudio y el grupo control. La explicación de este resultado podría ser que la reacción inflamatoria a nivel de la zona quirúrgica es muy pequeña, si la comparamos con el grado de inflamación que

ocurre en grandes órganos como son el hígado y el pulmón en los casos de la cirrosis y el asma bronquial (Chupp y cols., 2007; Letuve y cols., 2008; Metha y cols., 2008).

Nuestra medición de los niveles de YKL 40 se realizó en el momento final del estudio, a los tres meses de la cirugía. Como han demostrado nuestros resultados del estudio de RNM, la fibrosis epidural parece ser un proceso de aparición precoz, que acontece a los pocos días o semanas de la cirugía, momento en el que se origina la reacción reparativa ante la agresión quirúrgica, al realizar la medición a los tres meses de la cirugía, el proceso reparativo estaría finalizado y del mismo modo la reacción inflamatoria habría desaparecido o al menos disminuído, por lo que no encontramos diferencias en los niveles de YKL 40 entre los distintos tipos de AH y el grupo control, ni entre los distintos tipos de AH entre sí (Tabla 23 y Figura 6) (Anexos VIIIa y VIIIb).

Basándonos en estos resultados nos planteamos en un futuro la realización de nuevos estudios en los que la medición de los niveles de YKL 40 se realice en las primeras horas o días tras la cirugía, momento de máxima reacción inflamatoria, en la que los niveles de YKL 40 se encontrarían más elevados y podríamos encontrar diferencias entre sus niveles en la comparación de un grupo control y de distintos tipos de AH.

6.7. METALOPROTEASAS 1 Y 9.

Los distintos organismos se encuentran constituidos básicamente por las células y una matriz extracelular que se sitúa entre ellas, la degradación de esta matriz es fundamental en el remodelado del tejido conectivo tanto en procesos fisiológicos como patológicos.

La regulación de la constitución y degradación de la matriz extracelular se encuentra en un constante equilibrio en condiciones fisiológicas, siendo las metaloproteasas (MMP's) las proteínas que se encargan de la degradación de la matriz, por lo que las alteraciones en los niveles de MMP's se producirían en todos los estados donde acontece una alteración de la matriz extracelular ya sea fisiológica como ocurre en el proceso reparativo normal, en el que existe una elevación proteolítica extracelular, como en condiciones patológicas (inflamación, tumores, artrosis, etc.).

El papel de las metaloproteasas ha sido estudiado dentro del campo de la oncología, ya que los tumores se van a caracterizar por la capacidad infiltrativa del tejido cercano, para ello es necesaria la degradación de la matriz extracelular, misión que realizan las MMP's. Fisher y cols., (2004), estudiaron la influencia de las MMP's en la progresión tumoral y su influencia en la invasión del sitio de crecimiento primario, lisis de la membrana basal e invasión del sitio de la metástasis.

Las metaloproteasas también se encuentran implicadas en la evolución de la osteoartritis donde la degradación de la matriz del cartílago articular debido a la reacción inflamatoria existente se encuentra regulada por las metaloproteasas como ponen de manifiesto los estudios de Chamber y cols., (2001), y posteriormente Nagase y Kashiwagi., (2003).

El trabajo de Séguin y cols., (2008), estudia la influencia de las MMP's en la degeneración del disco intervertebral ya que la funcionalidad del mismo depende de la composición de su matriz extracelular, demostrando la presencia de niveles elevados de MMP's 1, 2, 3, 7, 8, 9 y 13 y su influencia en la reacción de degeneración del mismo.

En nuestro estudio intentamos determinar la presencia de valores elevados de MMP-1 y 9. Estas dos MMP's a pesar de pertenecer a dos grupos diferentes, la MMP-1 es una colagenasa y la MMP-9 una gelatinasa, son liberadas por los fibroblastos como los que existen a nivel del tejido fibroso cicatricial, en el cual está aconteciendo una reacción inflamatoria con una importante remodelación de la matriz extracelular (Seguin y cols., 2008).

Antes de discutir los resultados obtenidos hemos de señalar las dificultades ya señaladas en el capítulo de resultados con respecto al número de muestras y a la determinación analítica de las MMP's. A pesar de estas limitaciones de tipo técnico realizamos la determinación tanto de los niveles de MMP-1 y de MMP-9. (Tablas 24 y 25 y Figuras 7 y 8).

En el caso de la MMP-1 tras realizar el estudio estadístico mediante el ANOVA (Newman-Keuls) (Anexos IXa y IXb) no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos, sin embargo el test t de Student proporcionó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el grupo control y el Durolane® ($0,45 \pm 0,03$ vs. $0,28 \pm 0,08$ ngMMP-1/mg tejido). El Durolane® que se trata del AH de mayor peso molecular, presenta los menores valores MMP-1. Estos datos estarían en consonancia con el trabajo de Schimizzì y cols., (2006), en los que comprobaron que el AH de alto peso molecular disminuiría la proliferación de los factores inflamatorios como son la interleucina 1 beta y la interleucina 6 y la proliferación de los monocitos y macrófagos (que se considera una de las más importantes células inflamatorias) tras realizar una laminectomía en ratas y estudiar el tejido y la reacción inflamatoria que se producía en dicha zona. Según su trabajo los AH de bajo peso molecular inducirían la migración y proliferación celular en la zona inflamatoria, mientras que los AH de alto peso molecular actuarían de forma contraria, ya que serían anti-fibróticos y anti-angiogénicos. Considerando las MMP-1 como parte de esta respuesta inflamatoria los menores valores de MMP-1 en el grupo Durolane®, que se trata del AH de mayor peso molecular de los tres estudiados, apoyarían los datos de Schimizzì y cols., (2006). Este resultado pone de manifiesto la importancia de que en posteriores estudios, se contemple el papel de la estabilización que presenta este tipo de AH, y que no presentan los otros dos tipos de AH valorados.

Al determinar los niveles de MMP-9 nos encontramos con los mismos problemas que en el caso de la MMP-1, en lo referido en la sensibilidad y especificidad de los Kit. Del mismo modo que ocurría con la MMP-1 en la MMP-9 tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de estudio al realizar el estudio estadístico mediante el test Newman-Keuls. Pero a diferencia de lo ocurrido con la MMP-1, con la MMP-9 existía una mayor concordancia con los datos que habíamos encontrado al estudiar el de peso de las muestras y las imágenes de RMM, en los que el grupo Hyalgan® parecía tener una menor tasa de fibrosis epidural considerando como menor presencia de fibrosis epidural una menor proporción o actividad de MMP-9 (Anexos Xa y Xb).

La diferencia entre los resultados de la determinación de MMP-1 y MMP-9 podrían ser explicados por ser dos MMP's que pertenecen a dos grupos diferentes a pesar de que ambas son liberadas por los fibroblastos.

Otro dato a tener en cuenta, es que la determinación de los niveles de MMP-1 y 9 las realizamos al final del estudio, es decir a los tres meses de la cirugía. Tanto los trabajos de Schimizzi y cols., (2006), como los de Kato y cols., (2005), consideran que la fibrosis se originaría en los primeros momentos tras la agresión quirúrgica momento en el que se desarrolla la reacción inflamatoria y en los que la modificación de la matriz extracelular es máxima y posteriormente, según pasa el tiempo esta reacción inflamatoria y cicatricial se estabilizaría, como confirma el trabajo de Shin y cols., (2004). Al realizar el estudio de las MMP's a los tres meses la modificación de la matriz extracelular se encontraría muy disminuida por lo que los niveles de MMP's serían mucho menores, siendo necesario realizar estudios de los niveles de MMP's en las horas o días posteriores a la cirugía, momentos en los que la reacción inflamatoria es máxima y podrían existir mayores modificaciones en los niveles de las MMP's.

Por último considerar, en función de los resultados obtenidos, la validez de los Kit empleados para el análisis de las MMP-1 y 9 en conejo a pesar de ser Kit que emplean anticuerpos específicos para el estudio en humanos.

7. CONCLUSIONES.

PRIMERA: El conejo es un buen modelo experimental para el estudio de la fibrosis epidural por su similitud anatómica con el humano y por la generación de fibrosis que ocurre en su tejido peridural tras la cirugía del raquis, por lo que este modelo experimental puede ser la base para nuevos y futuros estudios en humanos.

SEGUNDA: Se ha demostrado que el ácido hialurónico es un elemento protector de la fibrosis epidural, según los resultados positivos obtenidos del estudio de los valores de hidroxiprolina en el tejido epidural postquirúrgico y de las determinaciones anatómo-patológicas en cuanto al número de fibroblastos que presenta el tejido fibroso epidural.

TERCERA: Dentro de los distintos tipos de AH en nuestro estudio, el de menor peso molecular, en este caso Hyalgan®, es el que tendría un mayor efecto protector considerando las diferencias estadísticas obtenidas en el estudio del peso de tejido fibroso dentro del canal neural y de RMN, estableciendo una tendencia de mayor protección frente a los AH de intermedio y alto peso molecular que tendrá que ser confirmada en estudios posteriores.

CUARTA: La fibrosis epidural es un proceso de inicio precoz y que se estabiliza a lo largo del tiempo tras la agresión quirúrgica, como demuestra el estudio de RMN en el que no existen variaciones en la extensión de la fibrosis en los estudios al mes y medio y a los tres meses de la cirugía, por lo que todas aquellas medidas encaminadas a prevenir la fibrosis epidural deben actuar en la fase inicial de la reacción inflamatoria y reparativa que se produce tras la cirugía.

QUINTA: La ausencia de complicaciones, como infecciones de la zona quirúrgica, hematomas epidurales o problemas compresivos medulares debido a la interposición del ácido hialurónico entre el tejido neural y muscular, relacionadas con el uso de los distintos ácidos hialurónicos nos indica que nos encontramos ante una sustancia, que como era conocido por su uso en otras serie de estructuras orgánicas como el nivel articular, no genera ninguna reacción de cuerpo extraño por parte del organismo y es bien tolerada por lo que su uso no generaría otra serie de complicaciones a nivel de la propia estructura neural o de otras regiones próximas.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Abantangelo G, O'Regan M. **Hyaluran: Biological Role and function in Articular Joints.** Eur J Rheumatol Inflamm. 1995; 15(1):9-16.

Abdou MS, Hardy RW. **Epidural fibrosis and failed back syndrome: history and physical findings.** Neurol Res. 1999; 21(S1):55-58.

Abitbol JJ, Lincoln TL, Lind BI, Amiel D, Aleson WH, Garfin SR. **Preventing postlaminectomy adhesión. A new experimental model.** Spine. 1994; 19(16):1809-1814.

Ågerup B, Berg P, Åkermark, C. **Non-animal stabilized hyaluronic acid. A new formulation for the treatment of osteoarthritis.** BioDrugs. 2005; 19:23-30.

Akeson W, Massie J, Huang B, Giurea A, Sah R, Garfio S, Kim C. **Topical high molecular weight hyaluronan and a roofing barrier sheet equally inhibit postlaminectomy fibrosis.** The Spine J. 2005; 5:180-190.

Alkakay RN, Kim DH, Urry DW, Xu J, Parker TM, Glazer PA. **Prevention of postlaminectomy epidural fibrosis using bioelastic materials.** Spine. 2003; 28(15):1659-1665.

Almond A. **Visions & Reflections (Minireview). Hyaluronan.** Cell Mol Life Sci. 2007; 64:1591-1596.

Almond A, DeAngelis PL, Blundell CD. **Hyaluronan: the local solution conformation determined by NMR and computer modeling is close to a contracted left-handed 4-fold helix.** J Mol Biol. 2006; 358:1256–1269.

Annertz M, Jonsson B, Stromqvist B, Holtas S. **No relationship between epidural fibrosis and sciatica in the lumbar postdiscectomy syndrome. A study with contrast-enhanced magnetic resonance imaging in symptomatic and asymptomatic patients.** Spine. 1995; 20:449-453.

Asch HL, Lewis PJ, Moreland DB, Egnatchik JG, Clabeaux DE, Hyland AH. **Prospective multiple out-comes study of outpatient lumbar microdiscectomy: should 75 to 80% success rates be the norm?.** J Neurosurg. 2002; 96(I suppl):34.

Atlas SJ, Deyo RA, Keller RB, Chapin AM, Patrick DL, Long JM, Singer DE. **The Maine Lumbar Spine Study, Part II. 1-year otucomes of surgical and nonsurgical management of lumbar spinal stenosis.** Spine 1996a; 21(15):1777-1786

Atlas SJ, Deyo RA, Keller RB, Chapin AM, Patrick DL, Long JM, Singer DE. **The Maine Lumbar Spine Study, Part III. 1-year outcomes of surgical and nonsurgical management of lumbar spinal stenosis.** Spine. 1996b; 21(15):1787-1794.

Atlas SJ, Keller RB, Chang Y, Deyo RA, Singer DE. **Surgical and nonsurgical management of sciatica secondary to a lumbar disc herniation: five-years outcomes from the Maine Lumbar Spine Study.** Spine. 2001; 26(10):1179-1187.

Balazs EA, Denlinger JL. **Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis.** J Rheumatol Suppl. 1993; 39:3-9.

Balazs EA, Watson D, Duff IF, Roseman S. **Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritis human fluids.** Arthritis Rheum. 1967; 10:357-376.

Blundell CD, DeAngelis PL, Almond A. **Hyaluronan: the absence of amide-carboxylate hydrogen bonds and the chain conformation in aqueous solution are incompatible with stable secondary and tertiary structure models.** Biochem J. 2006; 396:487-498.

Bora H, Aykol SV, Akyurek N, Akmansu M, Ataoglu O. **Inhibition of epidural scar tissue formation after spinal surgery: external irradiation vs. spinal membrane application.** Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001; 51(2):507-513.

Brandimarte F. **Hyaluronic acid in periodontopathies.** Minerva Stomatol. 1973; 17:140-156.

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. **Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.** Biochim Biophys Acta. 2000; (1-2):267-283.

Brodsky B, Persikov AV. **Molecular structure of the collagen triple helix.** Adv Protein Chem. 2005; 70:301-339.

Brzezicki G, Jankowski R, Blok T, Szymas J, Huber J, Szukala A, Nowak S, Borejsza-Wysocki M. **Evaluation of epidural scar formation in lumbar spine after TachoComb application an experimental study.** Neurol Neurochir Pol. 2008; 42(3):223-230.

Burton CV, Kinkakdy-Willis WH, Young-Hing K, Helthaff KB. **Causes of fallure of surgery on the lumbar spine.** Clin Orthop. 1981; 157:191-199.

Cano C, Rodríguez J, García G, Juliá J, Marante J. **Fisiopatología de la degeneración y del dolor de la columna lumbar.** Rev Ortop Traumatol. 2008; 52(1):37-46.

Cabezudo JM, López A, Bacci F. **Symptomatic root compression by a free fat transplant after hemilaminectomy.** J Neurosurg. 1985; 63:633-635.

Casalino-Matsuda SM, Monzón ME, Day AJ, Forteza RM. **Hyaluronan fragments/CD44 mediate oxidative stress-induced MUC5B up-regulation in airway epithelium.** Am J Respir Cell Mol Biol. 2009; 40:277-285.

Chambers MG, Cox L, Chong L, Suri N, Cover P, Bayliss MT, Mason RM. **Matrix metalloproteinase and aggrecanases cleave aggrecan in different zones of normal cartilage but colocalize in the development of osteoarthritic lesions in STR/ort mice.** Arthritis Rheum. 2001; 44:1455-1465.

Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P, Cullen M, Grandsaigne M, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M, Elias JA. **A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma.** N Engl J Med. 2007; 357(20):2016-2027.

Cohen D. **Tumores de la columna vertebral.** En Orthopaedic Knowledge Update. Editado por American Academy of Orthopaedic Surgeons, Illinois, EEUU. 2004; 636-650.

Coleman PJ, Scott Da, Mason RM, Levick JR. **Characterization of the effect of high molecular weight hyaluronan on trans-synovial flow in rabbit knees.** J Physiol. 1999; 514(1):265-282.

Coskun E, Suzer T, Topuz O, Zencir M, Pakdemirli E, Tahta K. **Relationships between epidural fibrosis, pain, disability, and psychological factors after lumbar disc surgery.** Eur Spine J. 2000; 9(3):218-223.

Coskun U, Yamac D, Gulbabar O, Sandak B, Karaman N, Ozkan S. **Locally advanced breast carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy: are the changes in serum levels of YKL-40, MMP-2 and MMP-9 correlated with tumor response?.** Neoplasma. 2007; 54(4):348-352.

Cowman MK, Matsuoka S. **Experimental approaches to hyaluronan structure.** Carbohydr Res. 2005; 340:791-809.

Dagenais S, Caro J, Haldeman S. **A systematic review of low back pain cost of illness studies in the United States and internationally.** Spine J. 2008; 8(1):8-20.

Denis F. **Spinal instability as defined by the three-column spine concept in acute spinal trauma.** Clin Orthop. 1984; 189:65-76.

Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF. **Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage.** J Clin Invest. 1989; 84(2):678-685.

De Pedro JA, Pérez-Ochagavía F, Dominguez J, Amigo L, Martín P, Blanco J. **Evaluación clínico-radiológica de la sustitución protésica del disco intervertebral lumbar.** En libro del XVI Congreso Nacional de la Sociedad para el Estudio de la Enfermedades del Raquis (GEER). Madrid, España. 2002; 44-45.

De Pedro JA, Blanco J, Pérez-Ochagavía F, González-Orús, Álvarez A, Pérez-Caballar A. **Espondilosis lumbar: concepto y clasificación.** Rev Ortop Traumatol. 2004; 48 (Supl.3):5-12.

Deyo RA, Tsui-Wu YJ. **Descriptive epidemiology of low-back pain and its related medical care in the United States.** Spine. 1987; 12:264-268.

Deyo RA, Battle M, Beurskens AJ, Bombardier C, Croft P, Koes B, Malmivaara A, Roland M, Von Korff M, Waddell G. **Outcome measures for low back pain research.** Spine. 1998; 23:2003-2013.

Díaz L, Prieto JG, Coronel P, Gamazo LE, Gimeno M, Alvarez AI. **Apoptosis and nitric oxide in an experimental model of osteoarthritis in rabbit after hyaluronic acid treatment.** J Orthop Res. 2005; 23(6):1370-1376.

Dimberg L, Olafsson A, Stefansson E, Aagaard H, Odén A, Andersson GB, Hansson T, Hagert CG. **The correlation between work environment and the occurrence of cervicobrachial symptoms.** J Occup Med. 1989; 31:447-453.

Dziewiatkowski DD, Hascall VC, Riolo RL. **Epimerization of trans-4-Hydroxy-L-proline to cis-4-Hydroxy-D-proline during Acid Hydrolysis of Collagen.** Anal Biomed. 1972; 49:550-558.

Emmez H, Kardes O, Dogulu F, Kurt G, Memis L, Baykaner MK. **Role of antifibrotic cytokine interferon-gamma in the prevention of postlaminectomy peridural fibrosis in rats.** Neurosurgery. 2008; 62(6):1351-1357.

Fager CA, Freidberg SR. **Analysis of failures and poor results of lumbar spine surgery.** Spine. 1980; 5:87-94.

Fernández-Irueñas JA. En **Lumbociática de origen degenerativo. Su tratamiento actual.** Editado por Jarpio, Madrid, España. 1993.

Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzlod G, Poorman R, Mitchell MA. **Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro.** Dev Biol. 1994; 162:499-510.

Fischgrund JS. **The argument for instrumented decompressive posterolateral fusion for patients with degenerative spondylolisthesis and spinal stenosis.** Spine. 2004; 29:173-174.

Flugge LA, Miller-Deist LA, Petillo PA. **Towards a molecular understanding of arthritis.** Chem Biol. 1999; 6:R157–R166.

Forriol F. En **El hueso como tejido y como órgano. Ciencias básicas aplicadas a la cirugía ortopédica.** Editado por Fundación SECOT, Madrid, España, 1999.

Frager CA, Freidberg SR. **Analysis of failures and poor results of lumbar spine surgery.** Spine 1980; 5:87-94.

Freije J, Diez-Itza I, Balbin M, Sánchez LM, Blasco R, Tolivia J, López-Otín C. **Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas.** J Biol Chem. 1994; 266:16766-16773.

Gerszten PC, Moossy JJ, Flickinger JC, Gerszten K, Kalend A, Martínez AJ. **Inhibition of peridural fibrosis after laminectomy using low-dose external beam radiation in a dog model.** Neurosurgery. 2000; 46(6):1478-1485.

Gilles C, Polette M, Coraux C, Tournier JM, Meneguzzi G, Munaut C, Volders L, Rousselle P, Birembaut P, Foidart JM. **Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5 gamma2 chain degradation to mammary epithelial cell migration.** J Cell Sci. 2001; 114(pt 16):2967-2976.

Girish KS, Kemparaju K. **The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview.** Life Sci. 2007; 80:1921-1943.

González MA, Condón MJ. **Disability from low back pain in Spain.** Med Clin. 2000; 114(13):491-492.

Grabois M. **Management of chronic low back pain.** Am J Phys Med Rehabil. 2005; 84(Suppl):S29-S41.

Grane P, Tullberg T, Rydberg J, Lindgren L. **Postoperative lumbar MR imaging with contrast enhancement. Comparison between symptomatic and asymptomatic patients.** Acta Radiol. 1996; 37:366-372.

Gribbon P, Heng B, Hardingham TE. **The analysis of intermolecular interactions in concentrated hyaluronan solutions suggest no evidence for chain-chain association.** Biochem J. 2000; 249:329-335.

Gross D, Ferrari R, Russell A, Battié M, Schopflocher D, Hu R, Waddell G, Buchbinder R. **A population-based survey of back pain beliefs in Canada.** Spine. 2006; 31:2142-2145.

Gura E, Hüchel M, Müller PJ. **Specific degradation of rheological hyaluronic acid and its properties.** Polym Degrad Stabil. 1998; 59:297-302.

Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen Y, Ding Y, Sutinen M, Visser H, Van Hinsbergh V, Helaakoski T, Kainulainen T, Rönkä H, Tschesche H, Salo T. **Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblast and endothelial cells.** J Biol Chem. 1997; 272(50):31504-31509.

Hartl D, Lee CG, Da Silva CA, Chupp GL, Elias JA. **Novel biomarkers in asthma: chemokines and chitinase-like proteins.** Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2009; 9(1):60-66.

He Y, Revel M, Loty B. **A quantitative model of post-laminectomy scar formation. Effects of a nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** Spine. 1995; 20(5):557-563.

Heldin P, Karousou E, Bernert B, Porsch H, Nishitsuka K, Skandalis SS. **Importance of HA-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis.** Connect Tissue Res. 2008; 49:215-218.

Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. **Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response.** Am J Pathol. 1996; 149(1):272-282.

Herculano MA, Tella OI, Prandini MN, Seixas MT. **Inhibition of peridural fibrosis after laminectomy using biological sheet in rat model.** Arq Neuropsiquiatr. 2006; 64:259-63.

Hernández D, Rubio A, Romo I, Amigo A, Domínguez I. **La fibrosis peridural como complicación de la discectomía quirúrgica.** Rev Ortop Traumatol. 1990; 34:372-376.

Hernández-Pérez PA. **Síndrome de fracaso de la cirugía espinal lumbar.** Rev Soc Esp Dolor. 2007; 6:437-446.

Herrera A, Canales V, Pedguero A. **Tratamiento de los tumores óseos.** En actualizaciones en Cirugía Ortopédica y Traumatología. Editado por fundación SECOT. Madrid. España. 1999.

Hieb LD, Stevens DL. **Spontaneous postoperative cerebrospinal fluid leaks following application of anti-adhesion barrier gel: case report and review of the literatura.** Spine. 2001; 26:748-751.

Hinton J, Warejcka D, Mei Y, McLendon R, Laurencin C, Lucas P, Robinson JS. **Inhibition of peridural scar formation after lumbar laminectomy in the rat.** Spine. 1995; 20(5):564-570.

Huefthe MG, Modic MT, Ross JS, Masaryk TJ, Carter JR, Wilber RG, Bohlman HH, Steinberg PM, Delamarter RB. **Lumbar spine: postoperative MR imaging with Gd-DTPA.** Radiology. 1988; 167:817-824.

Hurme M, Katevou K, Nykvist F, Aalto T, Alaranta H, Einola S. **CT five years after myelographic diagnosis of lumbar disc herniation.** Acta Radiol. 1991; 32:286.

Hutson PR, Crawford ME, Sorkness RL. **Liquid chromatographic determination of hydroxyproline in tissue simples.** J Chromat B. 2003; 791:427-430.

Impola U, Uitto VJ, Hietanen J, Hakkinen L, Zhan L, Larjava HS, Isaka K, Saarialho-Kore U. **Differential expression on Matrilysin-1 (MMP-27), 92KD gelatinase (MMP-9) and Metalloelastase (MMP-12) in oral verrocous and squamous cell cancer.** J Pathol. 2004; 202:14-22.

Jinkins JR, Osbom AG, Garret D, Hunt S, Story JL. **Spinal nerve enhancement with Gd-DTPA: MR correlation with the postoperative lumbosacral spine.** AJNR. 1993; 14:383-394.

Johansen JS, Bojesen SE, Mylin AK, Frikke-Schmidt R, Price PA, Nordestgaard BG. **Elevated plasma YKL-40 predicst increased risk of gastrointestinal cancer and decreased survival after any cancer diagnosis in the general population.** J Clin Oncol. 2009; 27(4):572-578.

Johansson N, Alo-aho R, Uitto VJ, Grénman R, Fusenig N, López-Otín C, Kähäri VM. **Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed**

keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. J Cell Sci. 2000; 113:227-235.

Kaiser M, Ramos L. En **RMN de la columna vertebral. Guía para las aplicaciones clínicas.** Editado por Ancora, Barcelona, España. 1992.

Takehi K, Kinoshita M, Yasueda S. **Hyaluronic acid: separation and biological implications.** J Chromatogr B. 2003; 797:347–355.

Kato T, Haro H, Komori H, Shinomiya K. **Evaluation of hyaluronic acid sheet for the prevention of postlaminectomy adhesions.** The Spine Journal. 2005; 5:479-488.

Kemaloglu S, Ozkan U, Yilmaz F, Nas K, Gur A, Acemoglu H, Karasu H, Cakmak E. **Prevention of spinal epidural fibrosis by recombinant tissue plasminogen activator in rats.** Spinal Cord. 2003; 41(8):427-431.

Kimm SS, Michelsen CB. **Revision surgery for failed back surgery syndrome.** Spine. 1992; 61:957-960.

Kitano T, Zerwekh JE, Edwards ML, Usui Y, Allen MD. **Viscous carboxymethylcellulose in the prevention of epidural scar formation.** Spine. 1991; 16:820-823.

Kong WZ, Goel VK, Gilberston LG, Weinstein JN. **Effects of muscle dysfunction on lumbar spine mechanics. A finite element study based on a two motion segments model.** Spine. 1996; 21:2197-2207.

Kovacs F, Abaira V, Cano A, Royuela A, Gil del Real MT, Gestoso M, Mufraggi N, Muriel A, Zamora J. **Fear avoidance beliefs do not influence disability and quality of life in Spanish elderly subjects with low back pain.** Spine. 2007; 32(19):2133-2138.

Kulkarni V, Massie J, Zauner F, Murphy M, Akeson W. **Novel biomechanical quantification methodology for lumbar intraforaminal spinal nerve adhesion in a laminectomy and disc injury rat model.** J Neurosci Methods. 2007; 166:20-23.

Kurt G, Celik B, Cemil B, Dogulu F, Baykaner MK, Ceviker N. **A comparison of the effectiveness of waxed paper and gore-tex on the minimally invasive epidural fibrosis model.** J Spinal Disord Tech. 2009; 22(1):29-51.

LaRocca H, MacNab I. **The laminectomy membrane: studies in its evaluation, characteristics, effects and prophylaxis in dogs.** J Bone Joint Surg Br. 1974; 56B:545-550.

Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. **Serum hyaluronan as a disease marker.** *Ann Med.* 1998; 28:241-253.

Ledlie JT, Renfro MB. **Kyphoplasty treatment of vertebral fractures: 2-year outcomes show sustained benefits.** *Spine.* 2006; 31(1):57-64.

Lee JK, Stenzel W, Ebel H, Wedekind C, Ernestus RI, Klug N. **Mitomycin C in prevention spinal epidural fibrosis in a laminectomy model in rats.** *J Neurosurg.* 2004; 100(1Suppl Spine):52-55.

Leeuw M, Houben R, Severeijns R, Picavet H, Schouten E, Vlaeyen J. **Pain-related fear in low back pain: a prospective study in the general population.** *Eur J Pain.* 2007; 11:256-266.

Lepperdinger G, Fehrer C, Reitinger S. **Chapter 4: Biodegradation of hyaluronan.** En *Chemistry and biology of hyaluronan.* Editado por Elsevier Ltd, Amsterdam, The Netherlands. 2004; 71-82.

Letuve S, Kozhich A, Arouche N, Grandsaigne M, Reed J, Dombret MC, Kiener PA, Aubier M, Coyle AJ, Pretolani M. **YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages.** *J Immunol.* 2008; 181(7):5167-5173.

Liu LM, Song YM, Duan H, Ding YL, Lu B. **Effect of polylactic acid glue in preventing scar adhesion after laminectomy in rabbits.** *Chin J Traumatol.* 2006; 9(3):146-151.

Llado A, Sologaistua E, Quimera J, Marin M. **Expanded polytetrafluoroethylene membrane for the prevention of peridural fibrosis after spinal surgery: a clinical study.** *Eur Spine J.* 1999; 8:144-150.

Main CJ. **The Multiple Somatic Perception Questionnaire (MSPQ).** *J Psychosom Res.* 1983; 27:503-551.

Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP. **Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.** *Lab Invest.* 1994; 70(6):807-815.

Massie J, Schimizzi A, Huang B, Kim C, Garfin S, Akeson W. **Topical high molecular weight hyaluronan reduces radicular pain post laminectomy in a rat model.** *The Spine J.* 2005; 5:494-502.

Mast BA, Haynes JH, Kummel TM, Diegelman RF, Cohen K. **In vivo degradation of fetal wound hyaluronic acid results in increased fibroplasia, collagen deposition, and neovascularization.** *Plast Reconstr Surg.* 1992; 89(3):503-509.

Mastronardi L, Pappagallo M, Tatta C, Roperto R, El Sawaf A, Ferrante L. **Prevention of postoperative pain and of epidural fibrosis after lumbar microdiscectomy: pilot study in a series of forty cases treated with epidural vaseline-sterile-oil-morphine compound.** *Spine.* 2008; 33:1562-1566.

Matsumoto S, Kobayashi T, Katoh M, Saito S, Ikeda Y, Kobori M, Masuho Y, Watanabe T. **Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development.** *Am J Pathol.* 1998; 153(1):109-119.

Mehta P, Ploutz-Snyder R, Nandi J, Rawlins SR, Sanderson SO, Levine RA. **Diagnostic accuracy of serum hyaluronic acid, FIBROSpect II, and YKL-40 for discriminating fibrosis stages in chronic hepatitis C.** *Am J Gastroenterol.* 2008; 103(4):928-936.

Mendichi R, Schieroni AG. **Fractionation and characterization of ultra-high molar mass hyaluronan: 2. On-line size exclusion chromatography methods.** *Polymer.* 2002; 43:6115-6121.

Meneses A, Herrera J, Mohar A, García C, Suchil L. **Expresión inmunohistoquímica de metaloproteasas (MMP-1, 2 y 11) e inhibidor de metaloproteasas de tejido-1 (TIMP-1), y expresión de p53 en linfomas angiocéntricos de células T/NK tipo nasal.** *Gac Med Mex.* 2005; 141:291-296.

Meyer K, Palmer JW. **The polysaccharide of the vitreous humor.** *J Biol Chem.* 1934; 107:629-634.

Miralles RC. En **Biomecánica clínica del aparato locomotor.** Editado por Masson. Barcelona, España. 1998.

Miyamoto H, Dumas GA, Wyss UP, Ryd L. **Three-dimensional analysis of the movement of lumbar spinal nerve roots in nonsimulated and simulated adhesion conditions.** *Spine.* 2003; 28:2373-2380.

Modic MT, Steinberg PM, Ross JS, Mosaryk TJ, Carter JR. **Degenerative disk disease and back pain.** *Magn Reson Imaging Clin North Am.* 1999; 7:481-491.

- Mohamadzadeh M, DeGrendele H, Arizpe H, Estess P, siegelman M. **Proinflammatory stimuli regulate endotelial hyaluronan expresión and CD44/HA-dependent primary adhesión.** J Clin Invest. 1998; 101(1):97-108.
- Moseley R, Leaver M, Walker M, Waddington RJ, Parsons D, Chen WYJ, Embery G. **Comparison of the antioxidant properties of HYAFF®-11p75, AQUACEL® and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro.** Biomaterial. 2002; 23:2255-2264.
- Murphy G, Hembry RM, Hughes CE, Fosang AJ, Hardingham TE. **Role and regulation of metalloproteinases in connective tissue turnover.** Biochem Soc Trans. 1990; 18(5):812-815.
- Nagase H, Kashiwagi M. **Aggrecanases and cartilage matrix degradation.** Arthritis Res Ther. 2003; 5:94-103.
- Nagase H, Suzuki K, Cawston TE, Brew K. **Involvement of a region near valine-69 of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in the interaction with matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1).** Biochem J. 1997; 325(1):163-167.
- Nandi A, Estess P, Siegelman MH. **Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44.** J Biol Chem. 2000; 275(20):14939-14948.
- North RB, Campbell JN, James CS, Conover-Walker MK, Wang H, Piantadosi S, Rybock JD, Long DM. **Failed back surgery syndrome: 5 years follow-up in 102 patients undergoing repeated operation.** Neurosurgery. 1991; 28:685-691.
- Oksala O, Salo O, Salo T, Rahemtulla F, Larjava H. **Inmohistochemical localisation of proteoglycans in human periodontum.** J Histochem Cytochem. 1993; 41:1689-1699.
- Patel BP, Shah PM, Rawai UM, Desai AA, Shah SV, Rawai RM, Patel PS. **Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma.** J Surg Oncol. 2005; 90:81-88.
- Pei D. **Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP.** J Biol Chem. 1999; 274(13):8925-8932.
- Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JM, Eskelinen MJ, Kosma VM. **Expression of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in breast cancer with special reference to activator protein-2, HER-2 and prognosis.** Clin Cancer Res. 2004; 10:7621-7628.

Pflugmacher R, Kandziora F, Schroeder RJ, Melcher I, Haas NP, Klostermann CK. **Percutaneous balloon kyphoplasty in the treatment of pathological vertebral body fracture and deformity in multiple myeloma: a one year follow up.** Acta Radiol. 2006; 4:369-376.

Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. **The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis.** Curr Biol. 1999; 9(24):1441-1447.

Prehm P. **Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation.** Biochem J. 2006; 398:469-473.

Prieto JG, Pulido MM, Zapico J, Molina AJ, Gimeno M, Coronel P, Álvarez AI. **Comparative study of hyaluronic derivatives: rheological behaviour, mechanical and chemical degradation.** Int J Biol Macromol. 2005; 35:63-69.

Puente XS, Pendás AM, Llano E, Velasco G, López-Otín C. **Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma.** Cancer Res. 1996; 56(5):944-949.

Putz R, Pabst R. En **Atlas de Anatomía Humana. Sobotta.** Editado por Editorial Médica Panamericana, Madrid, España. 2004.

Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, Fishbein MC, Kaul S, Cercek B, Sharifi B, Shah PK. **Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators.** Circulation. 1999; 99(24):3103-3109.

Ribeiro W, Orfão M, Mata JL, Saramago B. **Behaviour of wetting films of sodium hyaluronate saline solutions.** J Colloid Interface Sci. 2008; 317:536-543.

Roberson JT, Maier K, Anderson RW. **Prevention of epidural fibrosis with ADCON-L in presence of a durotomy during lumbar disc surgery: experiences with a pre-clinical model.** Neurol Res. 1999; 21:61-66.

Rodgers K, Robertson J, Espinoza T, Oppelt W, Cortese S, diZerega G, Berg R. **Reduction of epidural fibrosis in lumbar surgery with Oxiplex adherence barriers of carboxymethylcellulose and polyethylene oxide.** The Spine J. 2003; 3:277-284.

Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. **The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review).** Int J Cancer. 1995; 60:632-636.

- Roslind A, Johansen JS. **YKL-40: a novel marker shared by chronic inflammation and oncogenic transformation.** *Methods Mol Biol.* 2009; 511:159-84.
- Ross JS, Mosaryk TJ, Schrader M, Gentili A, Bothman H, Modic MT. **MR imaging in postoperative lumbar spine: assessment with gadopentetate dimeglumie.** *AJR.* 1990; 155:867-872.
- Ross JS, Robertson JT, Frederickson RCA. **Association between peridural scar and recurrent radicular pain after lumbar discectomy: magnetic resonance evaluation.** *Neurosurgery.* 1996; 38:855-863.
- Ross J, Obuchowski N, Zepp R. **The postoperative lumbar spine: evaluation of epidural scar over a 1-Year Period.** *AJNR.* 1998;19:183-186.
- Rothman R, Simeone F. En **La columna vertebral.** Editado por Editorial Médica Panamericana, Madrid, España. 1986.
- Rouvière H, Delmas A. En **Anatomía Humana. Descriptiva, topográfica y funcional.** Editado por Masson, Barcelona, España. 1991.
- Rychlý J, Šoltés L, Stankovská M, Janigová I, Csomorová K, Sasinková V, Kogan G, Gemeiner P. **Unexplored capabilities of chemiluminescence and thermoanalytical methods in characterization of intact and degraded hyaluronans.** *Polym Degrad Stabil.* 2006; 91:3174-3184.
- Saarialho-Kere UK. **Patterns of matriz metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers.** *Arch Dermatol Res.* 1998; 290 Suppl:S47-54.
- Sánchez J. **Cuantificación de la apoptosis de condrocitos humanos en función del tiempo de rotura completa del ligamento cruzado anterior.** Tesis doctoral. Área de fisiología. Universidad de León. 2006.
- Sandoval MA, Hernández-Vaquero D. **Preventing peridural fibrosis with nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** *Eur Spine J.* 2008; 17(3):451-455.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. **A matriz metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells.** *Nature.* 1994; 370(6484):14-15.

Sabuncouglu H, Bavbek M, Sabuncuoglu B, Gadelha E, Köse K, Preul M. **Attenuation of postlaminectomy epidural fibrosis with monoclonal antibodies against intercellular adhesion molecule-1 and CD-18.** *The Spine J.* 2007; (7):459-465.

Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL, Carvalho-Filho RJ, Sampaio JP, Medina-Pestana JO, Lanzoni VP, Silva AE, Ferraz ML. **Serum levels of YKL-40 and hyaluronic acid as noninvasive markers of liver fibrosis in haemodialysis patients with chronic hepatitis C virus infection.** *J Viral Hepat.* 2008; 15(9):666-674.

Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K. **Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies.** *Curr Med Chem.* 2003; 10:2123-2145.

Schimizzi AL, Massie JB, Murphy M, Perry A, Kim CW, Garfin SR, Akeson WH. **High-molecular-weight hyaluronan inhibits macrophage proliferation and cytokine release in the early wound of a preclinical postlaminectomy rat model.** *Spine J.* 2006; 6(5):550-556.

Schneider S, Mohnen SM, Schiltenswolf M, Rau C. **Comorbidity of low back pain: representative outcomes of a national health study in the Federal Republic of Germany.** *Eur J Pain.* 2007; 11(4):387-397.

Schönbeck U, Mach F, Sukhova GV, Atkinson E, Levesque E, Herman M, Graber P, Basset P, Libby P. **Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo.** *J Exp Med.* 1999; 189(5):843-853.

Schunke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. En **Prometheus. Atlas de anatomía. Tomo 1.** Editado por Editorial Médica Panamericana. Madrid. España. 2005.

Scott JE, Heatley F. **Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy.** *Biomacromolecules.* 2002; 3:547-553.

Séguin CA, Pilliar RM, Madri JA, Kandel RA. **TNF-alpha induces MMP2 gelatinase activity and MT1-MMP expression in an in vitro model of nucleus pulposus tissue degeneration.** *Spine.* 2008; 33:356-365.

Sheehan KM, DeLott LB, Day SM, DeHeer DH. **Hyalgan has a dose-dependent differential effect on macrophage proliferation and cell death.** *J Orthop Res.* 2004; 21(4):744-751.

- Shiedlin A, Bigelow R, Christopher W, Arbabi S, Yang L, Maier RV, Wainwright N, Childs A, Miller RJ. **Evaluation of hyaluronan from different sources: Streptococcus zooepidemicus, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord.** *Biomacromolecules*. 2004; 5:2122-2127.
- Shih HN, Fang JF, Chen JH, Yang CL, Chen YH, Sung TH, Chen YH, Sung TH, Shih LY. **Reduction in experimental peridural adhesion with the use of a crosslinked hyaluronate/collagen membrane.** *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004; 3:547-553.
- Siegelman MH, DeGrendele HC, Estess P. **Activation and interaction of CD44 and hyaluronan in immunological systems.** *J Leukoc Biol*. 1999; 66(2):315-321.
- Silva A, Soriano R, Pérez B, Sicilia G, Viguera R, Reyes G. **Efecto de la administración directa de ácido hialurónico en la regeneración de un nervio periférico seccionado.** *Rev Mex Pediatr*. 2003; 70(1):14-18.
- Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, Savani RC, Kumar S. **HA-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways.** *Matrix Biol*. 2007; 26:58-68.
- Soegaard R, Christensen FB, Christiansen T, Bünger C. **Cost and effects in lumbar spinal fusion. A follow-up study in 136 consecutive patients with chronic low back pain.** *Eur Spine J*. 2007; 16:657-668.
- Songer MN, Gosh L, Spencer DL. **Effects of sodium hyaluronate on peridural fibrosis after lumbar laminotomy and discectomy.** *Spine*. 1990; 15(6):550-554.
- Songer MN, Rauschning W, Carson EW, Pandit SM. **Analysis of the peridural scar formation and its prevention after lumbar laminotomy and discectomy in dogs.** *Spine*. 1995; 20:571-580.
- Stafford MA, Peng P, Hill DA. **Sciatica: a review of history, epidemiology, pathogenesis, and the role of epidural steroid injection in management.** *Br J Anaesth*. 2007; 99(4):461-473.
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. **Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.** *J Biol Chem*. 1995; 270(10):5331-5338.

Sun Y, Wang L, Sun S, Liu B, Wu N, Cao X. **The effect of 10-hydroxycamptothecine in preventing fibroblast proliferation and epidural scar adhesion after laminectomy in rats.** Eur J Pharmacol. 2008; 593:44-48.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. **Hyaluronan and homeostasis: a balancing act.** J Biol Chem. 2002; 277:4581-4584.

Tatsui CE, Martínez G, Li X, Pattany P, Levi AD. **Evaluation of DuraGen in preventing peridural fibrosis in rabbits. Invited submission from de Joint Section Meeting on Disorder of the Spine and Peripheral Nerves.** J Neurosurg Spine. 2006; 4(1):51-59.

Teder P., Vandivier R.W., Jiang D., Liang J., Cohn L., Puré E., Henson P.M., Noble P.W. **Resolution of lung inflammation by CD44.** Science. 2002; 296:155-158.

Temel SG, Ozturk C, Temiz A, Ersozlu S, Aydinli U. **A new material for prevention of epidural fibrosis after laminectomy: oxidized regenerated cellulose (interceed), an absorbable barrier.** J Spinal Disord Tech. 2006; 19(4):270-275.

Topsakal C, Akpolat N, Erol F, Ozveren M, Akdemir I, Kaplan M, Tiftikci M, Kilic N. **Seprafilm superior to Gore-Tex in the prevention of peridural fibrosis.** J, Neurosurg. 2004; 101:295-302.

Truchon M, Côté D, Fillion L, Arsenault B, Dionne C. **Low-back-pain related disability: an integration of psychological risk factors into the stress process model.** Pain. 2008; 137(3):564-573.

Tsuyoshi K, Hirotaka H, Hiromichi K, Kenichi S. **Evaluation of hyaluronic acid sheet for the prevention of postlaminectomy adhesions.** The Spine J. 2005; (5):479-488.

Turpeenniemi-Hujanen T. **Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers.** Biochimie. 2005; 87:287-297.

Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins EE, Firth JD, Salonen J, López-Otín C, Saarialho-Kere U, Kähäri VM. **Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation.** Am J Pathol. 1998; 152(6):1489-1499.

Uria JA, Balbin M, López JM, Álvarez J, Vizoso F, Takigawa M, López-Otín C. **Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor.** AJP. 1998; 153:91-101.

- Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. **The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.** Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1999; 87(14):5578-5582.
- Vogelsang JP, Finkenstaedt M, Vogelsang M, Markakis E. **Recurrent pain after lumbar discectomy: the diagnostic value of peridural scar on MRI.** Eur Spine J. 1999; 8(6):475-479.
- Waddington RJ, Moseley R, Embery G. **Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases.** Oral Dis. 2000; 6:138-151.
- Weigel PH, DeAngelis P. **Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases.** J Biol Chem. 2007; 282:36777-36781.
- Weigel PH, Fuller GM, Leboeuf R. **A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing.** M Theor Biol. 1986; 119:219-234.
- Weissman B, Meyer K. **The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord.** J Am Chem Soc. 1954; 76:1753-1757.
- Westermarck J, Kähäri VL. **Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion.** The FASEB Journal. 1999; 13:781-792.
- White AP, Kwon BK, Lindskog DM, Friedlaender GE, Grauer JN. **Metastasis tumorales de columna vertebral.** J Am Acad Orthop Surg (Ed Esp) 2006; 5:514-525.
- Wilson MJ, Sellers RG, Viehr C, Melamud O, Pei D, Peehl DM. **Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells.** J Cell Physiol. 2002; 191:208-216.
- Woessner JF, Bashey RI, Boucek RJ. **Collagen development in heart and skin of the chick embryo.** Biochim Biophys Acta 142. 1967; (2):329-338.
- Woessner JF Jr. **Role of matrix proteases in processing enamel proteins.** Connect Tissue Res. 1998; 39(1-3):69-73.
- Wu H, Du J, Zheng Q. **Expression of MMP-1 in cartilage and synovium of experimentally induced rabbit ACLT traumatic osteoarthritis: immunohistochemical study.** Rheumatol Int. 2008; 29:31-36.

Yucesoy K, Karci A, Kilicalp A, Mertol T. **The barrier effect of laminae: laminotomy versus laminectomy.** Spinal Cord. 2000; 38:442-444.

Zhao J, Yang S, Li Z, Hu Y. **Effect of straight-leg-raising movement on epidural fibrosis en early stage after laminectomy in a rabbit model.** J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2006; 26(6):713-715.

Zivanovic S, Rackov LP, Vojvodic D, Vucetic D. **Human cartilage glycoprotein 39 biomarker of joint damage in knee osteoarthritis.** Int Orthop. 2009; 33(4):1165-1170.

9. ANEXOS.

	Control	Adant®	Durolane®	Hyalgan®
Control				
Adant®	0,24540			
Durolane®	0,25480	0,63294		
Hyalgan®	0,00436	0,03594	0,03253	

Anexo Ia. Resultados del estudio estadístico ANOVA (Newman-Keuls) del peso del tejido fibroso dentro del canal vertebral en los distintos grupos de estudio.

	Media 1	Media (2, 3 ó 4)	t	f	p
<u>1-2</u>	119,490	93,1650	1,44730	11	0,17570
<u>1-3</u>	119,490	100,872	1,37503	12	0,19425
<u>1-4</u>	119,490	57,5080	5,77356	10	0,0070

Anexo Ib. Resultados del análisis estadístico entre los distintos grupos de estudio mediante t de Student, del peso del tejido dentro del canal neural. Grupo control (1), Grupo Adant® (2), Grupo Durolane® (3) y Grupo Hyalgan® (4).

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo control.	Suma de rangos grupo Adant®.	U	p	N grupo Control.	N grupo Adant®.
RMN Inicial	54,00	37,00	16,00	0,475	7	6

Anexo IIa. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el estudio de RMN inicial en el grupo control y el grupo Adant®.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo control.	Suma de rangos grupo Durolane®.	U	p	N grupo Control.	N grupo Durolane®.
RMN Inicial	59,00	46,00	18,00	0,406	7	7

Anexo IIb. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el estudio de RMN inicial en el grupo control y el grupo Durolane®.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo control.	Suma de rangos grupo Hyalgan®.	U	p	N grupo Control.	N grupo Hyalgan®.
RMN Inicial	56,50	21,50	6,50	0,074	7	5

Anexo IIc. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el estudio de RMN inicial en el grupo control (Grupo 1) y el grupo Hyalgan® (Grupo 4).

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo control.	Suma de rangos grupo Adant®.	U	p	N grupo Control.	N grupo Adant®.
RMN Final	52,50	38,50	17,50	0,617	7	6

Anexo IIIa. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el estudio de RMN final en el grupo control y el grupo Adant®.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo control.	Suma de rangos grupo Durolane®.	U	p	N grupo Control.	N grupo Durolane®.
RMN Final	62,00	43,00	15,00	0,225	7	7

Anexo IIIb. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el estudio de RMN final en el grupo control y el grupo Durolane®.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo control.	Suma de rangos grupo Hyalgan®.	U	p	N grupo Control.	N grupo Hyalgan®.
RMN Final	56,00	22,00	7,00	0,088	7	5

Anexo IIIc. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el estudio de RMN final en el grupo control y el grupo Hyalgan®.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo control inicial.	Suma de rangos grupo control final.	U	p	N grupo Control inicial.	N grupo Control final.
RMN	53,00	52,00	24,00	0,949	7	7

Anexo IVa. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el grupo control en la RMN inicial y final.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo Adant® inicial.	Suma de rangos grupo Adant® final.	U	p	N grupo Adant® inicial.	N grupo Adant® final.
RMN	41,00	37,00	16,00	0,749	6	6

Anexo IVb. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el grupo Adant® en la RMN inicial y final.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo Durolane® inicial.	Suma de rangos grupo Durolane® final.	U	p	N grupo Durolane® inicial.	N grupo Durolane® final.
RMN	56,50	48,50	20,50	0,609	7	7

Anexo IVc. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el grupo Durolane® en la RMN inicial y final.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos grupo Hyalgan® inicial.	Suma de rangos grupo Hyalgan® final.	U	p	N grupo Hyalgan® inicial.	N grupo Hyalgan® final.
RMN	27,50	27,50	12,50	1,000	5	5

Anexo IVd. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis en el grupo Hyalgan® en la RMN inicial y final.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos total en el grupo control.	Suma de rangos en el grupo Adant®.	U	p	N grupo Control.	N grupo Adant®.
RMN	205,00	146,00	68,00	0,411	14	12

Anexo Va. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis total en el estudio de RMN entre el grupo control y el grupo Adant® una vez sumadas los resultados de la RMN inicial y final en ambos grupos

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos total en el grupo control.	Suma de rangos total en el grupo Durolane®.	U	p	N grupo Control	N grupo Durolane®.
RMN	236,00	170,00	65,00	0,129	14	14

Anexo Vb. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis total en el estudio de RMN entre el grupo control y el grupo Durolane® una vez sumadas los resultados de la RMN inicial y final en ambos grupos.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos total en el grupo control.	Suma de rangos total en el grupo Hyalgan®.	U	p	N grupo Control	N grupo Hyalgan®.
RMN	218,00	218,00	82,00	0,012	14	10

Anexo Vc. Análisis estadístico comparando mediante test U de Mann-Whitney el grado de fibrosis total en el estudio de RMN entre el grupo control y el grupo Hyalgan® una vez sumadas los resultados de la RMN inicial y final en ambos grupos.

	Control	Adant®	Durolane®	Hyalgan®
Control.				
Adant®.	0,04384			
Durolane®.	0,03212	0,90652		
Hyalgan®.	0,04239	0,76629	0,56808	

Anexo VIa. Análisis estadístico mediante Anova Newman-Keuls de los niveles de hidroxiprolina en los distintos grupos.

	Media 1	Media (2,3 ó 4)	t	f	p
<u>1-2</u>	121,617	44,9272	2,83006	9	0,01972
<u>1-3</u>	121,617	48,1023	2,96322	11	0,01290
<u>1-4</u>	121,617	63,5909	1,91377	9	0,08792

Anexo VIb. Resultados del análisis estadístico entre los distintos grupos de estudio mediante t de Student de los niveles de hidroxiprolina. Grupo control (1), Grupo Adant® (2), Grupo Durolane® (3) y Grupo Hyalgan® (4).

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos el grupo control.	Suma de rangos en el grupo Adant®.	U	p	N grupo Control	N grupo Adant®.
Fibrosis anatomía-patológica	65,50	28,50	7,50	0,036	7	6

Anexo VIIa. Análisis estadístico mediante U test Mann-Whitney comparando el grado de fibrosis en el estudio anatómo-patológico en grupo control y el grupo Adant®.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos en el grupo control.	Suma de rangos en el grupo Durolane®.	U	p	N grupo Control	N grupo Durolane®.
Fibrosis anatomía-patológica	72,50	33,00	5,00	0,013	7	6

Anexo VIIb. Análisis estadístico mediante U test de Mann-Whitney comparando la fibrosis epidural en estudio anatómo-patológico en el grupo Control y el grupo Durolane®.

Test U de Mann-Whitney.	Suma de rangos en el grupo control.	Suma de rangos en el grupo Hyalgan®.	U	p	N grupo Control	N grupo Hyalgan®.
Fibrosis anatomía-patológica	60,50	17,50	2,50	0,015	7	5

Anexo VIIc. Análisis estadístico mediante test U de Mann-Whitney comparando la fibrosis epiural en estudio anatómo-patológico en el grupo Control y el grupo Hyalgan

	Control	Adant®	Durolane®	Hyalgan®
Control				
Adant®	0,927279			
Durolane®	0,802988	0,907137		
Hyalgan®	0,884001	0,723259	0,882766	

Anexo VIIa. Análisis estadístico mediante Anova Newman-Keuls de los valores de YKL 40 en los distintos grupos de estudio.

	Media 1	Media (2,3 ó 4)	t	f	p
<u>1-2</u>	1,831552	2,080396	-0,461228	11	0,653621
<u>1-3</u>	1,831552	2,001116	-0,242336	12	0,812612
<u>1-4</u>	1,831552	2,321224	-0,767170	10	0,460709

AnexoVIIIb. Análisis estadístico mediante T de Student de los valores de YKL 40 en los distintos grupos. Grupo control (1), Grupo Adant® (2), Grupo Durolane® (3) y Grupo Hyalgan® (4).

	Control	Adant®	Durolane®	Hyalgan®
Control				
Adant®	0,461212			
Durolane®	0,227808	0,155492		
Hyalgan®	0,218213	0,318254	0,054259	

Anexo IXa. Análisis estadístico mediante ANOVA (Newman-Keuls) de los valores de MMP-1 en los distintos grupos de estudio.

	Media (1)	Media (2,3 ó 4)	t	f	p
<u>1-2</u>	0,444750	0,539843	-1,12576	4	0,323242
<u>1-3</u>	0,444750	0,284280	3,181981	4	0,033472
<u>1-4</u>	0,444750	0,670597	-1,55394	4	0,195166

Anexo IXb. Análisis estadístico mediante t de Student de los valores de MMM-1 de los distintos grupos. Grupo control (1), Grupo Adant® (2), Grupo Durolane® (3) y Grupo Hyalgan® (4).

	Control	Adant®	Durolane®	Hyalgan®
Control				
Adant®	0,789019			
Durolane®	0,816817	0,824152		
Hyalgan®	0,695758	0,595007	0,954440	

Anexo Xa. Análisis estadístico mediante Anova Newman-Keuls de los valores de MMP-9 en los distintos grupos.

	Media 1	Media (2,3 ó 4)	t	f	p
<u>1-2</u>	1,049815	0,950095	0,235339	4	0,825503
<u>1-3</u>	1,049815	0,734035	0,658706	4	0,546071
<u>1-4</u>	1,049815	0,750655	0,750652	4	0,494608

Anexo Xb. Análisis estadístico mediante t de Student de los valores de MMP-9 de los distintos grupos. Grupo control (1), Grupo Adant® (2), Grupo Durolane® (3) y Grupo Hyalgan® (4).