

Universidad de Navarra. Facultad de Medicina. Departamento de Cirugía
Ortopédica y Traumatología.

Efecto de Barreras Mecánicas y Péptido Inhibidor del Factor de Crecimiento Transformante Beta Sobre la Fibrosis Epidural de Conejo.

Trabajo presentado por Juan Newton Albiñana Cunningham para optar al grado
de Doctor en Medicina por la Universidad de Navarra.

Pamplona, Octubre 2018.

Financiación:

Este trabajo ha sido financiado gracias a la beca de ayuda a la investigación GEER 2013.

Comunicaciones orales:

Efecto de péptidos inhibidores de TGF-beta sobre la fibrosis peridural postoperatoria en un modelo de laminectomía en conejo. Comunicación oral nº 49. XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Columna Vertebral. Tarragona 5, 6 y 7 de junio de 2014.

Efecto de las barreras mecánicas y péptido inhibidor del TGF beta sobre la fibrosis epidural del conejo. VIII Reunión Extraordinaria de la Asociación de Especialistas de C.O.T. de la Clínica Universidad de Navarra. Pamplona, 20, 21 y 22 de Septiembre de 2018.

Publicaciones en revistas:

Albiñana-Cunningham JN, Ripalda-Cemboráin P, Labiano T, Echeveste JI, Granero-Moltó F, Alfonso-Olmos M. Mechanical barriers and transforming growth factor beta inhibitor on epidural fibrosis in a rabbit laminectomy model. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. **2018**;13:72. doi:10.1186/s13018-018-0781-6.

Agradecimientos:

Deseo expresar mi agradecimiento a todos los que me han ayudado en el desarrollo de esta tesis doctoral. A mi familia que me ha apoyado con su amor, generosidad y sacrificio. A la Universidad de Navarra, a la Clínica Universidad de Navarra, a mis profesores y compañeros de trabajo por darme la oportunidad de aprender y trabajar en algo en lo que disfruto.

A la bibliotecaria de la CUN, Fabiola De Goñi, por su ayuda en el manejo del gestor de referencias bibliográficas. Al personal del CIFA, a las enfermeras del quirófano experimental, Yolanda Azcona y Mercedes Fernández, a los veterinarios Igor Alkain y Alberto Espinal y a Juan Pedro Albiasu que con su amplia experiencia y asistencia han permitido el desarrollo del modelo quirúrgico en los conejos así como su cuidado hasta el momento de su sacrificio. Al Dr. Javier Dotor por su ayuda con el manejo del péptido P144 y por sus ideas de cómo mejorar el modelo experimental y la cuantificación de la fibrosis. A Pury Ripalda por su asistencia y valiosa ayuda en el procesado histológico de las muestras. También quisiera dedicar unas líneas a Ainhoa Urbiola, Cristina Ederra, Mikel Ariz y Miguel Galarraga del departamento de Imagen del CIMA, por su ayuda con los programas de análisis de imagen.

A los anatomopatólogos Dr. José Echeveste y a la Dra. Tania Labiano, así como al Dr. Jorge Núñez del Servicio de Apoyo a la Investigación por compartir sus conocimientos y ayudarme en la valoración de los resultados. Al Dr. Carlos Villas

por leer de forma crítica el estudio y mejorarlo con sus aportaciones. Al GEER por financiar este trabajo.

Finalmente a mis directores de tesis el Dr. Matías Alfonso y el Dr. Froilán Granero por su tiempo y por ayudarme siempre que lo he necesitado haciendo que lo que parecía difícil fuese más sencillo.

Abreviaturas:

BMP	Proteína morfogenética ósea
CS	Esponja de colágeno
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico por sus siglas en inglés.
DE	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Food and Drug Administration
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
G	Glicina
GCP	Polímero de gelatina y carbohidrato
GDF	Growth and Differentiation Factors
H&E	Hematoxilina y Eosina
IC	Intervalo de confianza
IL	Interleuquina
INF	Interferón
ITGF- β	Inhibidor Transforming Growth Factor Beta
MEC	Matriz extracelular
MIF	Mullerian Inhibitory Factor
TrisHCl	Tris hidroximetil aminometano clorhídrico
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PVP	Polivinilpirrolidona
RS	Rojo Sirio
SMAD	“Small body size” y “Mothers Against Decantaplegic”
α -SMA	Smooth Muscle Actin alfa
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TM	Tricrómico de Masson
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	8
1.1. RESUMEN	9
1.2. PALABRAS CLAVE	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1. DOLOR LUMBAR	11
2.1.1 PREVALENCIA DEL DOLOR LUMBAR	11
2.1.2 CAUSAS Y TIPOS DE DOLOR	11
2.1.3 ANATOMÍA VERTEBRAL	17
2.1.4 ANATOMÍA VERTEBRAL DEL CONEJO	23
2.2 TRATAMIENTO DE LAS AFECCIONES LUMBARES	25
2.2.1 TRATAMIENTO CONSERVADOR	25
2.2.2 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO	27
2.2.3 COMPLICACIONES DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO	28
2.2.4 LA FIBROSIS EPIDURAL	30
2.3 LA FIBROSIS EPIDURAL COMO PROBLEMA DE LA CIRUGÍA LUMBAR.	30
2.4 CICATRIZACIÓN	33
2.4.1 FASES Y FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CICATRIZACIÓN	34
2.4.2 FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF-B)	40
2.4.3 COLÁGENO	47
2.5 PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS EPIDURAL	50
2.5.1 PÉPTIDO P144®	52
2.5.2 BARRERAS MECÁNICAS EN LA INHIBICIÓN DE LA FIBROSIS EPIDURAL	52
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
3.1 HIPÓTESIS	56
3.2 OBJETIVOS	56
4. MATERIALES Y MÉTODOS	57
4.1 ANIMALES Y GRUPOS	58
4.2 INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS	61
4.3 HISTOLOGÍA Y ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO	68



4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
5. RESULTADOS	74
5.1 COMPLICACIONES	75
5.2 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	79
5.3 ESTUDIO HISTOMORFOMÉTRICO	81
6. DISCUSIÓN	84
6.1 MODELO ANIMAL	85
6.2 TIEMPO DE SACRIFICIO	86
6.3 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	87
6.4 PROCESADO HISTOLÓGICO	87
6.5 VALORACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA Y ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO.	88
6.5.1 GRUPO GCP	88
6.5.2 GRUPO ITGF-B	89
6.5.3 GRUPO CS	92
6.6 LIMITACIONES Y POSIBLES SESGOS DEL ESTUDIO	93
7. CONCLUSIONES	96
8. BIBLIOGRAFÍA	98
ANEXOS	121



1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

1.1. Resumen

Con el objetivo de valorar el efecto y seguridad de diferentes métodos para reducir la fibrosis epidural se evaluaron materiales biocompatibles, usados a modo de barrera mecánica, y el péptido inhibidor del TGF- β (P144®) en un modelo de laminectomía L6 en conejo. Se realizó una laminectomía completa de L6 a conejos de la estirpe New Zealand White y se crearon 4 grupos experimentales según el tratamiento administrado. Los animales recibieron una lámina de esponja de colágeno (Grupo CS), un gel de gelatina porcina (Grupo GCP), P144® (Grupo iTGF β) o sin tratamiento (Grupo Control). Cuatro semanas tras la cirugía se sacrificó al animal y se determinó la densidad celular, el contenido de colágeno y el hueso neoformado de la zona cicatricial mediante histomorfometría. Dos anatomopatólogos cuantificaron la adherencia de la duramadre, la densidad de la cicatriz y el infiltrado inflamatorio de manera ciega. Todos los grupos, presentaron formación de fibrosis y adherencias a la duramadre tras la laminectomía. Solo el grupo GCP presentó una disminución significativa del contenido de colágeno y densidad de la cicatriz. En conclusión, solo el tratamiento con GCP reduce la fibrosis epidural, aunque no evitó completamente las adherencias a la duramadre.

1.2. Palabras clave

Fibrosis epidural, laminectomía, TGF- β , biomateriales



2. INTRODUCCIÓN

2.1. Dolor lumbar

2.1.1 Prevalencia del dolor lumbar

El dolor lumbar o lumbalgia es un síntoma muy común, se define como un dolor que se localiza en un área anatómica que se encuentra entre la zona dorsal baja hasta la región sacra y referido ocasionalmente a las extremidades inferiores. Puede presentarse en personas de cualquier edad, pero es mucho más frecuente entre las edades de 25 a 50 años [1, 2]. En Estados Unidos (EE. UU.) 59,1 millones de adultos mayores de 18 años tuvieron dolor lumbar en los últimos 3 meses con una incidencia 139 por cada 100.000 personas/año [3, 4]. La frecuencia de esta afección tiende a aumentar dado el crecimiento de la población y la esperanza de vida. Según distintos estudios un 66-80% de la población adulta desarrollará dolor lumbar en algún momento de su vida [5-7].

La prevalencia anual de dolor de columna se estima en un rango desde 15% al 20% en EE. UU. y desde un 25% a un 45% en Europa [8]. A nivel mundial es la principal causa de incapacidad e implica una alta utilización de recursos tanto sanitarios (consultas médicas, pruebas diagnósticas, tratamiento médico y quirúrgico) como no sanitarios (absentismo laboral, incapacidades laborales temporales o permanentes) y por tanto una elevada repercusión social [9].

2.1.2 Causas y tipos de dolor

Las afecciones de columna son un grupo variado y heterogéneo de enfermedades afectando a las vértebras, discos intervertebrales, facetas

posteriores, tendones, ligamentos, músculos, médula espinal y raíces nerviosas de la columna [8].

Las afecciones a nivel de la columna se pueden dividir en trastornos específicos y trastornos no específicos.

Los **trastornos específicos** de la columna pueden ser diagnosticados sobre la base de una patología estructural específica que es consistente con el cuadro clínico. Las 3 causas más frecuentes de dolor lumbar bajo son por orden de frecuencia:

- Dolor discogénico, se debe a la degeneración discal y puede producirse una salida del núcleo pulposo tras la rotura del anillo fibroso. La rotura permite que las proteínas con propiedades inflamatorias se extravasen a las fibras nerviosas pudiendo irritar esas fibras y producir dolor [8, 10].
- La segunda causa más común sería el producido desde las facetar posteriores. Las articulaciones facetarias son articulaciones sinoviales similares a otras del cuerpo. Estas articulaciones pueden dañarse afectando a la cápsula de la articulación que al romperse puede iniciar la degeneración del cartílago. Estos cambios degenerativos van asociados a inflamación a nivel de la articulación y puede producir dolor [11].
- La tercera causa más frecuente de dolor lumbar bajo es el que proviene de la articulación sacroiliaca. La articulación sacroiliaca puede volverse dolorosa por una biomecánica alterada, procesos inflamatorios, tumores,

traumatismos o por cambios degenerativos. [8, 12, 13].

Otra causa de dolor lumbar bajo puede originarse en:

- Una espondilolistesis, el deslizamiento de una vértebra sobre otra, que puede provocar irritación e inflamación que también puede generar dolor [14].

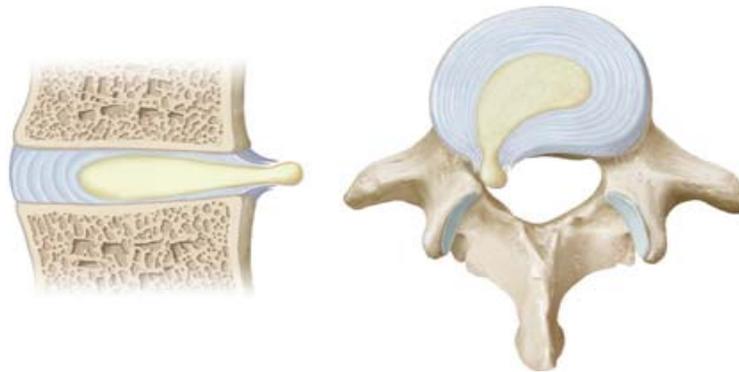


Figura 1. Representación de la salida del núcleo pulposo tras una rotura del anillo fibroso.

Modificada de “Norbert Boos · Max Aebi (Editors) Spinal Disorders Fundamentals of Diagnosis and Treatment. ISBN 978-3-540-40511-5 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York” [8].

- La radiculopatía lumbar ocurre cuando se inflama una de las raíces que salen desde la columna. Habitualmente producen un dolor irradiado en glúteo y en extremidad, y no tanto dolor lumbar, aunque frecuentemente coexisten ya que las facetas articulares degenerativas pueden provocar dolor lumbar, favorecer una estenosis por su hipertrofia e inflamar la raíz del nervio. Esto puede ocurrir por múltiples razones:

- En el caso de las **hernias discales** no solo puede ocurrir una radiculopatía por la compresión mecánica del nervio, sino también por el proceso inflamatorio provocado por el contenido del núcleo pulposo que puede provocar inflamación alrededor de la raíz del nervio (Figura 1). La mayoría responde al tratamiento conservador y referirán mejoría a las 6 semanas.
- La **estenosis lumbar** puede darse ante cualquier condición que disminuya el diámetro del canal espinal, del receso o el foramen con la subsiguiente compresión de las raíces nerviosas en uno o más niveles. También puede estar favorecido por un canal estrecho congénito, con un pedículo corto, que puede favorecer que pequeñas alteraciones discales produzcan una hipertrofia de carillas, y subsiguientemente un cuadro clínico de estenosis (claudicación intermitente). La estenosis lumbar también puede provocar una inflamación alrededor de la raíz (Figura 2). La causa más común son los cambios degenerativos en el disco y en las articulaciones posteriores. Estos cambios degenerativos están asociados frecuentemente a espondilolistesis. El objetivo del tratamiento quirúrgico es aliviar la presión sobre la raíz nerviosa afectada o de la médula.
- En el síndrome de la cauda equina múltiples raíces nerviosas pueden comprimirse por una hernia de disco u otras afecciones patológicas como puede ser un absceso epidural, hematoma, fractura,

malformación, tumoración o cuerpo extraño, resultando en un déficit neurológico, siendo las raíces sacras que controlan los esfínteres particularmente vulnerables a esta compresión. Por ello, en pacientes con un síndrome de cauda equina se precisa una descompresión quirúrgica de emergencia.

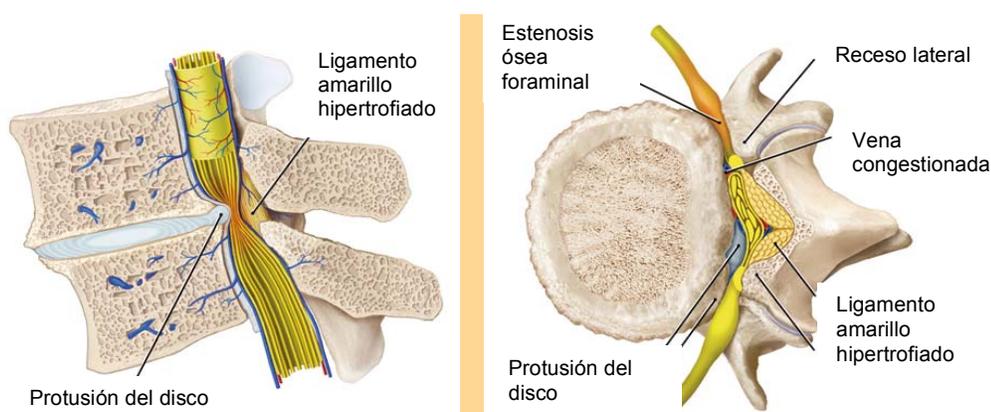


Figura 2. Patomorfología de la estenosis central, del receso lateral y foraminal.

Modificada de "Norbert Boos, Max Aebi (Editors) Spinal Disorders Fundamentals of Diagnosis and Treatment. ISBN 978-3-540-40511-5 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York" [8].

- La columna vertebral es también el principal asiento de las metástasis de tumores primarios de mama, pulmón o próstata. Además, la incidencia de estos tumores se ha visto aumentada en los últimos años en las sociedades desarrolladas debido a la mayor esperanza de vida 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 10-12 metástasis. En EE. UU. cada año se diagnostican aproximadamente un millón de tumores malignos extra-óseos, de ellos entre el 55-65% metastatizan en el esqueleto, y dentro de éste fundamentalmente a nivel del raquis. La gran cantidad de tejido óseo esponjoso existente a nivel de la columna vertebral supone un porcentaje importante de superficie ósea lo que podría explicar esta predilección de las metástasis por el tejido óseo vertebral [15, 16]. En términos de supervivencia, la presencia de metástasis vertebrales es un criterio de mal pronóstico, pero actualmente la esperanza de vida en los enfermos con metástasis óseas se ha incrementado con la aparición de nuevos agentes quimioterápicos, cada vez más eficaces y con menores efectos secundarios, acompañado de modernas técnicas radioterápicas y quirúrgicas [17].

En el contexto de las **alteraciones espinales no específicas**, que ocurren en la mayoría de los pacientes que presentan una alteración espinal (entre el 85–90%), no es posible identificar la causa del problema pese a estudios exhaustivos [18].

Hay muchas causas potenciales asociadas a las alteraciones no específicas de columna pero ninguna patología estructural puede ser responsable con seguridad de la sintomatología. Debido a que la sintomatología temprana de la mayoría de alteraciones espinales es el dolor cervical y lumbar no es fácil diferenciar entre alteraciones espinales específicas y no específicas. Las hernias

de disco y las discopatías suelen estar presentes en personas asintomáticas, un hallazgo que confirma que, en el dolor lumbar bajo, la patología y los hallazgos radiológicos no están fuertemente interrelacionados [19-21]

En cuanto a la localización, el dolor puede ser axial (cervical, dorsal, lumbar) restringido al área de la columna, suele ser de ritmo mecánico y empeorar con ciertas actividades y posiciones. También puede presentarse con extensión en las extremidades, en este caso el dolor referido no es constante y varía de intensidad, se inicia en la zona de la columna y se expande por el dermatoma afecto.

El dolor radicular es profundo y habitualmente constante, se irradia a la extremidad por el territorio del nervio afecto y puede estar acompañado de parestesias y debilidad muscular.

Las afecciones de la columna también se pueden clasificar en función de la duración del dolor, siendo agudas si persisten durante un periodo de tiempo inferior a 1 mes; subagudas, si duran entre 4 y 12 semanas y crónicas cuando el dolor dura más de 12 semanas. El dolor crónico ocurre entre un 7 y un 10% de los casos, afectando por igual a hombres y mujeres [22].

2.1.3 Anatomía vertebral

La columna vertebral humana forma un eje firme pero flexible que sostiene el tronco y sus apéndices, proporcionando al mismo tiempo una cobertura protectora para la médula espinal.

Está formada por 7 vértebras cervicales, 12 dorsales, 5 lumbares que constituyen la sección móvil de la columna vertebral, mientras que los otros 5 elementos fusionados constituyen el sacro que se articula con la cintura pélvica. Caudalmente al sacro, 4 ó 5 huesos irregulares constituyen el coxis (Figura 3).

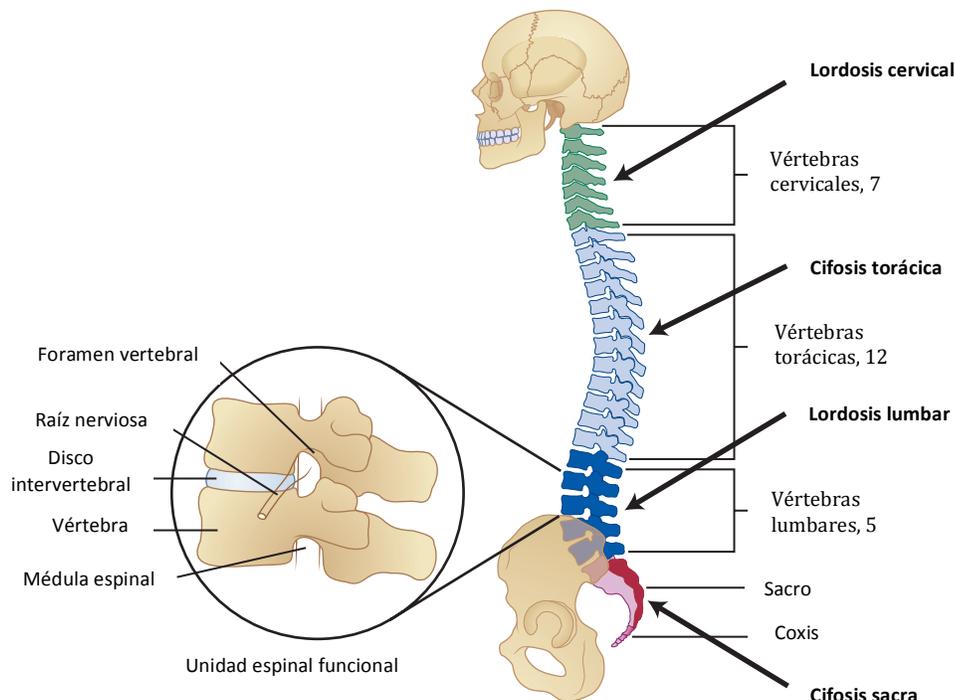


Figura 3. Columna vertebral humana en visión lateral. Destacada en la circunferencia la unidad funcional espinal o segmento de movilidad espinal. Modificada de “The Spine, Rothman-Simeone and Herkowitz. Capítulo 6. 7ª Edición” [23].

Así mismo, las vértebras varían considerablemente en el tamaño y en la forma dependiendo de su localización. Aunque la vértebra típica está formada por dos componentes principales:

- 1- El cuerpo vertebral, una masa anterior cilíndrica de hueso esponjoso.
- 2- El arco vertebral posterior, una estructura más compleja constituida por los pedículos, láminas, apófisis articulares superiores e inferiores y la apófisis espinosa que forman el arco vertebral que encierra y protege el tejido neural. (Figura 4, 5).

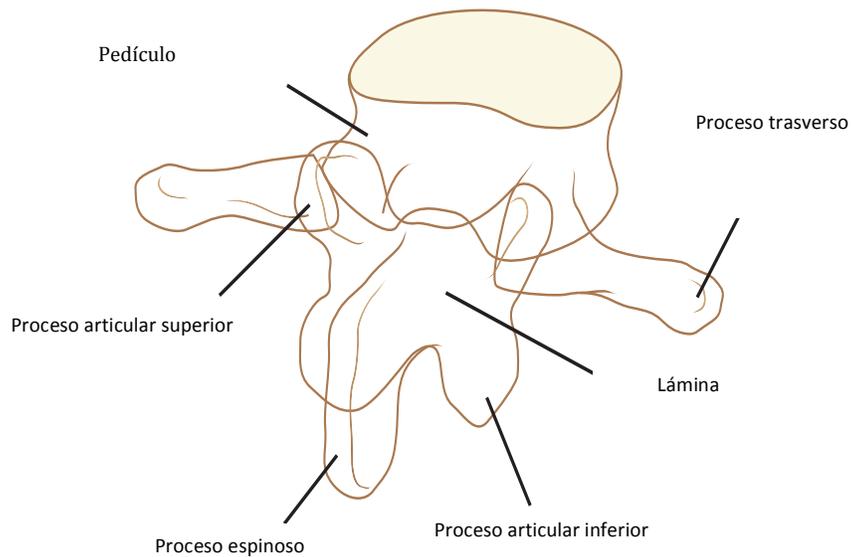


Figura 4. Vértebra lumbar y sus elementos posteriores. Modificada de “The Spine, Rothman-Simeone and Herkowitz, Capítulo 6, 7ª Edición” [23].

Además de las estructuras óseas existe otra serie de estructuras ligamentosas que se encargan de unir las distintas vértebras entre sí. Estos ligamentos son:

- Ligamento longitudinal anterior.
- Ligamento longitudinal posterior.
- Ligamentos amarillos.

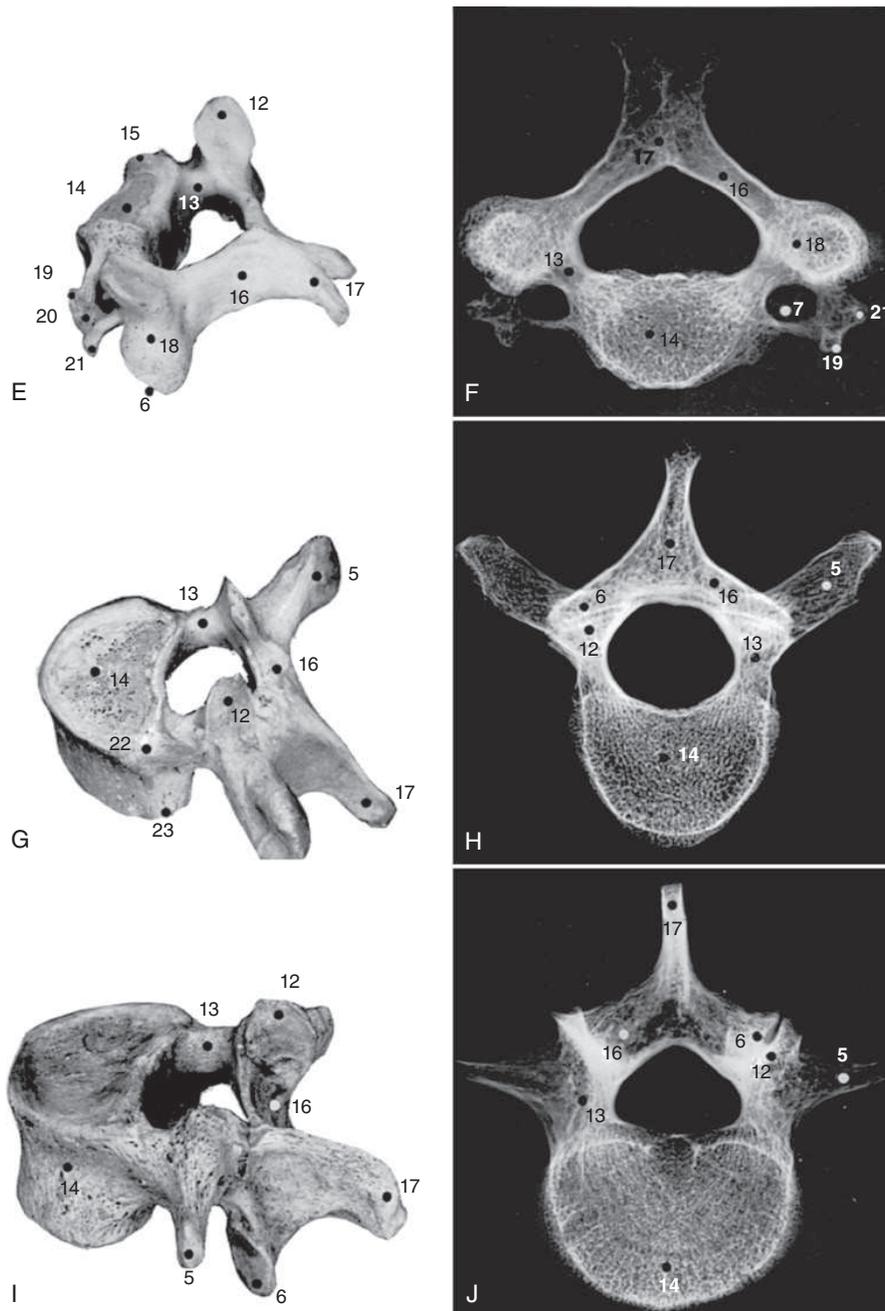


Figura 5. Visión oblicua y radiológica de diferentes vértebras humanas. E, F, Vértebra cervical. G, H vértebra torácica. I, J, Vértebra lumbar. Modificada de “The Spine, Rothman-Simeone and Herkowitz, Capítulo 6, 7ª Edición” [23].

- Ligamentos intertransversos.
- Ligamentos interespinosos.
- Ligamento supraespinoso.

Los 3 primeros son ligamentos dobles, mientras que el ligamento supraespinoso es una estructura única (Figura 6).

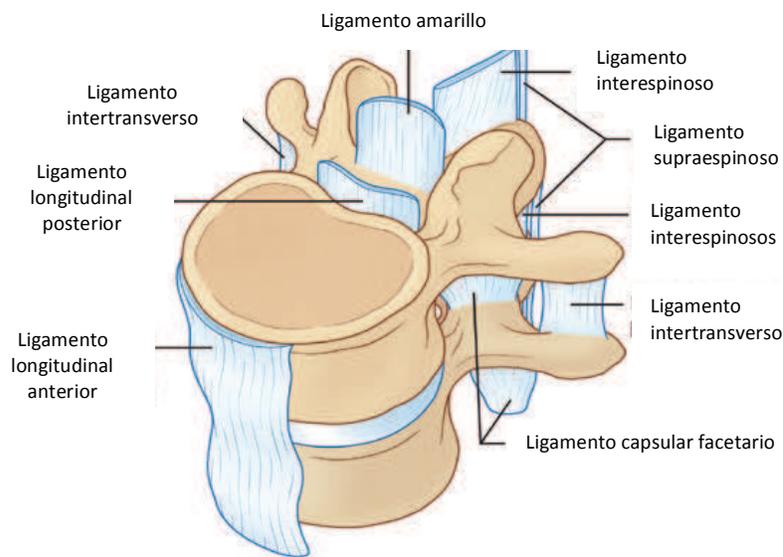


Figura 6. Ligamentos de la columna vertebral. Modificada de “Clinical Biomechanics of the Spine, White AA III, Panjabi MM. 2ª Ed, Philadelphia: JB Lippincott; 1990”.

Finalmente, el **disco intervertebral** es el complejo fibrocartilaginoso que constituye la articulación entre los cuerpos vertebrales. Proporciona una unión

muy fuerte asegurando el grado de fijación intervertebral necesaria para la correcta alineación de las vértebras y su función protectora del canal neural. La suma de los movimientos limitados permitidos por cada disco consigue que la columna vertebral actúe como un todo y sea posible una movilidad considerable en todos los planos. Cada disco está formado por dos compartimentos: la masa semilíquida interna, el núcleo pulposo, y su continente fibroso laminar, el anillo fibroso (Figura 7).

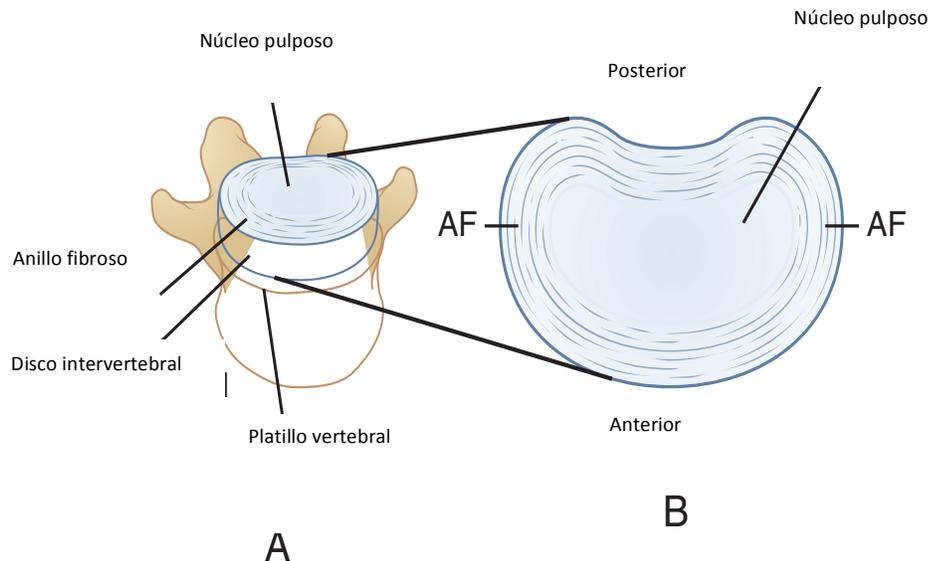


Figura 7. Disco Intervertebral. A, Disco intervertebral y cuerpo vertebral. **B**, Estructura del disco intervertebral, AF: anillo fibroso. Modificada de “The Spine, Rothman-Simeone and Herkowitz, Capítulo 6, 7ª Edición” [23].

2.1.4 Anatomía vertebral del conejo

La columna vertebral del conejo consta de 7 vértebras cervicales, 12 torácicas, 7 lumbares, 4 sacras y entre 14-16 vértebras caudales. Tienen 12 costillas a cada lado, con una porción ósea dorsal y cartilaginosa en la zona ventral. Las vértebras caudales, o coccígeas, son de pequeño tamaño, las 7 más craneales poseen arco posterior y en la zona más caudal se encuentran cilindros de hueso que representan los cuerpos vertebrales.

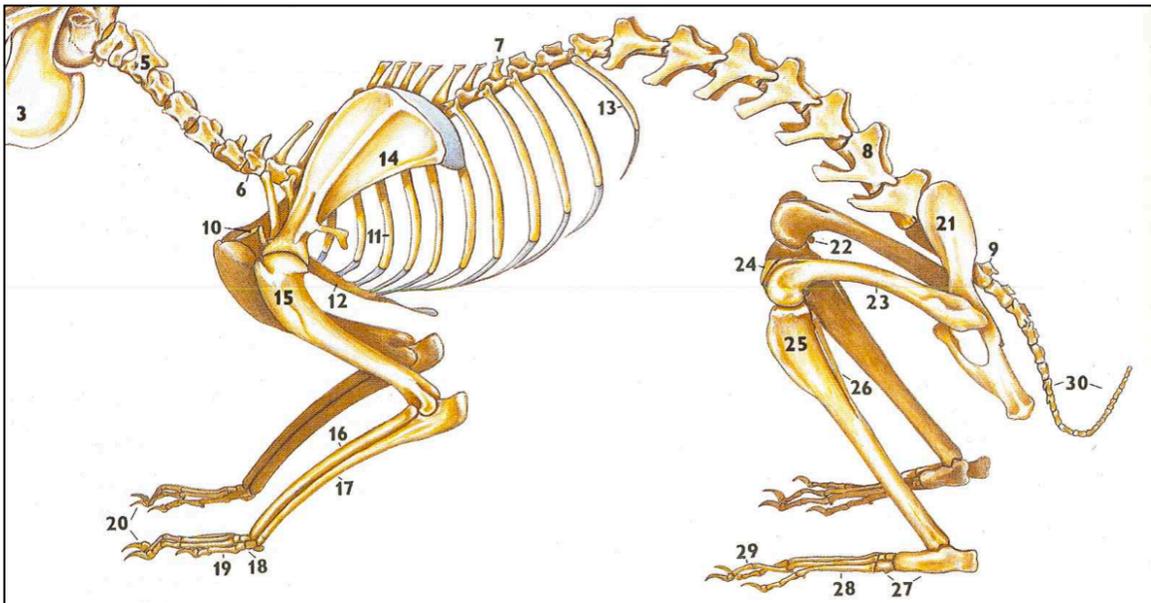


Figura 8. Dibujo de la visión lateral del esqueleto de un conejo. Modificada de "A Colour Atlas of Anatomy of small laboratory animals. Volume one: Rabbit-Guinea Pig. Popesko P, Ratjová V, J Horák J" [24].

Aunque en el conejo el segmento lumbar lo constituyen siete vértebras lumbares

y en el humano sólo cinco, un análisis de anatomía comparada entre humano y conejo demuestra similitudes morfológicas. Siendo las semejanzas anatómicas 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 láminas (Figura 8-10).

Las estructuras neurales que surgen de este nivel forman el plexo lumbosacro. Se divide en el plexo lumbar, del cual se origina el nervio femoral y el plexo sacro del que se origina el nervio ciático. La unión del quinto y sexto nervio lumbar dan lugar al nervio femoral. El nervio ciático está formado principalmente por el séptimo nervio lumbar y el primer nervio sacro.



Figura 9. Vista superior, inferior, lateral y frontal de un segmento de movilidad espinal formada por 2 vértebras lumbares de conejo.

A diferencia del humano donde el cono medular llega hasta la primera vértebra lumbar, en el conejo puede llegar caudalmente hasta la segunda vértebra sacra. Otra diferencia a tener en cuenta es que en algunos animales se puede encontrar grasa acumulada en el tejido subcutáneo, en cambio en el conejo puede existir, pero en poca cantidad [25].

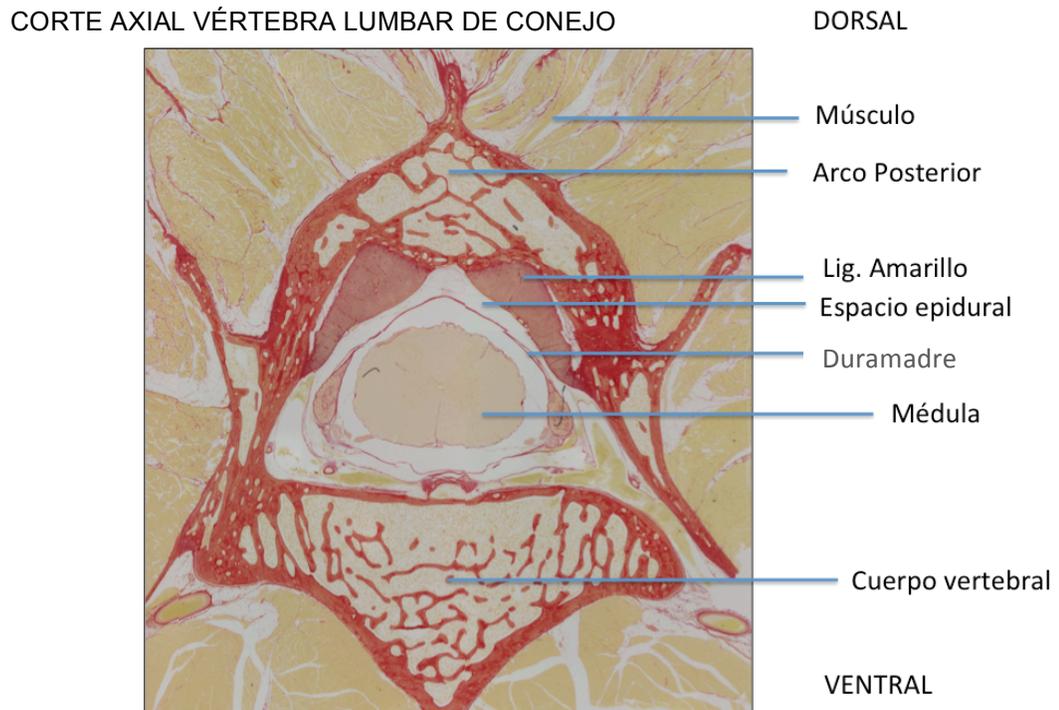


Figura 10. Visión axial de un corte histológico de vértebra lumbar de conejo teñida con Rojo Sirio.

2.2 Tratamiento de las afecciones lumbares

2.2.1 Tratamiento conservador

El programa de tratamiento inicial ante un trastorno no específico consiste en reposo (menos de 3 días), medicación oral con analgésicos y antiinflamatorios,

rehabilitación y programas de potenciación muscular. Entre el 10-20 % de los pacientes el dolor persiste o es recurrente, afectando de manera importante a su calidad de vida, requiriendo tratamientos adicionales. En este punto se considera estudiar una etiología anatómica, por lo que los estudios complementarios de elección son la radiografía simple y la resonancia magnética nuclear. Los resultados de estas pruebas deben correlacionarse con la clínica ya que existe una alta prevalencia de alteraciones morfológicas en la columna en personas asintomáticas, indicando que la correlación entre el dolor y la anomalía estructural es débil [8].

Otros métodos de tratamiento, como las infiltraciones a nivel de la columna, pese a tener poca evidencia científica son usados profusamente ya que son procedimientos mínimamente invasivos [26-29].

- La infiltración de raíces nerviosas lumbares y cervicales es la más común. Basado en que el origen del dolor en casos donde existe un compromiso radicular no solo se produce por la compresión mecánica sino también se puede deber a la irritación producida por citoquinas proinflamatorias, éste tipo de infiltraciones se realizan para disminuir el componente inflamatorio del compromiso radicular.
- Los bloqueos epidurales, con una indicación comparable al de los bloqueos de raíces, tienen como objetivo el disminuir el componente inflamatorio del compromiso neural. En comparación con los bloqueos radiculares, presenta ciertas ventajas en casos donde están implicados múltiples niveles o va acompañado de dolor no específico en la

extremidad.

- Las infiltraciones facetarias se utilizan como procedimiento diagnóstico así como terapéutico para disminuir el dolor cuyo origen son las facetas posteriores.

Ante el fracaso de este tipo de tratamientos es posible recurrir al tratamiento quirúrgico.

2.2.2 Tratamiento quirúrgico

La alta prevalencia de patología del raquis, ha propiciado el desarrollo de gran variedad de opciones terapéuticas. El tratamiento quirúrgico de la patología de la columna vertebral está en auge debido a la mejora de los métodos diagnósticos, al uso de nuevos instrumentales quirúrgicos y técnicas quirúrgicas que implican una menor agresividad y riesgo para el paciente.

El tratamiento quirúrgico debe ser planteado cuando exista una lesión que se pueda corregir de manera quirúrgica y no haya mejorado tras un tratamiento conservador adecuado. Un paciente que presente un déficit neurológico progresivo, dolor intratable o síndrome de cauda equina es susceptible de tratamiento quirúrgico.

Cada año, más de 1 millón de personas en todo el mundo se someten a una cirugía lumbosacra tras presentar una hernia de disco, haciendo que sea uno de los tratamientos quirúrgicos más comunes en la patología de la columna vertebral [30].

Unos de los procedimientos quirúrgicos más frecuentemente empleados en la patología degenerativa de la columna son la artrodesis, la laminotomía y la laminectomía (Figura 11, 12).

2.2.3 Complicaciones del tratamiento quirúrgico

Las complicaciones postquirúrgicas encontradas en varios tipos de tratamientos quirúrgicos del raquis se pueden dividir en tempranas y tardías. Las complicaciones tempranas incluyen lesiones de raíces nerviosas, fuga de líquido cefalorraquídeo, infecciones, lesiones vasculares o intestinales [31]. Las complicaciones tardías incluyen la inestabilidad segmentaria y según algunos autores el “síndrome de fracaso de la cirugía de columna” [32].

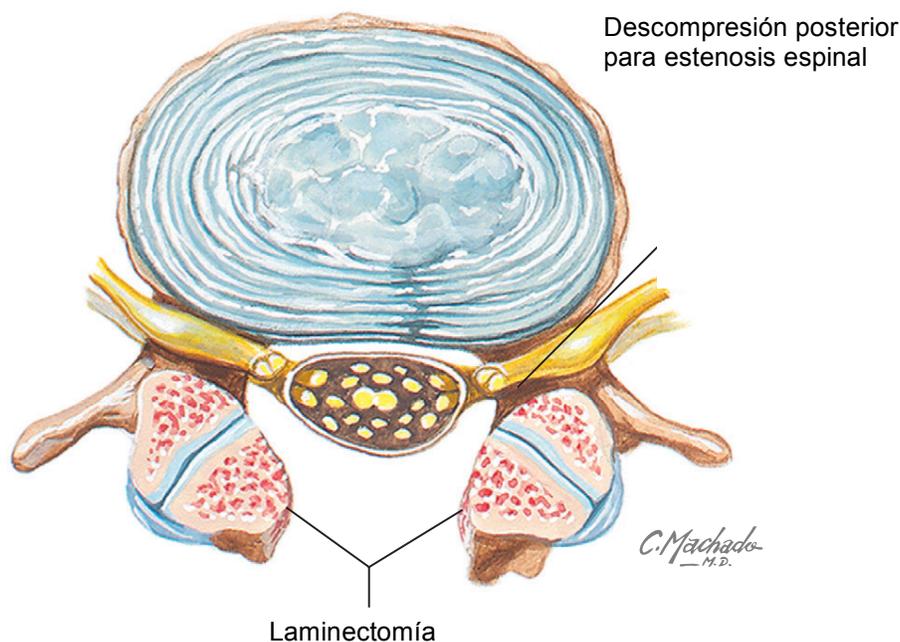


Figura 11. Visión axial de una laminectomía. Modificada de “The Netter Collection OF MEDICAL ILLUSTRATIONS **Musculoskeletal System**. Part II—Spine and Lower Limb. 2nd Edition” [33].

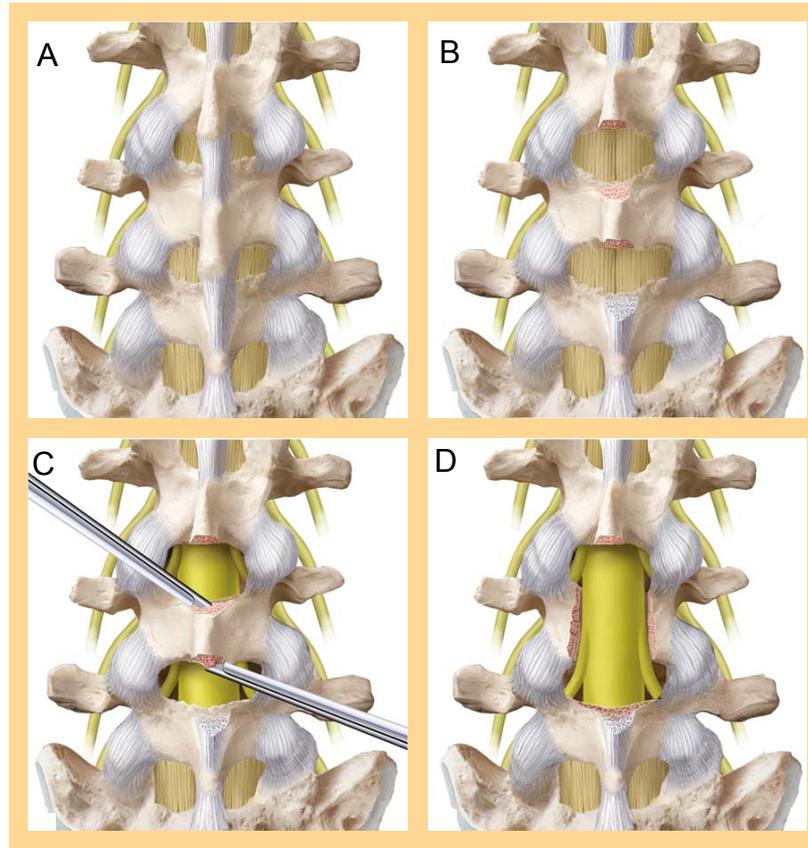


Figura 12. Descompresión de una estenosis lumbar. **A**, Un abordaje a través de la línea media expone la ventana interlaminar entre L3/4 y L4/5 y las articulaciones facetarias para descomprimir una estenosis lumbar a esos niveles. **B**, Se resecan los ligamentos supra e interespinosos conservando la apófisis espinosa. Se realiza una ventana interlaminar con una Kerrison y se reseca el hueso que provoca la compresión junto con el ligamento amarillo hipertrofiado. **C**, La zona más estrecha de la estenosis es siempre profundo a la lámina, por lo que se reseca la zona más caudal (laminotomía). **D**, En algunos casos, para obtener una adecuada descompresión es necesario resecar la totalidad de la lámina (laminectomía).
Modificada de “Norbert Boos · Max Aebi (Editors) Spinal Disorders Fundamentals of Diagnosis and Treatment. ISBN 978-3-540-40511-5 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York” [8].

2.2.4 La fibrosis epidural

Tras una intervención quirúrgica, al igual que tras cualquier lesión sobre tejidos vivos, se produce un proceso de reparación que puede derivar en una sobreproducción y depósito de componentes de matriz extracelular (MEC) formando una **cicatriz**. Cuando la cicatriz se forma sobre la duramadre recibe el nombre de fibrosis epidural. El sangrado y la manipulación del saco dural o las raíces durante la intervención favorece la formación de fibrosis epidural.

2.3 La fibrosis epidural como problema de la cirugía lumbar.

Estudios recientes indican que entre un 5 y un 50% de los pacientes a los que se les realice una intervención de columna fracasará en términos de resultados clínicos y de satisfacción obtenida. Este rango tan amplio refleja lo heterogéneo de las poblaciones a estudio, los diferentes criterios para evaluar el resultado y diferentes seguimientos empleados para la valoración [34]. La incidencia de reintervención tras una cirugía lumbar va desde un 4 a un 19% mientras que el ratio de éxito tras una segunda, tercera o cuarta intervención cae hasta un 30, 15 y un 5% respectivamente [35, 36].

La fibrosis epidural favorece que las siguientes intervenciones sean más dificultosas y precisen más tiempo, lo cual puede aumentar el riesgo de complicaciones tales como lesión nerviosa, roturas durales, inestabilidad iatrogénica e infección.

Un diagnóstico correcto se puede obtener hasta en un 90% de los pacientes con

dolor crónico postquirúrgico en casos de deformidad y estenosis. La falta de mejoría en pacientes tras un procedimiento quirúrgico puede ser debido a un diagnóstico incorrecto, una descompresión inadecuada o por temas relacionados con una ganancia social o psicológica. Si en cambio, han presentado mejoría durante un intervalo de tiempo de semanas tras la intervención, se puede considerar el diagnóstico de recurrencia de la hernia discal y si es tras un intervalo de meses o años, se debe considerar una recurrencia de la estenosis, hernia discal o patología a otro nivel [22]. El significado clínico de la fibrosis epidural es un tema debatido, ya que la formación de tejido cicatricial es inevitable en todos los casos y su implicación en el dolor postoperatorio no es entendida completamente. Hay teorías que explican que simplemente la presencia de una fibrosis epidural puede provocar sintomatología y se conoce como “failed back surgery syndrome” o “síndrome de fracaso de la cirugía de columna” [20]. No existe una correlación 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 tal y como se observó comparando la cantidad y extensión de fibrosis observada en las resonancias magnéticas con contraste entre dos grupos de pacientes intervenidos mediante discectomía lumbar, donde se observó formación de cicatriz epidural tanto en los pacientes que, tras la intervención se encontraron asintomáticos, como en los que persistieron con sintomatología [34].

Los defensores del “síndrome de fracaso de la cirugía de columna” argumentan que la aparición de un tejido fibroso-cicatricial entorno a los elementos nerviosos

medulares y radicales ocasionaría una irritación continua de los mismos, alteraría el adecuado intercambio de nutrientes y restos catabólicos y limitaría la movilidad de los elementos neurales generando de esta forma la aparición de dolor [35]. Aunque también pueden verse implicados en el dolor de este síndrome de fracaso de la cirugía de columna otra serie de factores como son un inadecuado diagnóstico inicial, errores de la técnica quirúrgica, manipulación del saco dural y raíces, presencia de inestabilidades del raquis secundarias a la cirugía, infecciones y aparición de nueva patología en un nivel diferente al intervenido previamente [36].

En el sentido más estricto, solo los síntomas residuales tras un correcto diagnóstico y tratamiento quirúrgico se considerarían parte del síndrome de fracaso de la cirugía de columna y su incidencia se calcula que está entre el 10 y el 40% de los pacientes intervenidos [37].

Algunos autores consideran que el dolor neuropático caracterizado por disestesias y dolor urente, que no suele modificarse con la actividad física, se le atribuye a esta fibrosis epidural. Aunque la formación de cicatriz y adherencias ocurre de forma universal tras un tratamiento quirúrgico de columna, el papel de la fibrosis epidural como origen de este dolor es difícil de determinar, ya que todos los pacientes generan fibrosis y no todos tienen dolor [38].

En unidades del dolor se utilizan diferentes modalidades para tratar esta patología, incluyendo Pregabalina y Gabapentina, antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la captación de la serotonina, antiinflamatorios, cannabis,

suplementos dietéticos, relajantes musculares, neuromoduladores, estimulación de la médula espinal, bombas de morfina intratecales, opioides orales y agentes tópicos. El empleo de una evaluación psicológica y su tratamiento siempre se deben incorporar en estas clínicas. Aún en el contexto apropiado, el tratamiento del dolor neuropático puede que sólo mejore parcialmente entre un 40 y un 60% de los pacientes [39].

Ya sólo por el riesgo de reintervención, sin tener en cuenta el “síndrome de fracaso de la cirugía de columna”, todas aquellas medidas encaminadas a eliminar o disminuir la producción de fibrosis epidural tendrán un claro beneficio para todos los pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico. El porcentaje de éxito tras la resección de la fibrosis es bajo, posiblemente entre 30-35% mientras que entre un 15 y un 20% de los pacientes refieren empeoramiento de su sintomatología. Por lo tanto, prevenir la formación de fibrosis es preferible a intentar tratarla [40].

2.4 Cicatrización

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, la invasión vascular y en la reacción inflamatoria de los tejidos blandos, fundamentalmente a nivel muscular, que recubren las estructuras neurales. Otros consideran que la lesión del disco intervertebral es el principal origen de adherencia epidural [41].

Actualmente una de las teorías más aceptadas es la propuesta por Songer *et al.*

proponen que la cicatriz alrededor de la duramadre se origina no sólo de la musculatura sacroespinal sino también por el anillo fibroso y el ligamento longitudinal posterior [42].

Al realizar el abordaje quirúrgico para acceder al canal neural 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 [43-46].

Los mamíferos presentan un potencial regenerativo limitado. En parte, el potencial regenerativo limitado de los mamíferos parece ser el resultado de la rápida interposición de tejido fibrótico que previene la regeneración tisular subsiguiente. Esta rápida interposición de tejido cicatricial probablemente confiere ventajas a la hora de sobrevivir previniendo la invasión de microorganismos infecciosos desde la herida e inhibiendo la deformación mecánica continuada de otros tejidos [47].

2.4.1 Fases y factores que influyen en la cicatrización

Al realizar el abordaje quirúrgico, al igual que cuando se lesionan la mayoría de los órganos de los mamíferos, la reparación normal del tejido ocurre en tres fases distintas que se superponen [47, 48]:

La primera fase de la reparación tras una lesión es la inflamación, ocurre de manera inmediata tras la lesión de un tejido, y se necesitan componentes de la cascada de coagulación, vías inflamatorias y el sistema inmunitario para prevenir una pérdida de sangre, para retirar tejidos muertos o desvitalizados y para prevenir la infección. La hemostasia se consigue inicialmente por la formación de un tapón plaquetario, seguido de la formación de una matriz de fibrina que se convierte en un andamiaje para las células infiltrantes posteriores. Los neutrófilos son reclutados a la herida en respuesta a la activación del complemento, la degranulación de las plaquetas y los productos de degradación de las bacterias. Tras 2-3 días, aparecen los monocitos en la herida que se diferencian en macrófagos. Se piensa que los macrófagos son cruciales para coordinar los eventos posteriores en la respuesta a la lesión, pero la importancia de los neutrófilos y macrófagos en la reparación de las heridas no se entiende completamente (Figura 13). Datos recientes sugieren, que por una redundancia en la respuesta inflamatoria, una deficiencia de cualquiera de estas estirpes celulares puede ser compensada. En la ausencia de las dos estirpes celulares, la reparación de heridas pequeñas puede ocurrir y la respuesta cicatricial es menor [47].

En resumen, la herida en esta fase se caracteriza por tener un ambiente isquémico, donde se forma un tapón de fibrina, y abundan los neutrófilos y las plaquetas. Las células inflamatorias y las plaquetas secretan factores de crecimiento y otras citoquinas (PDGF, TGF- β , y VEGF), así como óxido nítrico (NO), que estimulan el crecimiento del tejido de granulación [49]. Estos factores

de crecimiento regulan la migración celular, su proliferación, a la vez que perpetúan la cascada de reclutamiento celular y el incremento de la producción de proteínas de matriz extracelular por los fibroblastos.

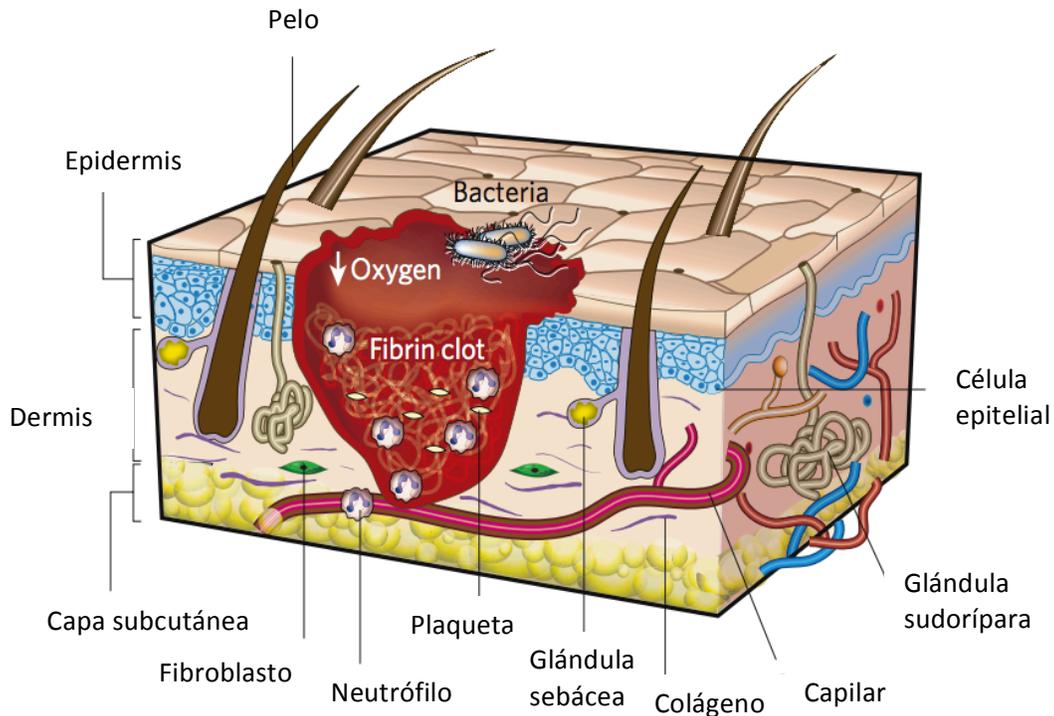


Figura 13. Primera fase de la reparación del tejido tras una lesión. Inflamación. Formación del tapón plaquetario para evitar la pérdida de sangre. Las células inflamatorias secretan citoquinas que estimulan la formación de tejido de granulación. Modificada de “Wound repair and regeneration, Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT, Nature 453 (2008) 314-21” [47].

La segunda fase de la reparación de heridas – fase proliferativa- ocurre entre el segundo y décimo día tras la lesión y se caracteriza por una proliferación y migración de diferentes estirpes celulares. En el caso de la piel, el primer evento

es la migración de queratinocitos sobre la dermis lesionada (la capa más interna de la piel). Luego se forman nuevos vasos sanguíneos (proceso denominado angiogénesis) y los capilares asociados a los fibroblastos y macrófagos reemplazan la matriz de fibrina con tejido de granulación que forma un nuevo sustrato para la migración de queratinocitos en estadios posteriores del proceso de reparación. Los queratinocitos que están por detrás de la primera línea proliferan, maduran y finalmente restauran la función de barrera de la epidermis. En la parte más tardía de esta fase, los fibroblastos, atraídos desde los bordes de la lesión, son estimulados por los macrófagos. Los fibroblastos juegan un papel esencial en esta fase, no sólo porque liberan citoquinas proinflamatorias sino porque algunos se diferencian a miofibroblastos, células contráctiles provistos de fibras de α -SMA que les dotan de propiedades contráctiles que con el tiempo juntan los bordes de la herida [50, 51]. Los fibroblastos y miofibroblastos interactúan y producen la matriz extracelular, mayoritariamente en forma de colágeno formando el grueso de la cicatriz madura (Figura 14) [47].

La tercera fase de la reparación de heridas -remodelación- comienza a las 2-3 semanas tras la lesión y puede durar 1 año o más. Durante esta fase, todos los procesos activados tras la lesión disminuyen progresivamente su actividad hasta su cese. La mayoría de células endoteliales, macrófagos y miofibroblastos se eliminan mediante apoptosis (muerte celular programada) o salen de la herida dejando una masa que contiene pocas células y consiste mayoritariamente de colágeno y otras proteínas extracelulares de matriz. Además, entre los 6 y 12 meses, la matriz acelular es activamente remodelada, teniendo inicialmente un

esqueleto predominantemente formado por colágeno tipo III pasando a otro compuesto por colágeno tipo I. Este proceso es llevado a cabo por metaloproteinasas de matriz que son secretados por los fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, y refuerzan el tejido reparado, aunque el tejido nunca vuelve a tener las propiedades del tejido no lesionado (Figura 15).

En el espacio intracanal, la cicatriz puede aumentar la adherencia de los tejidos disminuyendo la movilidad del saco dural y las raíces sobre el ligamento longitudinal posterior y las láminas.

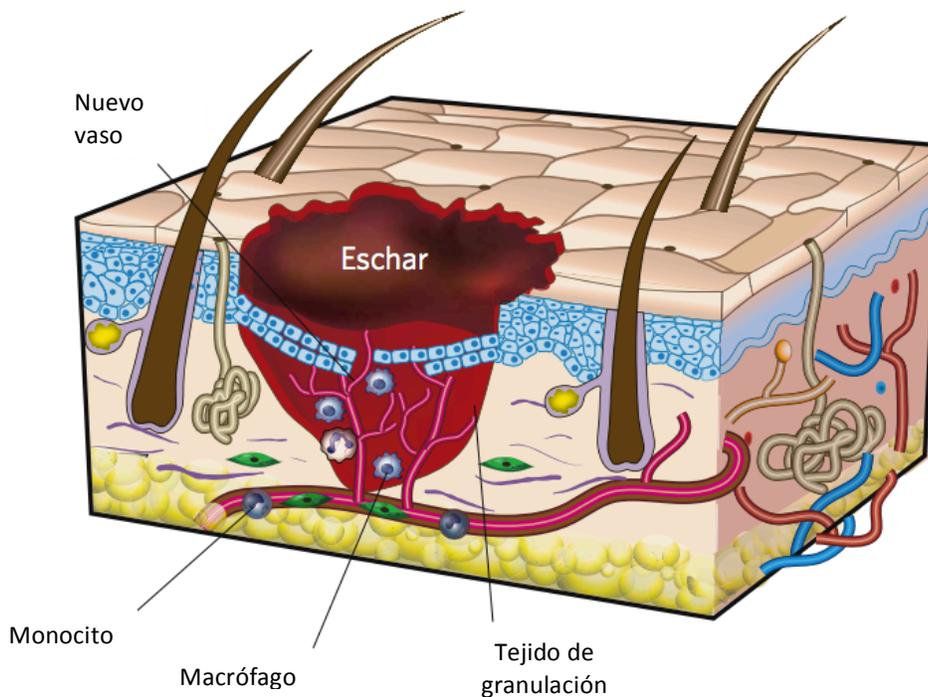


Figura 14. Segunda fase de la cicatrización. Formación de tejido nuevo. Se caracteriza por una proliferación y migración de diferentes estirpes celulares. Los fibroblastos y miofibroblastos interactúan y producen la matriz extracelular. Modificada de “Wound repair and regeneration Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT, Nature 453 (2008) 314-21” [47].

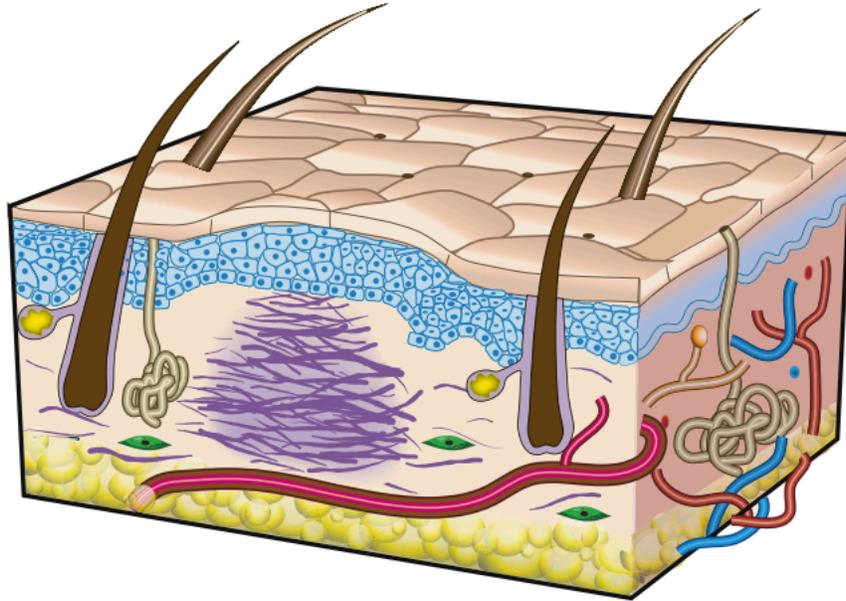


Figura 15. Tercera fase de la cicatrización, remodelado. Durante esta fase, todos los procesos activados tras la lesión se calman y cesan. El tejido nunca vuelve a tener las propiedades del tejido no lesionado. Modificada de “Wound repair and regeneration, Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT., Nature. 453 (2008) 314-21” [47].

Muchos de los pasos en el proceso de la cicatrización están poco caracterizados a un nivel molecular. Sin embargo, una amplia variedad de tipos celulares, proteínas de matriz, factores de crecimiento y citoquinas han sido estudiadas por su papel en la cicatrización [52]. Estos factores biológicos juegan un papel esencial para restaurar el defecto tisular tras una lesión. Sin embargo, este

proceso es dinámico y el resultado final se basa en la comunicación entre los diferentes componentes. Ninguno de estos factores actúa de forma aislada en este proceso de cicatrización y a través de mecanismos paracrinos o autocrinos afectarán al proceso de cicatrización. Estos elementos regulan la producción de citoquinas, tanto proinflamatorias como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-21, TGF- β , PDGF, CTGF, IFN II o antiinflamatorias como IL-12, IFN α , IFN γ , bFGF; que promueven la producción, depósito y degradación de componentes de la matriz extracelular, la diferenciación y apoptosis celular (Tabla 1 y 2).

Uno de los factores más importantes que inician la fibrosis epidural es el TGF- β (Factor de crecimiento transformante β , Transforming Growth Factor β en inglés) con un amplio rango de efectos en diferentes células y tejidos en el cuerpo.

2.4.2 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

El TGF- β es una citoquina multifuncional con un gran número de efectos biológicos, como la regulación del crecimiento celular, la diferenciación celular y la inmunomodulación entre otros procesos [53-55]. Las primeras actividades biológicas observadas del TGF- β sugerían un papel en la transformación de células normales en malignas así como en el desarrollo tumoral [56]. Actualmente está bien establecido que la actividad de esta citoquina no está restringida a células tumorales, ejerciendo una gran variedad de actividades biológicas en muchos tipos celulares y regulando muchos procesos fisiológicos.

En humanos se han descrito tres isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3), siendo el TGF- β 1 la isoforma más ubicua del organismo (Figura 16) [57].

Tabla 1. Tipos celulares implicados en el proceso de cicatrización.

Elemento	Mecanismo	Efecto	Referencia
CD4+(Th-2)	Producción de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-21, expresión de Colágeno tipo I (Col-I), Col-III, Lisil arginasa-1, Lisil oxidasa, MMP-2, MMP-9 y TIMP-1	Profibrótico	[52]
CD4+(Th-1)	Producción de IL-12, IFN- γ , activación de la NO sintetasa	Antifibrótico	[52]
Fibroblasto	Producción de IL1, IL6, IL10, TNF- α , TGF- β , PDGF, IGF-I, bFGF, deposición de fibronectina, Col-I, Col-III profibrótico, disminuye actividad de la colagenasa	Profibrótico	[58]
Miofibroblasto	Aumenta actividad del fibroblasto	Profibrótico	[50]
Fibrocyto	Producción de TGF- β 1, aumenta producción de colágeno, proteoglicano, versican. Disminuye producción de SLRP	Profibrótico	[51]
Macrófago	Producción de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TGF- β .Producción de citoquinas antiinflamatorias.	Profibrótico Antifibrótico	[52]
Plaqueta	Recluta células inflamatorias. Produce TGF- β , IGF-I, EGF	Profibrótico	[49]
Célula mastoide	Producción de IL-4, TGF- β 1, TNF- α	Profibrótico	[49]
BM-MSc	Aumenta la actividad de los fibroblastos dermales profundos	Profibrótico	[59]

Modificada de “Effect of P144 (Anti-TGF- β) in an in vivo human hypertrophic scar model in nude mice. Shan Shan Qiu, 2015” [48].

Tabla 2. Citoquinas y factores de crecimiento, proteínas y genes implicados en cicatrización.

Elemento	Origen	Mecanismo	Efecto	Referencia
TGF- β	Plaquetas, fibroblastos	Promueve la síntesis de colágeno, induce diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, aumenta la MEC	Pro-fibrótico	[60]
PDGF	Plaquetas	Proliferación de fibroblastos. Secreción de MEC, diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos	Pro-fibrótico, cicatrización	[52]
VEGF	Plaquetas	Su desregulación induce la formación de cicatrices hipertróficas	Pro-fibrótico	[52]
bFGF	Plaquetas	Disminuye producción de Col-I	Anti-fibrótico	[58]
FGF		Aumenta el metabolismo, mejora la cicatrización, regula la respuesta inflamatoria	Cicatrización	[61]
CTGF		Aumenta síntesis de fibronectina, Col-I, α -SMA	Pro-fibrótico	[62]
IFN II	Célula T	Inhibición de la síntesis de colágeno	Pro-fibrótico	[52]
SDF-1		Quimiotáctico para linfocitos, monocitos y fibrocitos. Angiogénico	Pro-fibrótico	[63]
Angio-I		Producción de TGF- β , diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto, migración de queratinocitos.	Pro-fibrótico	[49]
Angio-II		Aumenta acciones antifibróticas	Anti-fibrótico	[49]
Decorina		Disminuye formación de fibrillas de colágeno y entrecruzamiento. Disminuye formación de α -SMA y PAI-1 <i>in vitro</i>	Anti-fibrótico	[64]

Modificada de "Effect of P144 (Anti-TGF- β) in an in vivo human hypertrophic scar model in nude mice. Shan Shan Qiu, 2015" [48].

Tabla 2 (continuación). Citoquinas y factores de crecimiento, proteínas y genes implicados en cicatrización.

Elemento	Origen	Mecanismo	Efecto	Referencia
CBPG	Fibroblasto	Inhibición del TGF- β <i>in vitro</i>	Anti-fibrótico	[65]
Versican	Fibroblasto	Aumenta adherencia, migración y proliferación	Pro-fibrótico	[66]
Periostin		Fibrilogénesis de Col-I	Pro-fibrótico	[64]
PAI-1		Producción de IL4, TGF- β	Pro-fibrótico	[49]
LH-2b		Cross-linking de las fibrillas de colágeno	Pro-fibrótico	[50]
TRP		Aumenta síntesis de Col-III	Pro-fibrótico	[67]
Thy-1 o CD-90		Disminuye diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos	Anti-fibrótico	[65]
CAV-1		Disminuye actividad del TGF- β	Anti-fibrótico	[68]
TLR		Producción de citoquinas y quimoquinas	Pro-fibrótico	[69]
BMP-7		Efecto profibrótico	Pro-fibrótico	[70]
Genes Wnt		Disminuye la expresión de α -SMA, Col-I, Col-III	Anti-fibrótico	[71]
PTEN		Inhibición de la síntesis de colágeno	Anti-fibrótico	[72]

Las isoformas del TGF- β están implicadas en procesos de desarrollo y diferenciación, inhiben el crecimiento de células epiteliales y endoteliales, así como las funciones inmunitaria y hematopoyética, promueven el crecimiento del tejido conectivo, favorecen la quimiotaxis de fibroblastos, macrófagos, linfocitos y estimulan la reparación de tejidos [73]. También se las ha relacionado con procesos patológicos, como la producción excesiva de MEC que desencadena fibrosis tisular, y la síntesis de otros factores de crecimiento [74, 75].

La secuencia de aminoácidos del TGF- β 1 humano fue originalmente descrita por Derynck en 1985. Posteriormente, y a raíz de una extensa caracterización de proteínas y análisis de DNA complementario, surgió un extenso grupo de proteínas estructuralmente relacionadas entre sí y agrupadas en la llamada “superfamilia de TGF- β ” que engloba, además de las isoformas del TGF- β , a las activinas y proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) [76].

El TGF- β es secretado por las células en forma latente y es activado por ruptura proteolítica antes de unirse a una célula diana (Figura 16) [77, 78].

La unión de la forma activa del TGF- β a su receptor, un heterodímero transmembrana con actividad cinasa compuesto de cadenas receptoras de TGF- β tipo I y receptoras de TGF- β tipo II, inicia la fosforilación del receptor del TGF- β tipo I en su localización citoplasmática para a continuación fosforilar a las proteínas reguladoras del receptor SMAD-2 y SMAD-3. Estas proteínas SMAD, una vez fosforiladas, se unen a la proteína co-estimuladora SMAD-4 y este

complejo es traslocado al núcleo donde pueden iniciar la transcripción de genes específicos (Figura 17) [79-81].

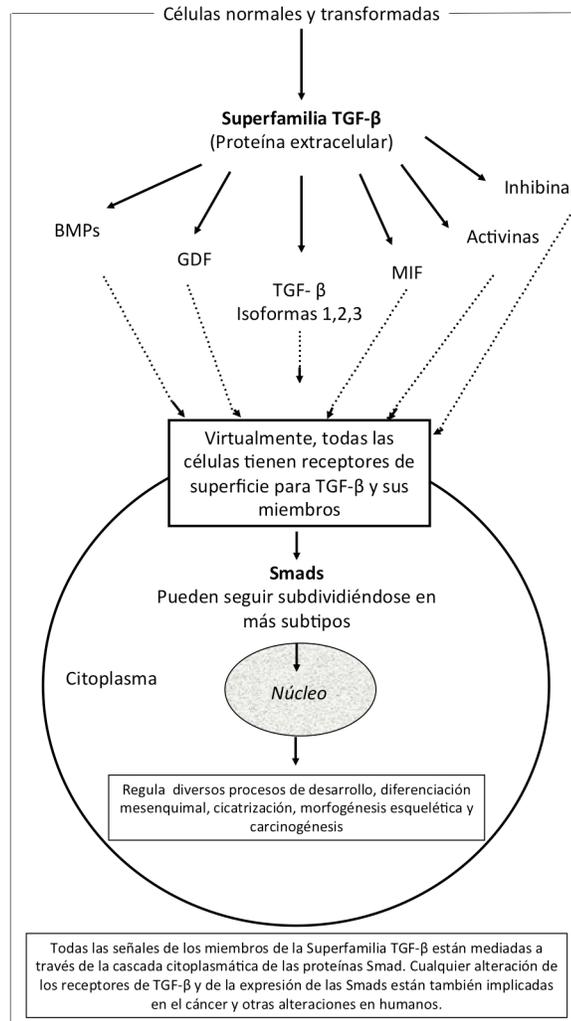


Figura 16. Superfamilia de TGF-β y mecanismo de acción. Modificado de “What is Transforming growth factor-beta (TGF-β). Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery (2004) 57, 215–221” [73]

La expresión y activación del TGF-β1 se regula a varios niveles. En primer lugar existe un control transcripcional, donde existen distintos elementos reguladores

que gobiernan la expresión tanto de las diferentes isoformas del TGF- β como de sus receptores. Además, existen mecanismos post-transcripcionales que controlan la disponibilidad del TGF- β activo, el acceso a los receptores y la actividad de esos receptores [73].

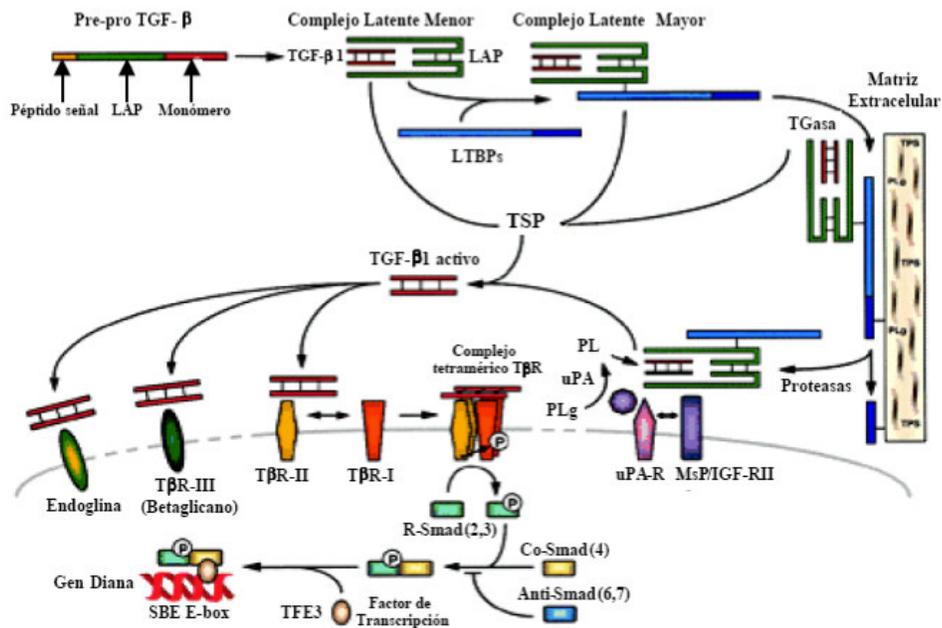


Figura 17. Secreción, latencia y activación del TGF- β 1. Diagrama del proceso de secreción, latencia y activación del TGF- β 1, así como de la interacción con sus receptores y la consiguiente transducción de la señal al núcleo celular. Modificada de “Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis, Fortunel NO, Hatzfel A, Hatzfel JA, Blood (2000) 96 2022-36” [78].

Se observan cantidades aumentadas de TGF- β en heridas que curan a través de formación de cicatriz, en oposición con la regeneración de tejidos [82]. Este hallazgo ha motivado la búsqueda de anticuerpos y pequeñas moléculas

dirigidas hacia el TGF- β y otros mediadores pro-inflamatorios para bloquear su señalización y en consecuencia la formación de cicatrices [48, 83-85].

Los principales tipos celulares responsables de la cicatrización, entre los que se encuentran linfocitos T, macrófagos, células de músculo liso, células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales, producen TGF- β . Entre estas células los fibroblastos son el tipo celular predominante involucrado en la cicatrización. Una cantidad excesiva de TGF- β estimula la proliferación de los fibroblastos, su diferenciación en miofibroblastos y acelera la producción de matriz extracelular. Además, los miofibroblastos producen un depósito anormal de proteínas de matriz extracelular, resultando en fibrosis [86].

Estudios histológicos recientes en rata, utilizando Decorina de forma tópica sobre el espacio epidural, sugieren que la inhibición de la cascada de señalización a través del TGF- β da como resultado una disminución de la fibrosis epidural en columnas laminectomizadas [87].

2.4.3 Colágeno

Como se ha comentado anteriormente el tejido fibrótico está compuesto de manera fundamental por colágeno, que está presente en cantidad variable en todos los tipos de tejido conjuntivo. El colágeno es producido principalmente por los fibroblastos aunque también por otras estirpes celulares especializadas como tenocitos, condrocitos y osteoblastos. El colágeno se forma como una proteína precursora, 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 (α), cada una de ellas constituida por un polipéptido de un peso molecular de alrededor de 100.000 Da, formado por una repetición en tándem de tres aminoácidos (G-X-Y) siendo la G glicina seguida de otros dos aminoácidos X e Y que son cualquier aminoácido, aunque existe preferencia por la prolina e hidroxiprolina. 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 [88].

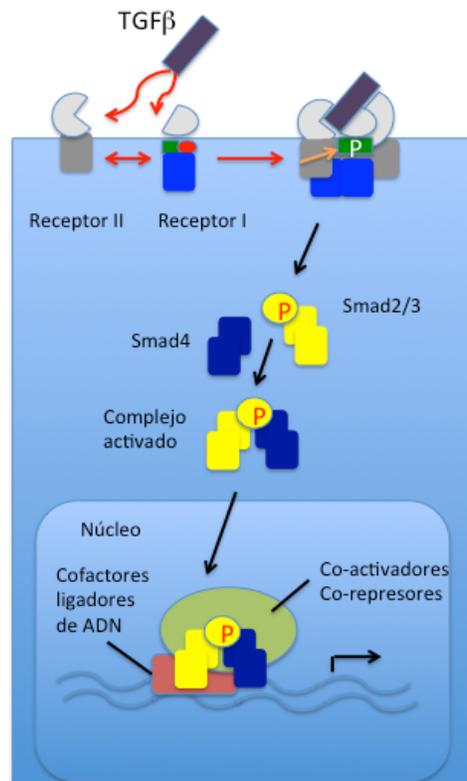


Figura 18. Unión de la forma activa del TGF- β a su receptor. Fosforilación del receptor del TGF- β tipo I y de las proteínas reguladoras del receptor SMAD-2 y SMAD-3. Unión a la proteína co-estimuladora SMAD-4 y translocación de este complejo al núcleo. Modificada de "The Logic of TGF- β signaling, Massagué J, Gomis RR Febs letters (2006) 580 2811-20" [89].

El colágeno no es una proteína única, se considera una familia de moléculas estrechamente relacionadas, pero genéticamente distintas, describiéndose múltiples tipos de colágeno. Es la proteína más abundante del mundo animal, siendo cuatro los principales, pero sólo dos juegan un papel clave en los mecanismos de cicatrización, colágeno tipo I y III [90]. En la fase proliferativa temprana, la expresión de colágeno tipo III es más abundante pero conforme avanza la fase proliferativa y al inicio de la fase de remodelado las fibras de colágeno tipo I reemplazan las fibras de colágeno III otorgándole mayor resistencia.

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 α de dos tipos, que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y en su secuencia. A uno de los cuales se designa como cadena $\alpha 1$ y al otro, cadena $\alpha 2$. Es sintetizado entre otros por fibroblastos, condrocitos, tenocitos y osteoblastos. Su propiedad principal es la de resistencia a las fuerzas de tensión [91, 92].

Colágeno tipo II: Se encuentra sobre todo en el cartílago articular, pero también está presente en la córnea embrionaria, en la notocorda, en el núcleo pulposo y en el humor vítreo del ojo. En el cartílago articular, 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 α de un único tipo. Es sintetizado por el condrocito. Su principal propiedad es la resistencia a la presión intermitente [91, 92].

Colágeno tipo III: Abunda en el tejido conjuntivo laxo, en las paredes de los vasos sanguíneos, en la dermis de la piel y en 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 α . Es sintetizado por las células del músculo liso, fibroblastos y glía. Su función es la de sostén de los órganos expandibles [91, 92].

Colágeno tipo IV: Es el colágeno que forma la lámina basal que subyace a los epitelios. Es un colágeno no fibrilar, que forma un filtro de moléculas orientadas al azar, asociadas a proteoglicanos y con las proteínas estructurales laminina y fibronectina. Es sintetizado por las células epiteliales y endoteliales. Está constituido por hasta 3 cadenas α de los que existen hasta 6 tipos (α 1-6). Su función principal es la de sostén y filtración [91, 92].

El disco intervertebral está formado mayoritariamente por colágeno tipo I, sobretodo en el anillo fibroso, y colágeno tipo II en el núcleo pulposo [93].

2.5 Prevención y tratamiento de la fibrosis epidural

Cada vez se utilizan técnicas quirúrgicas menos agresivas, con el objetivo de disminuir el sangrado y el daño tisular. Así se espera que tanto la lesión como la reacción inflamatoria asociada a la misma sean menores resultando en una

reducción de la fibrosis.

En la práctica clínica, para prevenir la fibrosis epidural, la interposición de tejido graso es el procedimiento más utilizado. Aunque este procedimiento no está libre de complicaciones y tiene el potencial de producir compresión a nivel de la raíz nerviosa o de la médula. Alternativamente, para prevenir la fibrosis epidural se han utilizado diferentes barreras mecánicas basadas en biomateriales o terapias antiinflamatorias con resultados limitados o variables [94-109]. Se han utilizado diferentes fármacos como la Mitomicina C, Dexametasona, 10-Hidroxicamptotecina, Rosuvastatina, Azitromicina e inhibidores de COX-2 [110-115]. También se ha descrito el uso de sustancias como CCN5 (proteína de la familia de los factores de crecimiento del tejido conectivo) para inhibir factores de crecimiento, disminuyendo la proliferación celular inducida por TGF- β 1 [116].

Otras estrategias utilizadas han sido dosis bajas de radiación, autoinjertos óseos y materiales poliméricos biodegradables a modo de barrera mecánica o como vehículos para la aplicación controlada de fármacos [101, 117].

Un material ideal para prevenir la fibrosis epidural debería ser capaz de minimizar los riesgos de compresión neurológica, no interferir en la cicatrización del tejido circundante. Tendría que ser biocompatible para poder minimizar la respuesta inflamatoria y la reacción a cuerpo extraño. Debería estar comercializado y tener un precio asequible.

2.5.1 Péptido P144[®]

El P144[®] (Polypeptide Group, Strasbourg, Francia) es un péptido sintético de 15 aminoácidos con efecto anti TGF- β que se fabricó mediante el método de síntesis química en fase sólida. Deriva de una región idéntica del receptor de TGF- β tipo III humano (Betaglicano, aminoácidos 730-743, TSLDASIIWAMMQN, SwissProt número Q03167), el cual es capaz de bloquear la unión del TGF- β con su receptor celular por un mecanismo extracelular [48, 118].

P144[®] ha demostrado disminuir la fibrosis cuando se ha utilizado en modelos animales de fibrosis hepática, esclerosis cutánea inducida por bleomicina y en fibrosis periprotésica de silicona [118-120]. Por otra parte, se ha descrito un efecto preventivo del P144[®] en fibrosis miocárdica, mediante la inhibición de la síntesis y entrecruzamiento de colágeno tipo I TGF- β -dependiente en fibroblastos cardíacos de ratas hipertensas [121]. Así mismo, P144[®] ha demostrado un marcado efecto inmunomodulador al inhibir la activación de linfocitos T reguladores TGF- β -dependiente en modelos experimentales de cáncer en ratón [122].

2.5.2 Barreras mecánicas en la inhibición de la fibrosis epidural

La aplicación de barreras mecánicas que cubran el espacio epidural, para bloquear la migración de células inflamatorias desde las capas más superficiales hacia el espacio epidural, pueden potencialmente prevenir o disminuir la formación de fibrosis.

Adcon L[®] (Gliatech Inc., Cleveland, OH, EE. UU.) y DuraGen[®] (Integra Neurosciences, Plainsboro, NJ, EE. UU.) han demostrado buenos resultados en la prevención de la fibrosis epidural en otros estudios [104, 123-125].

Adcon L[®] es una matriz de gel reabsorbible (Figura 19), que forma una lámina temporal, obtenida al combinar un material reabsorbible derivado del colágeno (gelatina porcina) con un éster poliglicano reabsorbible. Funciona creando una barrera física a ciertas células y moléculas incluyendo fibroblastos. Se absorbe completamente a las 4 semanas. Fue aprobado por la FDA en 1997 para evitar adherencias en la cirugía de columna, posteriormente en noviembre 2002 la FDA de EE. UU. volvió a realizar una revisión científica de las aplicaciones del Adcon L[®]. En marzo de 2003 Wright Medical Group Inc. compró la tecnología del Adcon L[®] Gel a Gliatech [124, 126, 127]. Posteriormente en agosto de 2007 fue comprado por Aap Implantate AG. Finalmente Bioscompass adquirió Adcon L[®] en octubre de 2014.



Figura 19. Presentación de Adcon L[®] en el formato gel.

DuraGen[®] es una esponja de colágeno, comúnmente utilizada como injerto dural, que permite la infiltración de fibroblastos, utilizando los poros de la matriz de colágeno a modo de andamio para que se pueda depositar colágeno nuevo y

se reabsorbe en 6-8 semanas (Figura 20). Es un colágeno reticulado esponjoso de origen químico obtenido de tendón bovino, forma una capa de separación entre la dura y los tejidos que la cubren y entre sus indicaciones tiene la de inhibir la fibrosis peridural postquirúrgica tras diferentes procedimientos como laminectomías, laminotomías o discectomías donde las raíces nerviosas quedan expuestas [104, 128, 129].

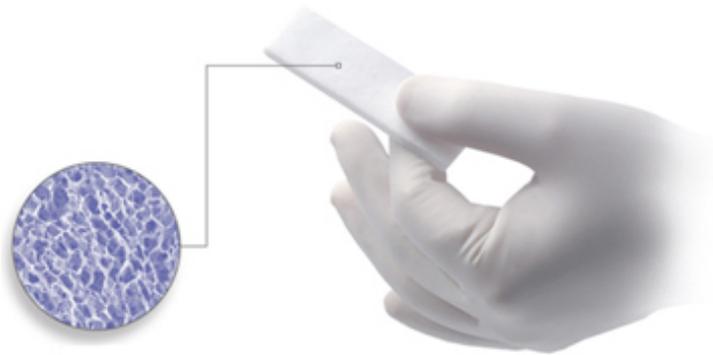


Figura 20. Aspecto macroscópico y microscópico del DuraGen®. Matriz de colágeno reabsorbible, porosa, indicada en cirugía de columna como sustituto de duramadre y como capa de separación entre la duramadre y los tejidos que se encuentran sobre ella. En estado seco puede cortarse a la forma deseada. Tiene un lado liso que se aplica sobre la médula. Es un injerto de aposición y no precisa suturas. <http://promedicamx.avancesredlatitud.com/wp-content/uploads/2017/03/Duragen.png>



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Tras realizar una laminectomía en conejo el uso del péptido inhibidor del TGF- β 1 (P144[®]) y los métodos de barrera utilizados en el estudio actuarán localmente inhibiendo la formación de fibrosis en el espacio epidural.

3.2 OBJETIVOS

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

1. Confirmar un modelo experimental de fibrosis epidural tras cirugía de columna en conejo.
2. Valorar el efecto de materiales de barrera mecánica (Adcon L[®] y DuraGen[®]) y el péptido sintético anti TGF- β (P144[®]) sobre la formación de la fibrosis epidural y comparar los resultados con el grupo control.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales y grupos

Todos los procedimientos realizados en el estudio que involucraron animales están en concordancia con los estándares éticos de la Universidad de Navarra y aprobados por el comité ético de animales experimentales de la Universidad de Navarra con número CEEA 131/10.

Previo a este proyecto de tesis, realizamos la puesta a punto del modelo animal para valorar el tejido cicatricial tras una laminectomía en conejo. Utilizamos 5 conejos de 2-3 kg y observamos una neoformación ósea cubriendo el defecto de la laminectomía al sacrificarlos a las 4 semanas, por lo que se decidió utilizar otros 5 conejos adultos de 4-5 kg observando formación de tejido cicatricial fibroso a las 4 semanas.

En este estudio se realizó una laminectomía L6 a cuarenta conejos machos, estirpe Nueva Zealand White (Granja San Bernardo, Navarra), con un peso entre 4-5 kg.

Se crearon 4 grupos experimentales:

1. **Grupo Control:** La laminectomía se irrigó con suero salino (n=10).
2. **Grupo GCP:** Se administró Adcon L[®] 3g en el lugar de la laminectomía cubriendo el defecto uniformemente, rellenando el defecto hasta la altura de la superficie ventral de la lámina vertebral (1 ml) (n=10) (Figura 21).

3. **Grupo CS:** Se aplicó una lámina recortada de Duragen[®] para encajar en el defecto de la laminectomía aproximadamente de 0,7x2 cm (n=10) (Figura 22).
4. **Grupo iTGF β :** Se administró péptido P144[®] (Polypeptide Group) en el lugar de la laminectomía cubriendo el defecto uniformemente (n=10). P144[®] fue forzado para alcanzar su máxima solubilidad preparando una solución buffer de carbonato de sodio a 5mg/ml en 1 M, con un pH 9.5, creando un gel que se aplicó en el espacio de la laminectomía (1 ml) (Figura 23).

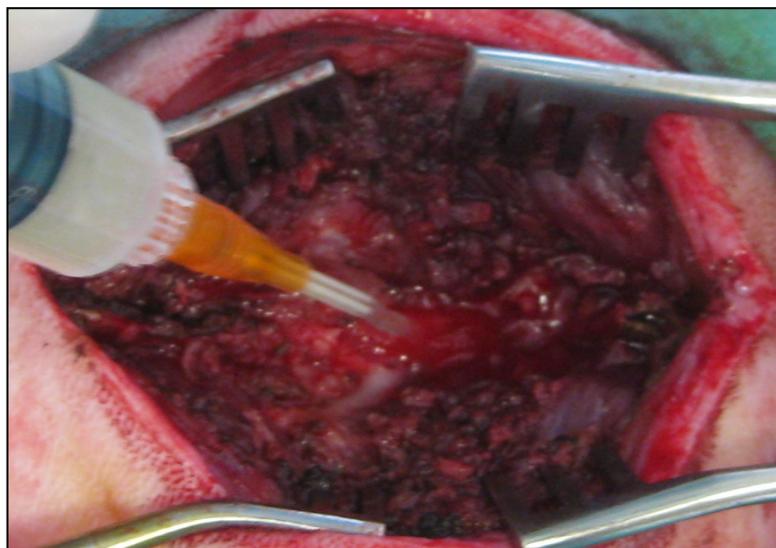


Figura 21. Aplicación de Adcon L[®] (GCP).

En cuanto a las condiciones postoperatorias, el servicio de veterinaria vigiló diariamente la evolución de todos los animales, observando principalmente posibles infecciones y la función de las extremidades traseras y se encargó de la administración de antibióticos y analgésicos.

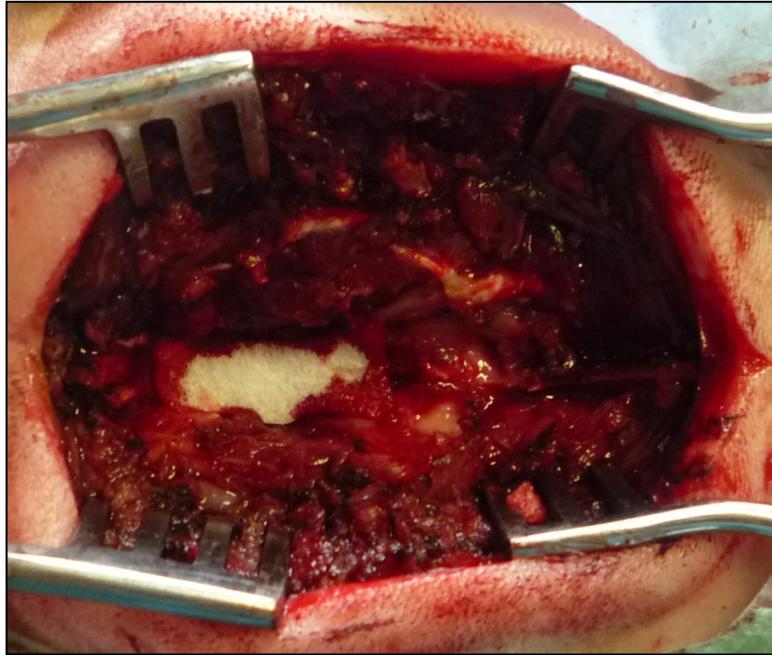


Figura 22. Aplicación de DuraGen® (CS).

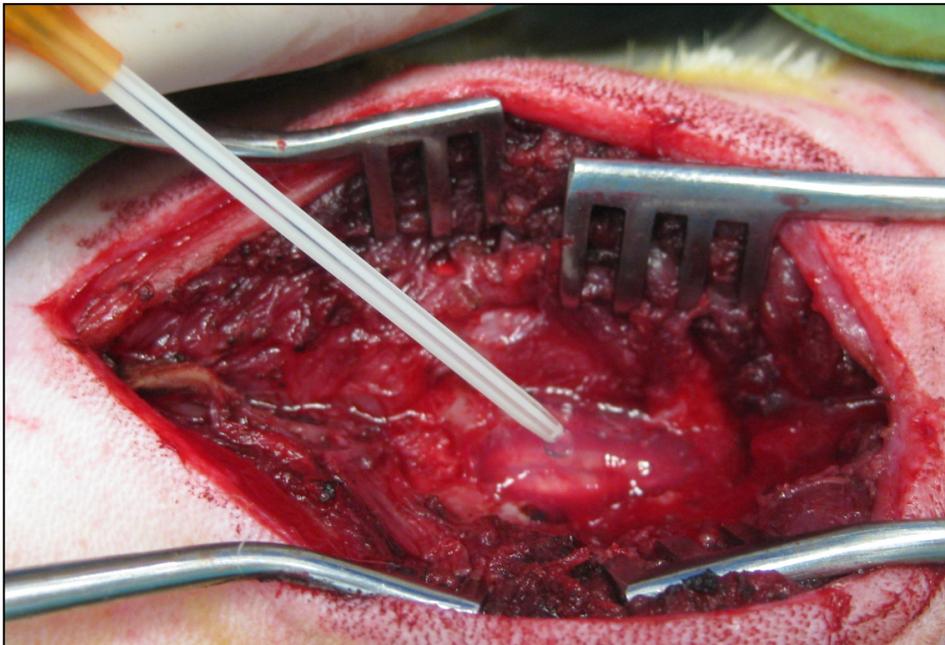


Figura 23. Aplicación de P144® (iTGFβ).

Cualquier conejo con complicaciones relacionadas con la anestesia o la laminectomía fueron descartados y excluidos del estudio.

Puesto que se trató de una operación en columna, se evaluó especialmente la incapacidad motora en los miembros inferiores del animal, en cuyo caso fueron sacrificados. Se valoró como síntoma general una pérdida de peso severa (15 %) que fue atribuida a una infección postoperatoria, y llevaría al sacrificio del animal.

4.2 Intervenciones quirúrgicas

A los animales se les realizó una laminectomía completa de la vértebra L6 desde el ligamento amarillo de L5-L6 por craneal hasta el ligamento amarillo entre L6-L7 por caudal en el plano sagital y desde un pedículo al otro en el plano coronal (Figura 24).

Todos los animales ayunaron desde 12 horas previas a la cirugía. Los animales fueron pesados y sedados 30 minutos antes de la intervención con una premedicación anestésica intramuscular de 0,15 mg/kg de Medetomidina (Orion Pharma Espoo, Finlandia) y 10 mg/kg de Ketamina (Imalgene 1000; Merial, Lyon, Francia).

Para el transporte de los animales se utilizó una jaula de transporte estándar.

Posteriormente en el quirófano se les realizó una venopunción en una vena marginal de la oreja con una aguja de 24 G y se administró una solución glucosalina a un ritmo de 10 ml/kg/hora.

La anestesia fue inducida con una dosis intravenosa de propofol 2-8 mg/kg (Braun, Melsungen, Alemania) y mantenida con Sevoflurane 1.5-3% (Abbvie, Illinois, EE. UU.) a lo largo del procedimiento.

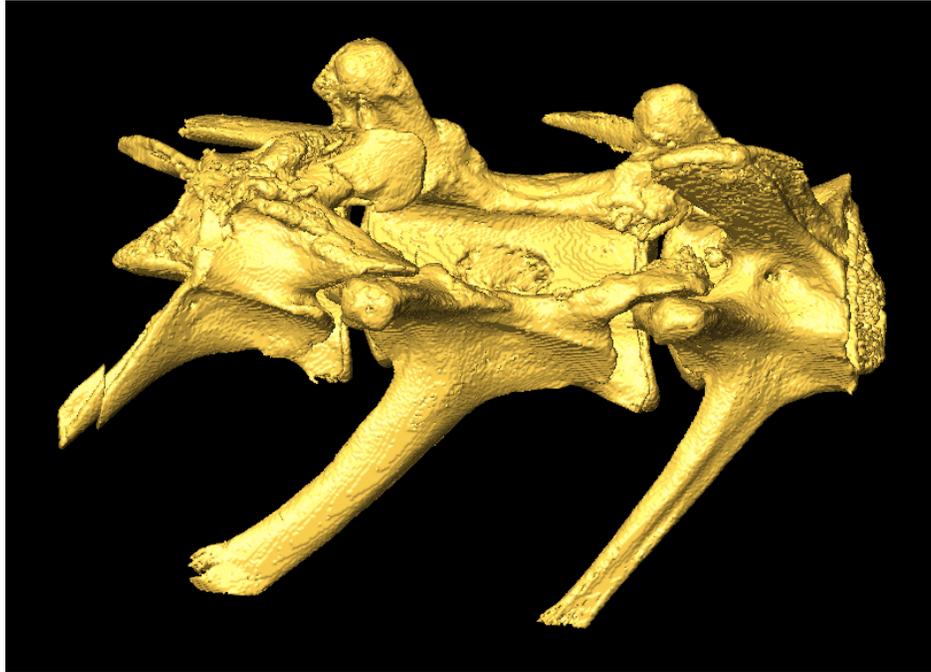


Figura 24. Reconstrucción 3D de imágenes de microtomografía computarizada representando laminectomía completa a nivel de L6.

Para facilitar la intubación endotraqueal (Figura 25) a los animales se les administró 0,5 mg/kg de Atracurium besylate (Inibsa, Barcelona, España).

Bajo anestesia los animales fueron colocados en decúbito prono sobre una almohadilla térmica sobre la mesa quirúrgica. Se les rasuró el área lumbosacra con una maquinilla eléctrica y se preparó el campo con Povidona iodada. Se

colocaron los campos quirúrgicos de manera aséptica (Figura 26). Se identificó la vértebra L6 mediante palpación y se realizó una incisión cutánea de unos 7 cm sobre la línea media centrada sobre las apófisis espinosas separándola del plano de la fascia dorsolumbar.



Figura 25. Intubación endotraqueal del conejo.



Figura 26. Rasurado de zona quirúrgica y monitorización.

El plano óseo se expuso realizando incisión de la fascia y disección subperióstica de la musculatura paraespinal, llegando al ligamento amarillo entre L5 y L6.



Figura 27. Localización de apófisis espinosa y disección subperióstica de la musculatura paravertebral.

Se resecó el ligamento supraespinoso entre las vértebras L5-L6 y L6-L7 quedando expuestas las láminas de la sexta vértebra lumbar y el ligamento amarillo que une las láminas de L7 con L6 y L6 con L5 (Figura 27).

Con una gubia fina se realizó una pequeña apertura a nivel del ligamento amarillo que nos permite la introducción de un laminotomo de Kerrison de 1 mm angulado a 45°, con el que fuimos retirando todo el ligamento amarillo entre la

quinta y sexta vértebra lumbar, exponiéndose justo debajo del mismo el saco dural (Figura 28).

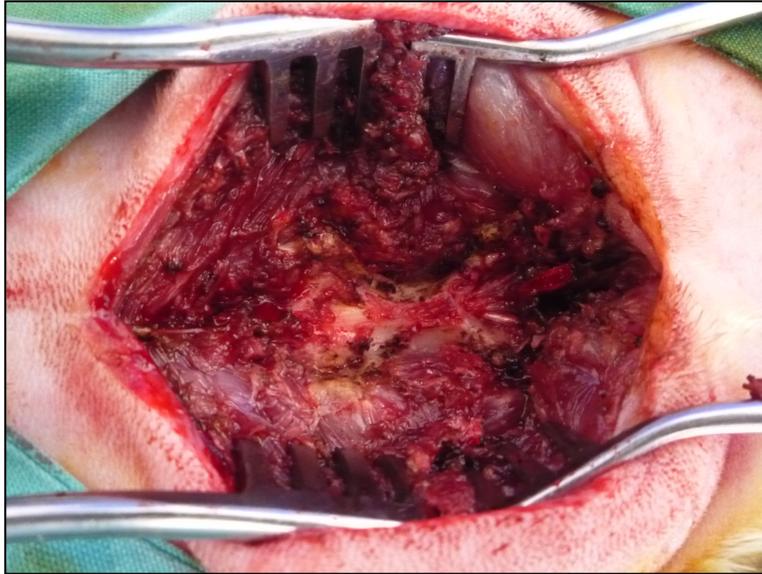


Figura 28. Fenestración sobre ligamento amarillo y resección de apófisis espinosa con exposición de las láminas.

Una vez eliminado todo el ligamento amarillo, y continuando con el laminotomo de Kerrison, extirpamos la lámina de la sexta vértebra lumbar hasta llegar al ligamento amarillo entre L6-L7, realizando así una laminectomía completa de L6. Una vez realizada la laminectomía la ampliamos llegando de un pedículo al otro consiguiendo una superficie rectangular de unos 0,7 x 2,0 cm en la que quedaba expuesto el saco dural (Figura 29).

El sangrado superficial fue controlado mediante presión o cauterización con el

bipolar.

El sangrado proveniente de una arteria nutricia emergente de la lámina, presente de forma constante, fue controlada con el uso de un hemostático (Surgicel; Ethicon, Somerville, NJ, EE. UU.). La esponja hemostática fue retirada una vez conseguida la hemostasia.

Tras aplicar el tratamiento se cerró la fascia con una sutura de polyglactin 2/0 (Ethicon) y la piel con seda 3/0 (Ethicon).

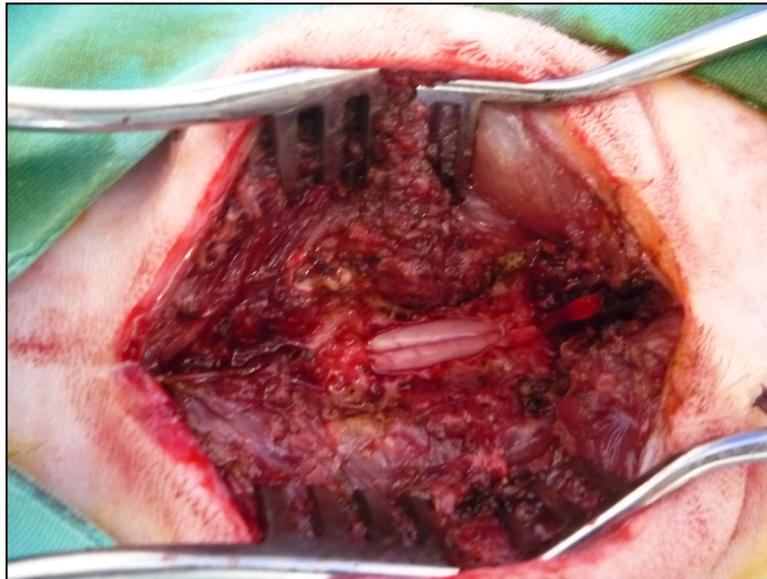


Figura 29. Laminectomía completa L6.

Tras el cierre y antes de despertar al conejo se impregnó la herida quirúrgica con povidona iodada (Figura 30). Finalmente, la herida postquirúrgica se cubrió con gasas fijadas con una vuelta de Tensoplast.

En el periodo del despertar anestésico se aplicó un parche transdérmico de buprenorfina 0,01-0,05 mg/kg que se repitió al tercer día y antibiótico (Penicillin/Streptomycin 0,1 ml/kg /24h) (Virbac, Esplugues de Llobregat, Spain) durante 7 días.

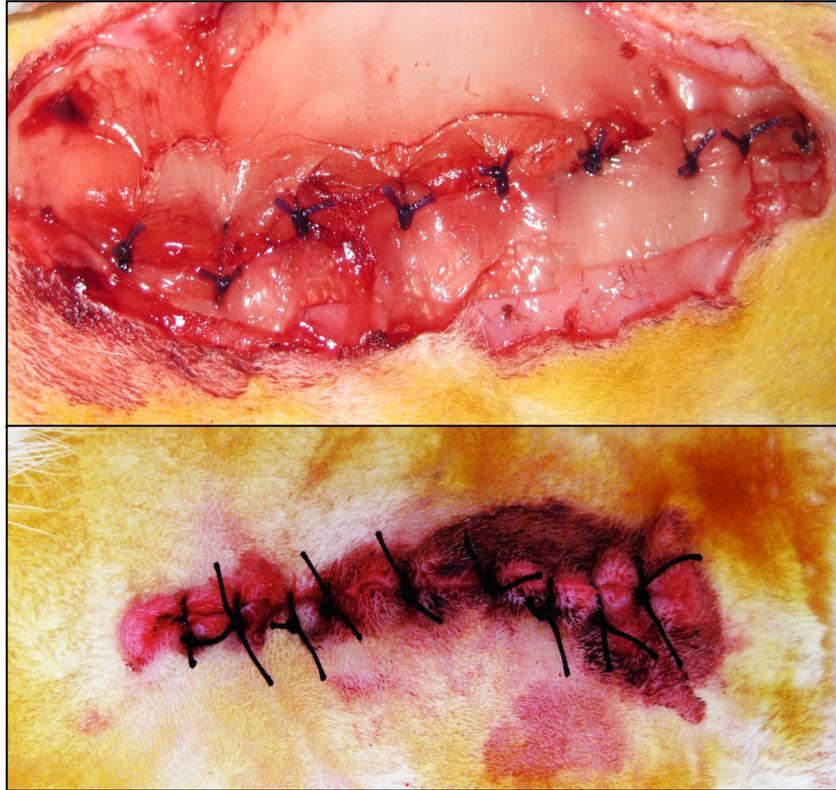


Figura 30. Cierre por planos de la herida quirúrgica.

Posteriormente y tras un periodo de reanimación post-anestésica se devolvió al conejo a su jaula durante un periodo de cuatro semanas siguiendo el protocolo de cuidado habitual de estos animales aprobado por el comité de ética.

Todos los conejos fueron estabulados en jaulas individuales con acceso libre a comida y agua sin inmovilización. Se realizaron curas con povidona iodada de la herida hasta que cedió el manchado. No se retiraron los puntos cutáneos.

Pasadas 4 semanas se volvieron a pesar los conejos y se procedió a la eutanasia de estos mediante la administración intravenosa de acepromacina intravenosa a una dosis de 1 mg/kg (Fatro SpA, Bolonia, Italia) seguido de embutramida, mebezonio yoduro y tetracaína clorhidrato (T-61®) (Merk, NJ, EE. UU.) a dosis de 0,3 ml/kg de peso.

Tras la eutanasia, los conejos se colocaron en la misma posición en que se realizó la cirugía y se procedió a la exéresis en bloque de la columna vertebral comprendida entre la parte más cefálica de L7, el cuerpo vertebral de L6 y la parte más caudal de L5.

4.3 Histología y análisis histomorfométrico

Para la evaluación histológica, las columnas fueron extraídas (Figura 31), fijadas en 4% formalina (Panreac, España) durante 1 semana y decalcificadas en una solución decalcificante consistente en 10% EDTA (Panreac) , 7,5% polivinilpirrolidona (PVP, Sigma, España), 10 mM TrisHCl (Sigma)) a pH 6,95 durante 8 semanas, deshidratadas en etanol (Oppac, España) de diferentes gradientes (70%, 80%, 96% y 100%), se sumergieron en xileno (Prolabo, España) durante 4 horas y fueron incluidas en parafina (Panreac).

Con un micrótopo de rotación (Microm HM40, Alemania) se realizaron cortes sucesivos de 4 μm de grosor. Dichas secciones fueron obtenidas de la zona central y de los dos extremos de cada nivel y teñidos con Hematoxilina-Eosina (H&E), Tricrómico de Masson y Rojo Sirio para evaluar el tejido cicatricial.

Se obtuvieron imágenes digitales con una cámara Zeiss Axiocam ICc3 (Plan-Neofluar objective with 0.50 NA) con un microscopio Axioimager M1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

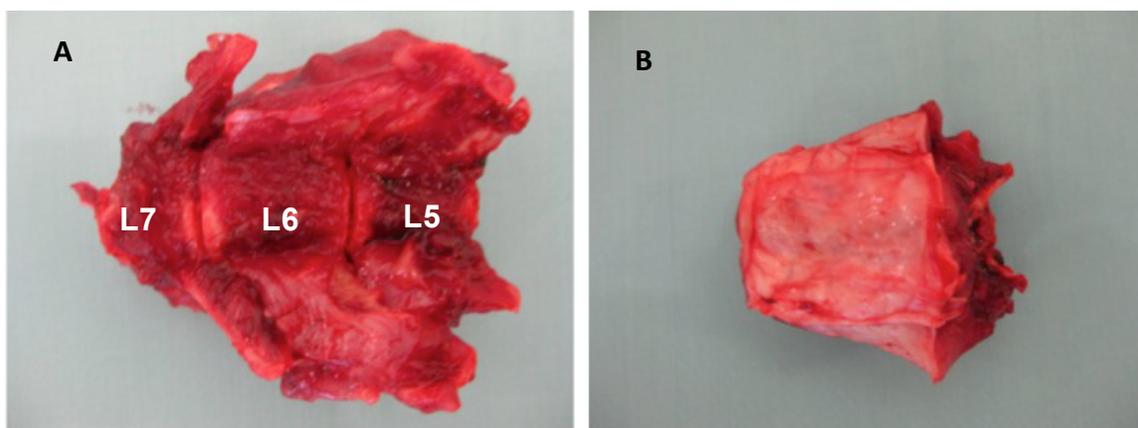


Figura 31. Extracción de las vértebras para análisis histológico. A, Visión ventral de las vértebras L6, parte caudal de L5 y zona cefálica de L7. **B,** Visión dorsal de la fascia y musculatura paravertebral extraídas a la 4^a semana de la intervención.

Se llevó a cabo un análisis histomorfométrico cuantificando la densidad celular, la formación ósea y el contenido de colágeno del tejido cicatricial epidural.

Para la densidad celular, el conteo celular se realizó en células/ mm^2 utilizando ImageJ[®] en 15 campos por corte, 3 cortes por animal (Figura 32). Se obtuvo una

media por cada conejo.

De forma similar se calculó con el ImageJ® el contenido de colágeno y se cuantificó como un % de tinción positiva de Rojo Sirio en los campos correspondientes obteniendo una media para cada animal. (Figura 33).

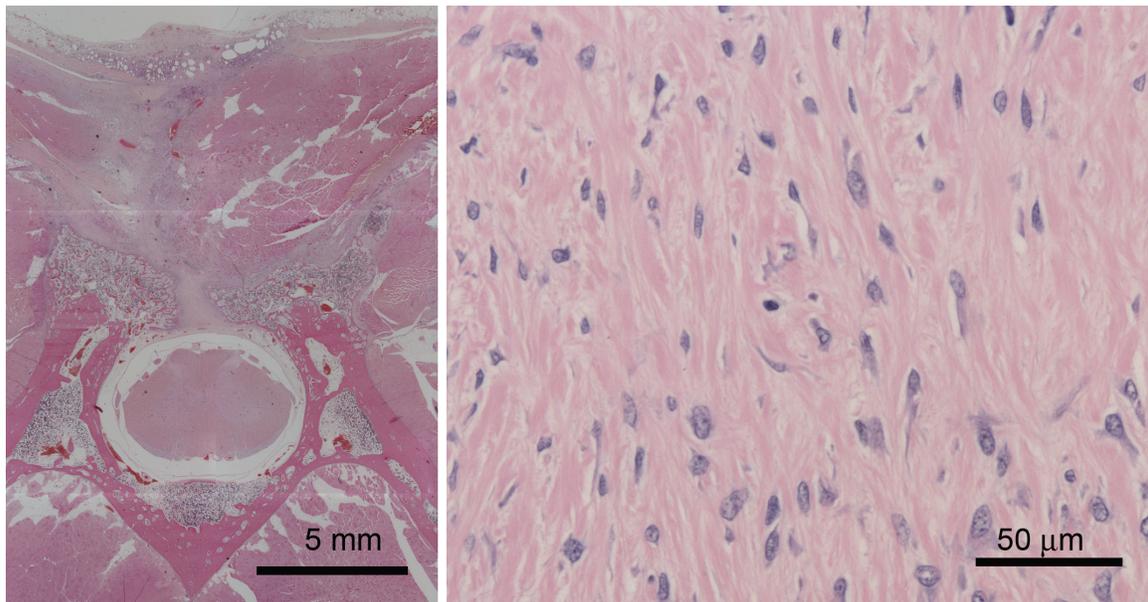


Figura 32. Detalle de **corte histológico con tinción de Hematoxilina-Eosina utilizado para conteo celular.**

El área de hueso neoformado y la distancia cubriendo la laminectomía se expresó como área en mm^2 y la distancia en mm respectivamente (Figura 34).

Dos anatomopatólogos experimentados puntuaron y calificaron de manera ciega la densidad de la cicatriz, la adherencia de la cicatriz a la duramadre y el infiltrado inflamatorio.

La extensión de la adherencia entre la fibrosis epidural con la duramadre fue calificada siguiendo la clasificación descrita por He *et al.* (Anexo 1) [97]. La densidad de la cicatriz se clasificó según la clasificación descrita por Preul *et al.* (Anexo 2) [130]. Finalmente, el infiltrado inflamatorio fue valorado utilizando una escala semicuantitativa, desde 0 (ausencia de infiltrado inflamatorio celular), 1 (área del infiltrado inflamatorio a 100X menor del 30%), 2 (área de infiltrado inflamatorio a 100X moderado distribuido entre un 30 y un 70% del tejido cicatricial), 3 (área de infiltrado inflamatorio severo, de hasta un 70% evidente a 40X). Cada anatomopatólogo realizó 3 lecturas independientes, la mediana de las lecturas de cada anatomopatólogo se utilizó para calcular el grado de acuerdo global intra y entre observadores.

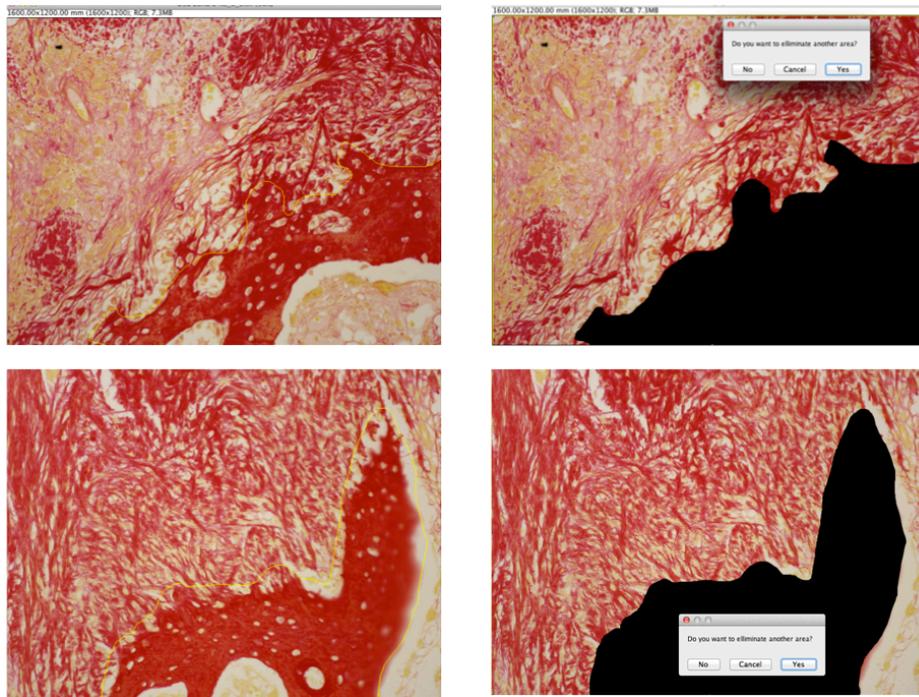


Figura 33. Tinción de Rojo Sirio y “plugin” de ImageJ® para cuantificación de colágeno.

4.4 Análisis estadístico

El tamaño muestral se calculó asumiendo un tamaño de efecto de 0,7, un nivel de confianza de 95%, una potencia de 80% y un porcentaje potencial de pérdidas del 10%, el tamaño de muestra requerido para este estudio fue de 32 animales (8 conejos por grupo).

EL software del programa Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) se utilizó para realizar todo el análisis estadístico.

El nivel de significación estadística se fijó en $p < 0.05$. La normalidad de las variables continuas se evaluó realizando el test de Kolmogorov-Smirnov.

En el texto, los datos se muestran como media y desviación estándar (DE) . Un ANOVA de una vía se utilizó para analizar los grupos de intervención para observar diferencias en la media de densidad celular.

El test de Kruskal-Wallis se utilizó para analizar la adherencia, densidad de la cicatriz, infiltrado inflamatorio, contenido de colágeno y neoformación ósea entre grupos.

El test de comparación múltiple de Dunn se utilizó para comparar las diferencias entre cada grupo tratamiento y el grupo control.

El grado de acuerdo global para todos los valores histológicos entre los observadores se analizó utilizando el coeficiente Kappa ponderado.

Finalmente la correlación entre el % de colágeno y el conteo celular se evaluó

utilizando el coeficiente de correlación de Spearman.

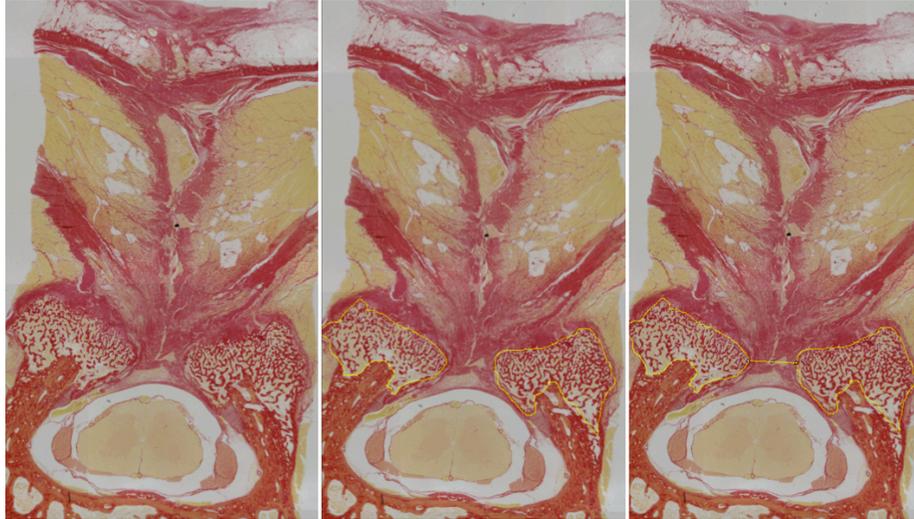


Figura 34. Cuantificación de hueso neoformado en tinciones de Rojo Sirio. La línea amarilla delinea el hueso neoformado y la distancia entre un pedículo y otro.



5. RESULTADOS

5.1 Complicaciones

En nuestra serie tuvimos las siguientes complicaciones:

Un animal del grupo $iTGF\beta$ sufrió una posible paresia de la extremidad inferior derecha que se evidenció a las 3 semanas de la intervención porque el conejo comenzó a mordisquearse dicha extremidad, este incidente no nos obligó a retirar al conejo de su grupo de estudio ya que se solucionó mediante la colocación de vendaje que evitaba que el conejo se lastimara y pudo ser sacrificado a la cuarta semana.

Dos ejemplares a los que se les había administrado CGP fallecieron, uno en el postoperatorio inmediato por una aspiración durante la extubación y otro fue sacrificado al quedarse paralítico tras dar un salto en su jaula a la 2 semana tras la intervención.

Un ejemplar del grupo control falleció durante la operación.

Otro ejemplar del grupo $iTGF\beta$ fue retirado del estudio por presentar una tumoración sobre la zona de la laminectomía.

Dos ejemplares del grupo CS, 1 ejemplar del grupo CGP y un ejemplar del grupo Control fueron retirados del estudio por presentar la misma tumoración, con sospecha clínica de quiste de inclusión epidérmica (Figura 35).



Figura 35. Tumoración presente en uno de los conejos retirados del estudio.

Se mandaron muestras a microbiología y para su estudio anatomopatológico. Los cultivos fueron negativos y el diagnóstico anatomopatológico fue de quiste de inclusión epidérmica.

Tras observar esta complicación, además del campo quirúrgico de tela que utilizábamos para aislar el área quirúrgica añadimos una tela plástica adhesiva con yodo (DERMADINE, Castelfranco di Sopra, Italia) y no volvimos a detectar esta complicación (Figura 36).



Figura 36. Preparación definitiva del campo quirúrgico.

Se retiraron del estudio 2 animales que se les había realizado una laminectomía, 2 animales con laminectomía y aplicación de DuraGen[®], 3 animales con laminectomía y aplicación de Adcon L[®] y 1 animal con laminectomía y aplicación de P144[®].

Finalmente fueron incluidos para su análisis un total de 37 de las 40 laminectomías, 8 ejemplares en el grupo CS, 9 en el grupo P144, 10 en el grupo CGP y 10 en el grupo control.

En todos los grupos la laminectomía completa de L6 resultó en la aparición de fibrosis epidural a las cuatro semanas post-cirugía (Figura 37).

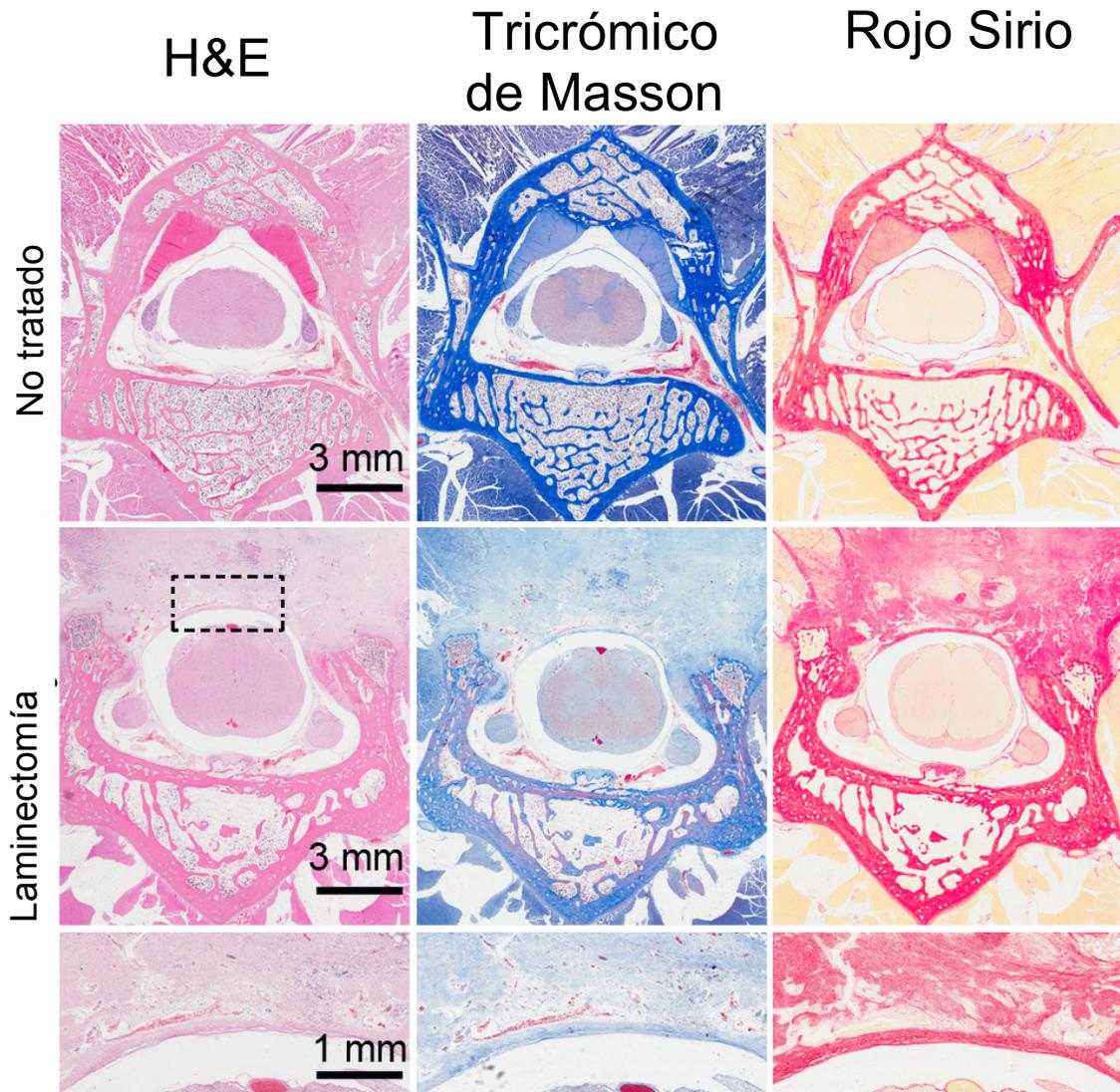


Figura 37. Presencia de fibrosis epidural en el modelo de conejo a las 4 semanas post laminectomía. En la fila superior se presenta un corte histológico de una vértebra de conejo intacta teñida con Hematoxilina-Eosina (H&E), Tricrómico de Masson (TM) y Rojo Sirio (RS). En la línea intermedia se observa el corte histológico de una vértebra que ha recibido una laminectomía. En la línea inferior se presenta detalle de la línea intermedia donde se puede observar adherencias de tejido fibrótico y la duramadre.

Para determinar el efecto de los diferentes tratamientos en la fibrosis epidural, dos anatomopatólogos experimentados puntuaron la densidad de la cicatriz, la adherencia de la duramadre y el infiltrado de células inflamatorias de acuerdo a las escalas especificadas en la sección de Materiales y Métodos.

5.2 Estudio Anatomopatológico

En los grupos iTGF β y Control se observó un tejido conectivo denso y vascularizado rellenando el defecto resultando en una puntuación similar de la densidad de la cicatriz ($2,400\pm 0,699$). En el grupo CS el defecto se relleno con un tejido menos denso y hubo una disminución significativa en la puntuación de la densidad de la cicatriz ($1,750\pm 0,463$; $p=0,0423$). Finalmente el grupo GCP mostró la puntuación de la densidad de la cicatriz más baja, que fue estadísticamente significativa cuando se comparó con el grupo control ($1,333\pm 0,441$; $p=0,0048$) (Figura 38 A). El grado de acuerdo global entre los observadores para la densidad de la cicatriz fue 79,8% (Kappa Ponderado=0,54, $p<0,01$). El grado de acuerdo global intraobservador para la densidad de la cicatriz fue 95,2% (Kappa Ponderado=0,88, $p<0,001$).

Cuando se comparó el grado de adherencia entre la duramadre y el tejido cicatricial encontramos una reducción en la puntuación del grupo CGP pero sin significación estadística ($1,222\pm 0,441$) cuando se comparó con el grupo control ($1,900\pm 0,876$, $p=0,0725$). Los grupos iTGF β y CS no mostraron diferencias significativas cuando se compararon con el grupo control ($1,750\pm 0,886$; $p=0,7391$ y $2,100\pm 0,567$; $p=0,5651$ respectivamente) (Figura 38 B). El grado de

En los grupos iTGF β (1,625 \pm 0,517) y CS (1,500 \pm 0,527) se observó un infiltrado de células inflamatorias significativamente mayor en comparación con el grupo Control (1,000 \pm 0,000) ($p=0,0119$ y $p=0,0059$ respectivamente). Mientras que en el grupo GCP (1,111 \pm 0,333) no se encontraron diferencias significativas comparando con el grupo Control ($p=0,1930$) (Figura 38 C). El grado de acuerdo global entre los observadores para el infiltrado inflamatorio fue de 85,7% (Kappa Ponderado=0,403, $p<0,01$). El grado de acuerdo global intraobservador para el infiltrado inflamatorio fue 97,6% (Kappa Ponderado=0,94, $p<0,001$).

5.3 Estudio Histomorfométrico

El análisis histomorfométrico no demostró diferencias significativas en el recuento de la densidad celular ni en la neo-formación ósea cuando se compararon los grupos tratamiento CS, iTGF β y GCP con el grupo control. (Tabla 3).

El contenido de colágeno se valoró con la tinción Rojo Sirio. Aquí no se detectaron diferencias significativas en el porcentaje de área teñida con Rojo Sirio en el área quirúrgica para los grupos tratamiento iTGF β o CS cuando se compararon con el grupo control ($p=0,6607$ y $p=0,0545$ respectivamente). Por otro lado, se encontró una reducción estadísticamente significativa en el contenido de colágeno en el grupo GCP cuando se comparó con el grupo control ($p<0,0001$) (Tabla 6, Figura 39).

Tabla 3. Análisis histomorfométrico del área de fibrosis epidural

	Densidad celular (células/área)	Hueso neoformado (mm ²)	Contenido de colágeno (%)
Control	847,6±333,3	8,10±5,36	61,61±11,18
iTGFβ	1039,0±234,0	7,53±5,14	56,37±10,36
CS	982,8±502,4	8,15±5,16	51,31±13,64
GCP	486,7±197,8	5,01±5,14	28,55±12,23^a

Test de Kruskal-Wallis para el contenido de colágeno $p=0,0002$. ^a, $p<0,0001$ cuando se compara con el grupo Control.

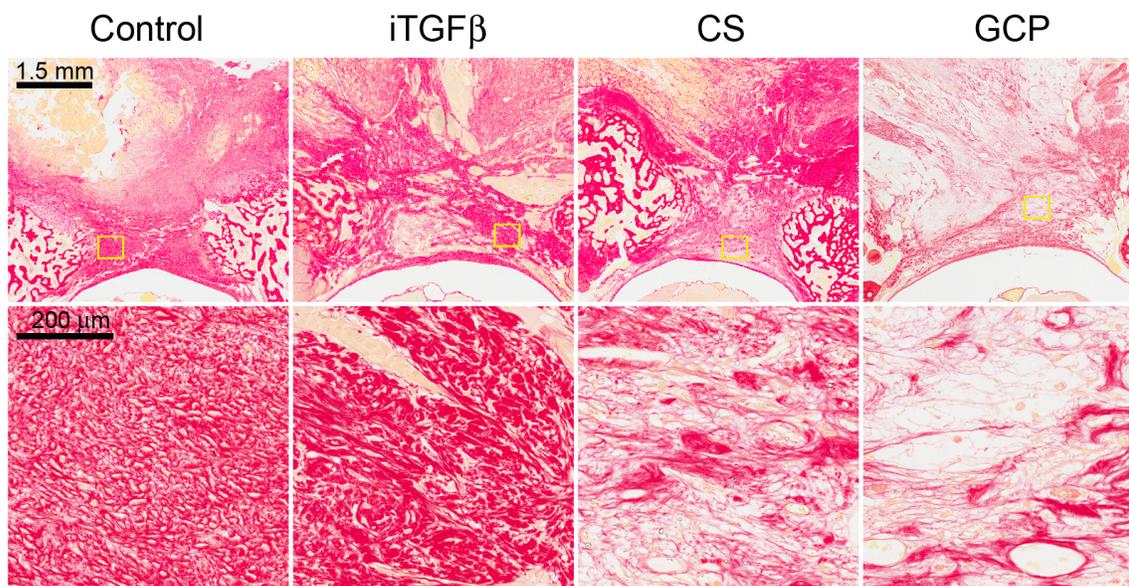


Figura 39. Fotografías representativas de la Tinción de Rojo Sirio para los distintos grupos de estudio que se utilizaron para realizar la cuantificación histomorfométrica del contenido de colágeno. El cuadro amarillo denota el área aumentada en el panel inferior.



Finalmente, el contenido de colágeno y la celularidad mostraron una correlación moderada y estadísticamente significativa (Spearman $r=0,47$, Intervalo de confianza (IC) 0,17-0,70, $p=0,003$).



6. DISCUSIÓN

Hemos realizado un estudio histomorfométrico y anatomopatológico de la fibrosis epidural que se origina tras aplicar diferentes tratamientos en el espacio epidural de un modelo de laminectomía en conejo.

6.1 Modelo Animal

La fibrosis epidural ha sido evaluada en diversos modelos animales, siendo las ratas y los conejos los animales más utilizados en los modelos de laminectomía.

Algunos autores aconsejan utilizar animales de mayor tamaño que la rata debido a que tienen el cono medular bajo, unas láminas finas y un espacio epidural estrecho lo cual favorece la lesión medular durante la intervención [30].

Aunque el conejo también presenta un espacio epidural estrecho y un cono medular bajo, frecuentemente terminando a nivel de S2, el tamaño del conejo permite utilizar instrumental de quirófano estándar sin precisar instrumental de microcirugía [131].

El conejo New Zealand White es un modelo de laminectomía frecuentemente utilizado para valorar los efectos de sustancias aplicadas en el espacio epidural sobre la fibrosis epidural ya que es un modelo eficiente en términos de coste y tiempo quirúrgico [82, 101, 132-134].

6.2 Tiempo de sacrificio

Sacrificamos a los conejos a la 4ª semana post-cirugía ya que este intervalo de tiempo está bien documentado en distintos modelos animales. Boot y Hughes describieron que el defecto provocado por la laminectomía empieza a cerrarse hacia la cuarta semana en su estudio sobre la fibrosis epidural en conejos [135]. Se ha estudiado la neoformación ósea tras laminectomía L6 en conejos New Zealand White a las semanas 2, 4, 8, 12, 26 y 52 observándose una unión clara entre la cuarta y octava semana [136].

Songer *et al.* mostraron un modelo de discectomía y laminectomía en perros sacrificando animales al primer y segundo día post-cirugía así como a la 2ª y 4ª semana post-cirugía. Observaron la persistencia del hematoma a la 2ª semana que se veía sustituido por tejido fibroso a la semana 4 [96].

En otro estudio He *et al.* valoraron ratas laminectomizadas a los 8, 15, 30 y 90 días. A los 8 días se observó tejido de granulación, células inflamatorias, fibroblastos y capilares sanguíneos. A los 15 días se observaron fibrocitos, aspecto degenerativo fibroso de las fibras musculares y neoformación ósea. En la mayoría de los casos, a los 30 días, se observó un cierre de las láminas en la zona más estrecha de la laminectomía y a los 90 días describieron la dificultad para distinguir entre el hueso trabecular original y el regenerado [97].

Se ha observado que cuando se cierra espontáneamente el defecto de la laminectomía por el crecimiento del hueso, la cantidad de tejido fibroso que queda sobre la duramadre es mínimo [104]. Por lo que consideramos que para

valorar de forma efectiva el tejido fibroso se debería estudiar antes de que se produzca el cierre del defecto de la laminectomía. Otra opción sería hacer otro grupo realizando una laminoplastia o laminotomía con la hipótesis de limitar la formación de tejido cicatricial. Se han descrito recientemente estudios en conejos y ratas utilizando este tiempo de sacrificio [109, 125, 137].

6.3 Procedimiento quirúrgico

Aunque hay artículos que aboguen por la discectomía para generar la fibrosis, optamos por realizar una laminectomía, sin asociar discectomía, para no aumentar la posible morbimortalidad asociada a la intervención, movilizándolo la médula para acceder al disco, ya que está descrita una morbilidad y una mortalidad del 12 y 20% respectivamente en el modelo de laminectomía en conejo en conejo New Zealand White y se sabe que el conejo en comparación con otros animales tiene baja tolerancia al daño medular [41, 132].

6.4 Procesado histológico

Las tinciones con Hematoxilina y Eosina para valorar la celularidad y Tricrómico de Masson para valorar el colágeno son tinciones frecuentemente utilizadas [104, 125, 137-139]. Nosotros hemos usado la tinción de Rojo Sirio, pese a que no se utilice habitualmente en este tipo de estudios, porque al realizar el estudio histomorfométrico y la cuantificación del colágeno con el “pluggin” de ImageJ®, en cortes teñidos con Tricrómico de Masson el color azulado asociado al contenido de colágeno se confundía con los tonos azulados de la musculatura

circundante. En cambio, con el Rojo Sirio el colágeno se tiñe de rojo mientras que la musculatura se tiñe de amarillo permitiendo una cuantificación más precisa del contenido de colágeno.

6.5 Valoración anatomopatológica y análisis histomorfométrico.

6.5.1 Grupo GCP

El grupo GCP presentó menos densidad de la cicatriz, infiltrado inflamatorio, adherencia de la dura madre y bajo contenido de colágeno sugiriendo que la infiltración inflamatoria y la migración de fibroblastos son factores esenciales en el desarrollo de la cicatriz epidural. Nuestros resultados obtenidos con la aplicación de Adcon L[®] en este estudio son consistentes con los obtenidos en otros estudios sobre la reducción de adherencias peridurales y menor densidad de la cicatriz [140].

En el estudio de Kurt *et al.* valoraron el efecto de Adcon L[®] sobre la fibrosis epidural en conejo realizando laminectomía lumbar y estudiando mediante tinciones de H&E y TM la fibrosis a las 4 semanas utilizando la escala descrita por He *et al.* y al igual que en nuestro estudio obtuvieron una disminución de la fibrosis y una disminución de la densidad celular [125].

Aunque se ha observado que la aplicación de Adcon L[®] puede inhibir la cicatrización de la duramadre y facilitar fugas de líquido cefalorraquídeo de durotomías microscópicas y cuando se administra con injerto óseo autógeno puede inhibir la formación ósea [127, 140].

En nuestro estudio no hemos observado ninguna de las complicaciones descritas y en cuanto a la neoformación ósea, no hubo diferencias con la observada en el resto de los grupos.

6.5.2 Grupo iTGF- β

P144[®] ha demostrado disminuir la fibrosis cuando se ha utilizado en modelos animales de fibrosis hepática, esclerosis cutánea inducida por bleomicina y en fibrosis periprotésica de silicona [118-120].

Por otra parte, se ha descrito un efecto preventivo del P144[®] en fibrosis miocárdica, mediante la inhibición de la síntesis y entrecruzamiento de colágeno tipo I TGF- β -dependiente en fibroblastos cardíacos de ratas hipertensas [121].

Se ha mostrado un interés creciente en la observación de que cantidades aumentadas de TGF- β se encuentran en heridas que curan formando cicatriz en oposición a las que curan mediante regeneración. Este hallazgo ha llevado a esfuerzos clínicos para bloquear la formación de cicatriz con anticuerpos y pequeñas moléculas dirigidos contra TGF- β y otros mediadores pro-inflamatorios [141].

Ferguson *et al.* mostraron que heridas de embriones que curaban sin cicatriz tenían niveles bajos de TGF- β 1 y TGF- β 2, niveles bajos de factor de crecimiento derivado de plaquetas y elevados niveles de TGF- β 3. Además, experimentalmente mimetizaron un perfil embrionario libre de cicatriz en ratones, ratas y cerdos neutralizando PDGF, TGF- β 1 y TGF- β 2 o añadiendo TGF- β 3

exógeno [141].

En nuestro estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las puntuaciones de densidad celular, adherencia ni en los valores histomorfométricos en el tratamiento con iTGF β comparando con el grupo control. Aunque se observó una puntuación más elevada en cuanto al infiltrado de células inflamatorias en comparación con el grupo control, no fuimos capaces de encontrar ninguna explicación clara para este hallazgo porque la administración del iTGF β se realizó de forma directa en forma de gel.

Para inhibir la fibrosis este péptido debería permanecer localmente en el área de la inflamación y que fuera duradero para minimizar la fibrosis. En base a esto, el vehículo ideal sería aquel que fuese reabsorbible, dejando un residuo mínimo y generando una distribución estable y homogénea del fármaco y para ello, decidimos forzar la concentración del péptido para formar un gel que se pudiera aplicar de forma local sin precisar de vehículo

Por otro lado estudios experimentales previos realizados en rata han mostrado que 2,5 mg/ml del péptido inhibidor es la mejor dosis para inhibir la presencia de tejido fibroso [118-120].

Un aumento de la concentración del péptido por encima de su dosis óptima puede haber sido un causante del aumento del infiltrado de células inflamatorias observadas en este grupo.

Este es el primer estudio del efecto del iTGF β sobre la cicatrización post-

quirúrgica en el espacio epidural. Las heridas cutáneas cicatrizaron a la semana de la intervención, verificando que el gel iTGF β no causó efectos adversos significativos, aunque la seguridad de las aplicaciones del gel de iTGF β requerirá investigaciones adicionales. El perfil de seguridad del iTGF β parece favorable debido a su mínima respuesta tisular local y ausencia de déficits neurológicos. Nuestros resultados se diferencian de los presentados anteriormente en otros tejidos, que mostraban una disminución del tejido cicatricial y disminución de células inflamatorias tras el tratamiento con iTGF β [119].

En 2010 se realizó un estudio con la aplicación local de P144[®] (0.625 mg de P144[®]) sobre la anastomosis de nervio ciático en ratas para determinar su efecto sobre la regeneración a las 12 semanas de la intervención. El estudio histológico mostró menor tejido cicatricial y menos células inflamatorias en el grupo con el tratamiento con P144[®] [119, 142].

Posteriormente se ha valorado el efecto de P144[®] en un modelo de cicatrices hipertróficas humanas en ratones estudiando las cicatrices tras 15 días de aplicación del tratamiento valorándolas a 47,8 días del inicio del tratamiento. Se observaron tendencias pero no llegaron a tener una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al área total, área de fibras de colágeno y grosor. En este estudio, con un modelo de regresión de fibrosis, el P144[®] tampoco logró disminuir de forma estadísticamente significativa las cicatrices [143].

6.5.3 Grupo CS

Las matrices de colágeno se utilizan frecuentemente como sustitutos duros y su eficacia previniendo la fibrosis epidural ha sido descrita a 20 semanas tras la cirugía en un modelo de laminectomía en conejo y a las 8 semanas en cerdos y su capacidad de neoformación ósea tras laminectomía en conejo a 8 semanas de la intervención [104, 129, 144, 145].

En nuestra experiencia con esta matriz de colágeno se observó un tejido poco denso y organizado que rellenaba el sitio de la laminectomía y que resultó en una baja puntuación de densidad de la cicatriz en comparación con el grupo control, aunque no llegó a tener significación estadística. En cuanto a la formación ósea, al igual que en los estudios mencionados, en nuestro caso la matriz de colágeno tampoco inhibió la formación ósea.

Podemos especular que en los estudios anteriormente descritos se observó una disminución de la fibrosis epidural al haber realizado el estudio histológico en conejos más jóvenes (pesando entre 2 y 3,8 kg) o por realizar el sacrificio de los animales en un tiempo que duplica el nuestro, siendo estos dos factores favorables para que se produzca la neoformación ósea y consiguiente disminución de fibrosis epidural.

En cuanto al grado de adherencia, el recuento de la densidad celular y el contenido de colágeno, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con el grupo control.

Una puntuación en el infiltrado celular inflamatorio significativamente más elevada en el grupo CS puede ser explicada porque la reabsorción completa de la matriz de colágeno ocurre entre la 6-8 semana tras la cirugía, por ello puede haber una invasión de células inflamatorias debido a una reacción a cuerpo extraño.

6.6 Limitaciones y posibles sesgos del estudio

Como se discutió anteriormente, utilizando conejos jóvenes (de hasta 3 kg de peso) en la puesta a punto del modelo animal, observamos un cierre completo de la laminectomía a las 4 semanas de la cirugía. Para evitar un sesgo de selección, sabiendo que los conejos jóvenes producen una cicatriz más densa y una neoformación ósea de forma más precoz y extensa, utilizamos conejos de más de 4 kg, no observándose en nuestro estudio un cierre completo de la laminectomía.

En este estudio no se valoró la aplicación de injerto libre de grasa sobre el espacio epidural pese a que clínicamente sea la medida más ampliamente utilizada. En el modelo de conejo empleado la grasa que se puede obtener del tejido subcutáneo desde el abordaje quirúrgico lumbar es prácticamente inexistente. Por lo que para la obtención de autoinjerto de grasa se tendría que realizar una vía de abordaje adicional, aumentando la morbilidad y posiblemente modificando el postoperatorio de este grupo, disminuyendo potencialmente la comparabilidad entre los grupos.

El P144[®], tiene escasa solubilidad y en ensayos de interacción directa no se ha podido medir si posee especificidad de isoforma o si afecta a todas las isoformas del TGF- β .

En nuestro estudio la aplicación del péptido se produce de forma tópica en el momento de la lesión tisular y ejerce su efecto supuestamente en la fase inflamatoria del proceso de cicatrización. Tenemos la limitación de que desconocemos la estabilidad del péptido en el tiempo y si está presente el efecto inhibidor sobre el TGF- β cuando se inicia la fase proliferativa.

Durante el procesado de las muestras, antes de decalcificar, se realizan cortes de la vértebra con la sierra que con el movimiento, puede alterar la muestra y la adherencia entre las estructuras. Dado que en todos los grupos las muestras se han procesado de la misma forma, no debería afectar a los resultados.

Al teñir los cortes histológicos existe un gradiente de color dentro de una misma tinción, pudiendo dificultar la comparación entre las muestras. Con el programa ImageJ[®] intentamos minimizar este problema utilizando la tinción Rojo Sirio.

Pudo haber un sesgo de valoración de resultados, sobretodo en la valoración del grado de adherencia, por lo que ambos anatomopatólogos valoraron las muestras en tres ocasiones de manera ciega sin saber a qué grupo pertenecían las mismas.

El grado de acuerdo global entre observadores obtenido en la valoración de la adherencia fue de 74,6, con un Kappa ponderado de 0,1 y con una p de 0,174.

Por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula de que el acuerdo observado entre observadores haya sido debido al azar. Por lo que en sucesivos estudios deberíamos emplear una valoración de la adherencia con mayor acuerdo global entre observadores.

En la determinación histomorfométrica de la densidad celular no se pudo diferenciar entre fibroblastos y células inflamatorias utilizando el “pluggin” de ImageJ[®]. Por ello desarrollamos una escala semicuantitativa a partir del método descrito en el artículo de He *et al.* ya que no pudimos identificar ningún anticuerpo específico para las células inflamatorias del conejo [97].

Pese a que pudimos perder información al pasar de una escala cuantitativa, como la usada por He *et al.* que cuenta linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y monocitos, en un total de 9 campos, 3 campos en 3 cortes por animal, a otra categórica, utilizando nuestro método de cuantificación valorando el área ocupada por células inflamatorias, pensamos que este método puede ser útil por su fácil aplicación, rapidez y alto grado de acuerdo global intraobservador y entre observadores, además de que valora la totalidad del corte y no 3 áreas seleccionadas de la muestra, por lo que se podría aplicar a otros estudios.



7. CONCLUSIONES

1. Hemos validado un modelo experimental de fibrosis epidural tras cirugía de columna en conejo.
2. La aplicación de la matriz de GCP fue capaz de reducir tanto el tejido de colágeno como la celularidad en el espacio epidural tras la laminectomía en el conejo a las 4 semanas.
3. Los tratamientos CS y iTGF β no mostraron eficacia en la reducción de la fibrosis epidural ni en la adherencia a la dura madre a las 4 semanas en el conejo.
4. La administración directa del iTGF β sobre el espacio epidural parece segura, no presenta complicaciones neurológicas, no dificultan la cicatrización y es bien tolerada.
5. Son necesarios estudios adicionales para valorar si la dosis o la vía de administración juegan un papel en la eficacia de iTGF β .
6. Hemos desarrollado una escala semicuantitativa para determinar las células inflamatorias presentes en la fibrosis epidural de conejo. La escala aplicada ha demostrado un alto grado de acuerdo global intraobservador y entre observadores.



8. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Main CJ. The Modified Somatic Perception Questionnaire (MSPQ), Journal of psychosomatic research. 27 (1983) 503-14.
- [2]. Shmagel A, Foley R, Ibrahim H. Epidemiology of Chronic Low Back Pain in US Adults: Data From the 2009-2010 National Health and Nutrition Examination Survey, Arthritis care & research. 68 (2016) 1688-1694.
- [3]. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, Wolfe F. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II, Arthritis Rheum. 58 (2008) 26-35.
- [4]. Waterman BR, Belmont PJ, Jr., Schoenfeld AJ. Low back pain in the United States: incidence and risk factors for presentation in the emergency setting, The spine journal : official journal of the North American Spine Society. 12 (2012) 63-70.
- [5]. Gross DP, Ferrari R, Russell AS, Battie MC, Schopflocher D, Hu RW, Waddell G, Buchbinder R. A population-based survey of back pain beliefs in Canada, Spine. 31 (2006) 2142-5.
- [6]. Leeuw M, Houben RM, Severeijns R, Picavet HS, Schouten EG, Vlaeyen JW. Pain-related fear in low back pain: a prospective study in the general population, European journal of pain. 11 (2007) 256-66.

- [7]. Schneider S, Mohnen SM, Schiltewolf M, Rau C. Comorbidity of low back pain: representative outcomes of a national health study in the Federal Republic of Germany, *European journal of pain*. 11 (2007) 387-97.
- [8]. Boos N, Aebi M, *Spinal disorders : fundamentals of diagnosis and treatment*2008, Berlin ; New York: Springer. xxxiii, 1166 p.
- [9]. Buchbinder R, van Tulder M, Oberg B, Costa LM, Woolf A, Schoene M, Croft P, Lancet Low Back Pain Series Working G. Low back pain: a call for action, *Lancet*. 391 (2018) 2384-2388.
- [10]. Schwarzer AC, Aprill CN, Derby R, Fortin J, Kine G, Bogduk N. The prevalence and clinical features of internal disc disruption in patients with chronic low back pain, *Spine*. 20 (1995) 1878-83.
- [11]. Rousselin B, Gires F, Vallee C, Chevrot A. Case report 627: Septic arthritis of lumbar facet joint as initial manifestation of spondylodiscitis, *Skeletal Radiol*. 19 (1990) 453-5.
- [12]. Schwarzer AC, Aprill CN, Bogduk N. The sacroiliac joint in chronic low back pain, *Spine*. 20 (1995) 31-7.
- [13]. Maigne JY, Aivaliklis A, Pfefer F. Results of sacroiliac joint double block and value of sacroiliac pain provocation tests in 54 patients with low back pain, *Spine*. 21 (1996) 1889-92.
- [14]. Grobler LJ, Robertson PA, Novotny JE, Pope MH. Etiology of spondylolisthesis. Assessment of the role played by lumbar facet joint morphology, *Spine*. 18 (1993) 80-91.

- [15]. Truumees E, *Orthopaedic knowledge update : spine*. Fifth edition. ed. pages cm.
- [16]. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000, CA: a cancer journal for clinicians. 50 (2000) 7-33.
- [17]. Delank KS, Wendtner C, Eich HT, Eysel P. The treatment of spinal metastases, *Deutsches Arzteblatt international*. 108 (2011) 71-9; quiz 80.
- [18]. Nachemson AL, Jonsson E, *Neck and back pain : the scientific evidence of causes, diagnosis, and treatment* 2000, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xv, 495 p.
- [19]. Boden SD, Davis DO, Dina TS, Patronas NJ, Wiesel SW. Abnormal magnetic-resonance scans of the lumbar spine in asymptomatic subjects. A prospective investigation, *J Bone Joint Surg Am*. 72 (1990) 403-8.
- [20]. Elfering A, Semmer N, Birkhofer D, Zanetti M, Hodler J, Boos N. Risk factors for lumbar disc degeneration: a 5-year prospective MRI study in asymptomatic individuals, *Spine*. 27 (2002) 125-34.
- [21]. Jensen MC, Brant-Zawadzki MN, Obuchowski N, Modic MT, Malkasian D, Ross JS. Magnetic resonance imaging of the lumbar spine in people without back pain, *N Engl J Med*. 331 (1994) 69-73.
- [22]. Modic MT. Degenerative disc disease and back pain, *Magnetic resonance imaging clinics of North America*. 7 (1999) 481-91, viii.
- [23]. Garfin S EF, Bell G, Bono C, Fischgrund J, *Rothman-Simone and Herkowitz's The Spine* 2017: Elsevier.

- [24]. Popesko P, Rajtová V, Horák Ji, *A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals*1992, London: Wolfe Pub. v. <1 >.
- [25]. Bensley BA, Craigie EH, *Practical anatomy of the rabbit; an elementary laboratory text-book in mammalian anatomy*. 8th ed1948, Philadelphia,: Blakiston. xii, 391 p.
- [26]. Burke JG, Watson RW, McCormack D, Dowling FE, Walsh MG, Fitzpatrick JM. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators, *J Bone Joint Surg Br*. 84 (2002) 196-201.
- [27]. Burke JG, RW GW, Conhyea D, McCormack D, Dowling FE, Walsh MG, Fitzpatrick JM. Human nucleus pulposus can respond to a pro-inflammatory stimulus, *Spine*. 28 (2003) 2685-93.
- [28]. Olmarker K, Blomquist J, Stromberg J, Nannmark U, Thomsen P, Rydevik B. Inflammotogenic properties of nucleus pulposus, *Spine*. 20 (1995) 665-9.
- [29]. Olmarker K, Rydevik B, Nordborg C. Autologous nucleus pulposus induces neurophysiologic and histologic changes in porcine cauda equina nerve roots, *Spine*. 18 (1993) 1425-32.
- [30]. Farrokhi MR, Vasei M, Fareghbal S, Farrokhi N. The effect of methylene blue on peridural fibrosis formation after laminectomy in rats: an experimental novel study, *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 11 (2011) 147-52.
- [31]. Lacombe M. [Vascular complications of lumbar disk surgery], *Annales de chirurgie*. 131 (2006) 583-9.

- [32]. Wiese M, Kramer J, Bernsmann K, Ernst Willburger R. The related outcome and complication rate in primary lumbar microscopic disc surgery depending on the surgeon's experience: comparative studies, *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 4 (2004) 550-6.
- [33]. Smith RP, Netter FH, Machado CAG, Netter FH, *The Netter collection of medical illustrations*. 2nd ed2011, Philadelphia, PA: Elsevier. v. <1-3 6, pts. 1-3 7, pts. 1-2 8, 9, pts. 1, 3>.
- [34]. Taylor RS, Taylor RJ. The economic impact of failed back surgery syndrome, *British journal of pain*. 6 (2012) 174-81.
- [35]. Fiume D, Sherkat S, Callovini GM, Parziale G, Gazzeri G. Treatment of the failed back surgery syndrome due to lumbo-sacral epidural fibrosis, *Acta neurochirurgica. Supplement*. 64 (1995) 116-8.
- [36]. Nachemson AL. Evaluation of results in lumbar spine surgery, *Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum*. 251 (1993) 130-3.
- [37]. Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations, *Pain*. 132 (2007) 237-51.
- [38]. Phillips FM, Cunningham B. Managing chronic pain of spinal origin after lumbar surgery: the role of decompressive surgery, *Spine*. 27 (2002) 2547-53; discussion 2554.

- [39]. 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*. 20 (1995) 449-53.
- [40]. Chan CW, Peng P. Failed back surgery syndrome, *Pain medicine*. 12 (2011) 577-606.
- [41]. Key JA, Ford LT. Experimental intervertebral-disc lesions, *J Bone Joint Surg Am*. 30A (1948) 621-30.
- [42]. Songer MN, Ghosh L, Spencer DL. Effects of sodium hyaluronate on peridural fibrosis after lumbar laminotomy and discectomy, *Spine*. 15 (1990) 550-4.
- [43]. Fager CA, Freidberg SR. Analysis of failures and poor results of lumbar spine surgery, *Spine*. 5 (1980) 87-94.
- [44]. Burton CV, Kirkaldy-Willis WH, Yong-Hing K, Heithoff KB. Causes of failure of surgery on the lumbar spine, *Clinical orthopaedics and related research*. (1981) 191-9.
- [45]. Samy Abdou M, Hardy RW, Jr. Epidural fibrosis and the failed back surgery syndrome: history and physical findings, *Neurological research*. 21 Suppl 1 (1999) S5-8.
- [46]. 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*. 9 (2000) 218-23.

- [47]. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration, *Nature*. 453 (2008) 314-21.
- [48]. Qiu SS, *Effect of P144 (Anti-TGF-beta) in an In Vivo Human Hypertrophic Scar Model in Nude Mice*, 2015, Universidad de Navarra: Pamplona.
- [49]. van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MM, Molema G, van Zuijlen PP, Middelkoop E, Niessen FB. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation, *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 35 (2009) 15-29.
- [50]. Sarrazy V, Billet F, Micallef L, Coulomb B, Desmouliere A. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments, *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 19 Suppl 1 (2011) s10-5.
- [51]. Varkey M, Ding J, Tredget EE. Differential collagen-glycosaminoglycan matrix remodeling by superficial and deep dermal fibroblasts: potential therapeutic targets for hypertrophic scar, *Biomaterials*. 32 (2011) 7581-91.
- [52]. Armour A, Scott PG, Tredget EE. Cellular and molecular pathology of HTS: basis for treatment, *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 15 Suppl 1 (2007) S6-17.
- [53]. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis, *The New England journal of medicine*. 331 (1994) 1286-92.

- [54]. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor-beta in glomerular injury, *Experimental nephrology*. 2 (1994) 13-7.
- [55]. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis, *Kidney international*. 45 (1994) 916-27.
- [56]. Nickell KA, Halper J, Moses HL. Transforming growth factors in solid human malignant neoplasms, *Cancer research*. 43 (1983) 1966-71.
- [57]. Hinck AP, Archer SJ, Qian SW, Roberts AB, Sporn MB, Weatherbee JA, Tsang ML, Lucas R, Zhang BL, Wenker J, Torchia DA. Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2, *Biochemistry*. 35 (1996) 8517-34.
- [58]. Song R, Bian HN, Lai W, Chen HD, Zhao KS. Normal skin and hypertrophic scar fibroblasts differentially regulate collagen and fibronectin expression as well as mitochondrial membrane potential in response to basic fibroblast growth factor, *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 44 (2011) 402-10.
- [59]. Ding J, Ma Z, Shankowsky HA, Medina A, Tredget EE. Deep dermal fibroblast profibrotic characteristics are enhanced by bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Wound Repair Regen*. 21 (2013) 448-55.

- [60]. Liu W, Wang DR, Cao YL. TGF-beta: a fibrotic factor in wound scarring and a potential target for anti-scarring gene therapy, *Current gene therapy*. 4 (2004) 123-36.
- [61]. Shi HX, Lin C, Lin BB, Wang ZG, Zhang HY, Wu FZ, Cheng Y, Xiang LJ, Guo DJ, Luo X, Zhang GY, Fu XB, Bellusci S, Li XK, Xiao J. The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair in vitro and in vivo, *PloS one*. 8 (2013) e59966.
- [62]. Kim JS, Choi IG, Lee BC, Park JB, Kim JH, Jeong JH, Jeong JH, Seo CH. Neuregulin induces CTGF expression in hypertrophic scarring fibroblasts, *Molecular and cellular biochemistry*. 365 (2012) 181-9.
- [63]. Ding J, Hori K, Zhang R, Marcoux Y, Honardoust D, Shankowsky HA, Tredget EE. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 in the formation of postburn hypertrophic scar (HTS), *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 19 (2011) 568-78.
- [64]. Sidgwick GP, Bayat A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 26 (2012) 141-52.
- [65]. Honardoust D, Varkey M, Marcoux Y, Shankowsky HA, Tredget EE. Reduced decorin, fibromodulin, and transforming growth factor-beta3 in deep dermis leads to hypertrophic scarring, *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*. 33 (2012) 218-27.

- [66]. Wang J, Dodd C, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE, Wound Healing Research G. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring, Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 88 (2008) 1278-90.
- [67]. Wang X, Qian Y, Jin R, Wo Y, Chen J, Wang C, Wang D. Effects of TRAP-1-like protein (TLP) gene on collagen synthesis induced by TGF-beta/Smad signaling in human dermal fibroblasts, PloS one. 8 (2013) e55899.
- [68]. Zhang GY, He B, Liao T, Luan Q, Tao C, Nie CL, Albers AE, Zheng X, Xie XG, Gao WY. Caveolin 1 inhibits transforming growth factor-beta1 activity via inhibition of Smad signaling by hypertrophic scar derived fibroblasts in vitro, Journal of dermatological science. 62 (2011) 128-31.
- [69]. Wang J, Hori K, Ding J, Huang Y, Kwan P, Ladak A, Tredget EE. Toll-like receptors expressed by dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring, Journal of cellular physiology. 226 (2011) 1265-73.
- [70]. Bin S, Li HD, Xu YB, Qi SH, Li TZ, Liu XS, Tang JM, Xie JL. BMP-7 attenuates TGF-beta1-induced fibroblast-like differentiation of rat dermal papilla cells, Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 21 (2013) 275-81.
- [71]. Liu J, Wang Y, Pan Q, Su Y, Zhang Z, Han J, Zhu X, Tang C, Hu D. Wnt/beta-catenin pathway forms a negative feedback loop during TGF-

- beta1 induced human normal skin fibroblast-to-myofibroblast transition, *Journal of dermatological science*. 65 (2012) 38-49.
- [72]. Guo L, Chen L, Bi S, Chai L, Wang Z, Cao C, Tao L, Li S. PTEN inhibits proliferation and functions of hypertrophic scar fibroblasts, *Molecular and cellular biochemistry*. 361 (2012) 161-8.
- [73]. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)?, *British journal of plastic surgery*. 57 (2004) 215-21.
- [74]. Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects, *Cell regulation*. 1 (1990) 875-82.
- [75]. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure, *Science*. 233 (1986) 532-4.
- [76]. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells, *Nature*. 316 (1985) 701-5.
- [77]. Flaumenhaft R, Abe M, Sato Y, Miyazono K, Harpel J, Heldin CH, Rifkin DB. Role of the latent TGF-beta binding protein in the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells, *The Journal of cell biology*. 120 (1993) 995-1002.

- [78]. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis, *Blood*. 96 (2000) 2022-36.
- [79]. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system, *The EMBO journal*. 19 (2000) 1745-54.
- [80]. Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling, *Journal of cell science*. 113 (Pt 7) (2000) 1101-9.
- [81]. Wu G, Chen YG, Ozdamar B, Gyuricza CA, Chong PA, Wrana JL, Massague J, Shi Y. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation, *Science*. 287 (2000) 92-7.
- [82]. Kaya M, Yildirim CH, Kosemehmetoglu K, Huseyinoglu U, Erdogan H, Akbasak A, Tasdemiroglu E. Alpha-lipoic acid reduces peridural fibrosis after laminectomy of lumbar vertebrae in rabbits, *Acta neurochirurgica*. 154 (2012) 1241-5.
- [83]. Arribillaga L, Dotor J, Basagoiti M, Riezu-Boj JI, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ, Sarobe P, Cornet ME, Feijoo E. Therapeutic effect of a peptide inhibitor of TGF-beta on pulmonary fibrosis, *Cytokine*. 53 (2011) 327-33.
- [84]. Chen F, Wang C, Sun J, Wang J, Wang L, Li J. Salvianolic acid B reduced the formation of epidural fibrosis in an experimental rat model, *Journal of orthopaedic surgery and research*. 11 (2016) 141.
- [85]. Dai J, Li X, Yan L, Chen H, He J, Wang S, Wang J, Sun Y. The effect of suramin on inhibiting fibroblast proliferation and preventing epidural

- fibrosis after laminectomy in rats, *Journal of orthopaedic surgery and research*. 11 (2016) 108.
- [86]. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, 3rd, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis, *Annual review of medicine*. 55 (2004) 395-417.
- [87]. Turkoglu E, Dinc C, Tuncer C, Oktay M, Serbes G, Sekerci Z. Use of decorin to prevent epidural fibrosis in a post-laminectomy rat model, *European journal of pharmacology*. 724 (2014) 86-91.
- [88]. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix, *Advances in protein chemistry*. 70 (2005) 301-39.
- [89]. Massague J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling, *FEBS letters*. 580 (2006) 2811-20.
- [90]. Geneser F, *Textbook of histology*. 1st ed 1986, Copenhagen Philadelphia: Munksgaard; Lea & Febiger. 831 p.
- [91]. Karsdal MA, Leeming DJ, Henriksen K, Bay-Jensen A-C, *Biochemistry of collagens, laminins and elastin : structure, function and biomarkers*. xxxiv, 238 pages.
- [92]. Nicolás CJB, *Prevención de la Fibrosis Epidural en Conejos Mediante la Utilización de Distintos Tipos de Ácido Hialurónico.*, 2009: León.
- [93]. Eyre DR, Muir H. Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus, *The Biochemical journal*. 157 (1976) 267-70.

- [94]. Cabezudo JM, Lopez A, Bacci F. Symptomatic root compression by a free fat transplant after hemilaminectomy. Case report, Journal of neurosurgery. 63 (1985) 633-5.
- [95]. Abitbol JJ, Lincoln TL, Lind BI, Amiel D, Akeson WH, Garfin SR. Preventing postlaminectomy adhesion. A new experimental model, Spine. 19 (1994) 1809-14.
- [96]. Songer MN, Rauschnig W, Carson EW, Pandit SM. Analysis of peridural scar formation and its prevention after lumbar laminotomy and discectomy in dogs, Spine. 20 (1995) 571-80; discussion 579-80.
- [97]. He Y, Revel M, Loty B. A quantitative model of post-laminectomy scar formation. Effects of a nonsteroidal anti-inflammatory drug, Spine. 20 (1995) 557-63; discussion 579-80.
- [98]. Gerszten PC, Moossy JJ, Flickinger JC, Gerszten K, Kalend A, Martinez AJ. Inhibition of peridural fibrosis after laminectomy using low-dose external beam radiation in a dog model, Neurosurgery. 46 (2000) 1478-85.
- [99]. 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, International journal of radiation oncology, biology, physics. 51 (2001) 507-13.
- [100]. 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. 41 (2003) 427-31.

- [101]. Alkalay RN, Kim DH, Urry DW, Xu J, Parker TM, Glazer PA. Prevention of postlaminectomy epidural fibrosis using bioelastic materials, *Spine*. 28 (2003) 1659-65.
- [102]. Lee JY, Stenzel W, Ebel H, Wedekind C, Ernestus RI, Klug N. Mitomycin C in preventing spinal epidural fibrosis in a laminectomy model in rats, *Journal of neurosurgery*. 100 (2004) 52-5.
- [103]. Liu LM, Song YM, Duan H, Ding YL, Lu B. Effect of polylactic acid glue in preventing epidural scar adhesion after laminectomy in rabbits, *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi*. 9 (2006) 146-51.
- [104]. Tatsui CE, Martinez G, Li X, Pattany P, Levi AD. Evaluation of DuraGen in preventing peridural fibrosis in rabbits. Invited submission from the Joint Section Meeting on Disorders of the Spine and Peripheral Nerves, March 2005, *J Neurosurg Spine*. 4 (2006) 51-9.
- [105]. Sabuncuoglu H, Bavbek M, Sabuncuoglu B, Gadelha E, Kose K, Preul M. Attenuation of postlaminectomy epidural fibrosis with monoclonal antibodies against intercellular adhesion molecule-1 and CD-18, *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 7 (2007) 459-65.
- [106]. Sandoval MA, Hernandez-Vaquero D. Preventing peridural fibrosis with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity*

- Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society. 17 (2008) 451-455.
- [107]. 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*. 62 (2008) 1351-7; discussion 1357-8.
- [108]. 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, *Neurologia i neurochirurgia polska*. 42 (2008) 223-30.
- [109]. Yang J, Ni B, Liu J, Zhu L, Zhou W. Application of liposome-encapsulated hydroxycamptothecin in the prevention of epidural scar formation in New Zealand white rabbits, *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 11 (2011) 218-23.
- [110]. Sun Y, Wang LX, Wang L, Sun SX, Cao XJ, Wang P, Feng L. A comparison of the effectiveness of mitomycin C and 5-fluorouracil in the prevention of peridural adhesion after laminectomy, *Journal of neurosurgery*. Spine. 7 (2007) 423-8.
- [111]. Tian F, Dou C, Qi S, Zhao L, Chen B, Yan H, Zhang L. Preventive effect of dexamethasone gelatin sponge on the lumbosacral epidural adhesion, *International journal of clinical and experimental medicine*. 8 (2015) 5478-84.

- [112]. 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, *European journal of pharmacology*. 593 (2008) 44-8.
- [113]. Gurer B, Kahveci R, Gokce EC, Ozevren H, Turkoglu E, Gokce A. Evaluation of topical application and systemic administration of rosuvastatin in preventing epidural fibrosis in rats, *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 15 (2015) 522-9.
- [114]. Emmez H, Borcek AO, Durdag E, Uyar PG, Kaymaz M, Aykol S. Immunomodulatory effectiveness of azithromycin in prevention of postlaminectomy epidural fibrosis, *Neurological research*. 33 (2011) 344-8.
- [115]. Sae-Jung S, Jirattanaphochai K, Sumananont C, Wittayapairoj K, Sukhonthamarn K. Interrater Reliability of the Postoperative Epidural Fibrosis Classification: A Histopathologic Study in the Rat Model, *Asian spine journal*. 9 (2015) 587-94.
- [116]. Xu H, Liu C, Sun Z, Guo X, Zhang Y, Liu M, Li P. CCN5 attenuates profibrotic phenotypes of fibroblasts through the Smad6-CCN2 pathway: Potential role in epidural fibrosis, *International journal of molecular medicine*. 36 (2015) 123-9.
- [117]. Kanamori M, Kawaguchi Y, Ohmori K, Kimura T, Tsuji H, Matsui H. The fate of autogenous free-fat grafts after posterior lumbar surgery: part 2.

- Magnetic resonance imaging and histologic studies in repeated surgery cases, *Spine*. 26 (2001) 2264-70.
- [118]. Ezquerro IJ, Lasarte JJ, Dotor J, Castilla-Cortazar I, Bustos M, Penuelas I, Blanco G, Rodriguez C, Lechuga Mdel C, Greenwel P, Rojkind M, Prieto J, Borrás-Cuesta F. A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury, *Cytokine*. 22 (2003) 12-20.
- [119]. Ruiz-de-Erenchun R, Dotor de las Herrerías J, Hontanilla B. Use of the transforming growth factor-beta1 inhibitor peptide in periprosthetic capsular fibrosis: experimental model with tetraglycerol dipalmitate, *Plastic and reconstructive surgery*. 116 (2005) 1370-8.
- [120]. Santiago B, Gutierrez-Canas I, Dotor J, Palao G, Lasarte JJ, Ruiz J, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Pablos JL. Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis, *The Journal of investigative dermatology*. 125 (2005) 450-5.
- [121]. Hermida N, Lopez B, Gonzalez A, Dotor J, Lasarte JJ, Sarobe P, Borrás-Cuesta F, Diez J. A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats, *Cardiovasc Res*. 81 (2009) 601-9.
- [122]. Gil-Guerrero L, Dotor J, Huibregtse IL, Casares N, Lopez-Vazquez AB, Rudilla F, Riezu-Boj JI, Lopez-Sagaseta J, Hermida J, Van Deventer S, Bezunartea J, Llopiz D, Sarobe P, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ.

- In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1, *Journal of immunology*. 181 (2008) 126-35.
- [123]. Frederickson RC. ADCON-L: a review of its development, mechanism of action, and preclinical data, *Eur Spine J*. 5 Suppl 1 (1996) S7-9.
- [124]. de Tribolet N, Porchet F, Lutz TW, Gratzl O, Brotchi J, van Alphen HA, van Acker RE, Benini A, Strommer KN, Bernays RL, Goffin J, Beuls EA, Ross JS. Clinical assessment of a novel antiadhesion barrier gel: prospective, randomized, multicenter, clinical trial of ADCON-L to inhibit postoperative peridural fibrosis and related symptoms after lumbar discectomy, *American journal of orthopedics*. 27 (1998) 111-20.
- [125]. Kurt G, Aytar MH, Dogulu F, Cemil B, Erdem O, Baykaner MK, Ceviker N. A comparison of the local effectiveness of mitomycin C, aprotinin, and Adcon-L in experimental peridural fibrosis, *Surgical neurology*. 70 (2008) 608-13; discussion 613.
- [126]. Petrie JL, Ross JS. Use of ADCON-L to inhibit postoperative peridural fibrosis and related symptoms following lumbar disc surgery: a preliminary report, *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 5 Suppl 1 (1996) S10-7.
- [127]. Hieb LD, Stevens DL. Spontaneous postoperative cerebrospinal fluid leaks following application of anti-adhesion barrier gel: case report and review of the literature, *Spine*. 26 (2001) 748-51.

- [128]. Liu S, Boutrand JP, Bittoun J, Tadie M. A collagen-based sealant to prevent in vivo reformation of epidural scar adhesions in an adult rat laminectomy model, *Journal of neurosurgery*. 97 (2002) 69-74.
- [129]. Narotam PK, Jose S, Nathoo N, Taylon C, Vora Y. Collagen matrix (DuraGen) in dural repair: analysis of a new modified technique, *Spine*. 29 (2004) 2861-7; discussion 2868-9.
- [130]. Preul MC, Campbell PK, Garlick DS, Spetzler RF. Application of a new hydrogel dural sealant that reduces epidural adhesion formation: evaluation in a large animal laminectomy model, *J Neurosurg Spine*. 12 (2010) 381-90.
- [131]. Greenaway JB, Partlow GD, Gonsholt NL, Fisher KR. Anatomy of the lumbosacral spinal cord in rabbits, *Journal of the American Animal Hospital Association*. 37 (2001) 27-34.
- [132]. Robertson JT, Meric AL, Dohan FC, Jr., Schweitzer JB, Wujek JR, Ahmad S. The reduction of postlaminectomy peridural fibrosis in rabbits by a carbohydrate polymer, *Journal of neurosurgery*. 79 (1993) 89-95.
- [133]. Li C, Wang H, Liu H, Yin J, Cui L, Chen Z. The prevention effect of poly (L-glutamic acid)/chitosan on spinal epidural fibrosis and peridural adhesion in the post-laminectomy rabbit model, *Eur Spine J*. 23 (2014) 2423-31.
- [134]. Nevzati E, Soleman J, Schopf SA, Coluccia D, Fandino J, Marbacher S. An Interlaminotomy New Zealand White Rabbit Model to Evaluate Novel

- Epidural Strategies, Journal of neurological surgery. Part A, Central European neurosurgery. 76 (2015) 466-72.
- [135]. Boot DA, Hughes SP. The prevention of adhesions after laminectomy. Adverse results of Zenoderm implantations into laminectomy sites in rabbits, Clin Orthop Relat Res. (1987) 296-302.
- [136]. Li Z, Taguchi T, Gondo T, Kawai S, Toyoda K. Experimental study of osteoplastic laminectomy in the lumbar spine of rabbits, Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association. 8 (2003) 858-63.
- [137]. Rodgers KE, Robertson JT, Espinoza T, Oppelt W, Cortese S, diZerega GS, Berg RA. Reduction of epidural fibrosis in lumbar surgery with Oxiplex adhesion barriers of carboxymethylcellulose and polyethylene oxide, The spine journal : official journal of the North American Spine Society. 3 (2003) 277-83; discussion 284.
- [138]. Keskin F, Esen H. Comparison of the effects of an adhesion barrier and chitin on experimental epidural fibrosis, Turkish neurosurgery. 20 (2010) 457-63.
- [139]. Sae-Jung S, Jirarattanaphochai K. Prevention of peridural fibrosis using a cyclooxygenase-2 inhibitor (nonsteroidal anti-inflammatory drug) soaked in absorbable gelatin sponge: an experimental comparative animal model, Spine. 38 (2013) E985-91.
- [140]. Kuhn J, Hofmann B, Knitelius HO, Coenen HH, Bewermeyer H. Bilateral subdural haematomata and lumbar pseudomeningocele due to a chronic

- leakage of liquor cerebrospinalis after a lumbar discectomy with the application of ADCON-L gel, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 76 (2005) 1031-3.
- [141]. Ferguson MW, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention, *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 359 (2004) 839-50.
- [142]. Gomez R SJ, Bergera J, Ansó M, Gorría O, Qiu SS, Aubá C, Hontanilla B. Nerve regeneration after local administration of the inhibitor peptide of the TGF- β 1(P144®), *Eur J Plast Surg*. 33 (2010) 135-142.
- [143]. Qiu SS, Dotor J, Hontanilla B. Effect of P144(R) (Anti-TGF-beta) in an "In Vivo" Human Hypertrophic Scar Model in Nude Mice, *PloS one*. 10 (2015) e0144489.
- [144]. Dong Y, Chen X, Wang M, Hong Y. Construction of artificial laminae of the vertebral arch using bone marrow mesenchymal stem cells transplanted in collagen sponge, *Spine*. 37 (2012) 648-53.
- [145]. Haq I, Cruz-Almeida Y, Siqueira EB, Norenberg M, Green BA, Levi AD. Postoperative fibrosis after surgical treatment of the porcine spinal cord: a comparison of dural substitutes. Invited submission from the Joint Section Meeting on Disorders of the Spine and Peripheral Nerves, March 2004, *J Neurosurg Spine*. 2 (2005) 50-4.



Anexos



Anexo 1

Adherencia (A):

0	Ausencia de cicatriz epidural
1	Mínima, existencia de finas bandas de fibrosis en contacto con la duramadre
2	Moderada, bandas de fibrosis en menos de 2/3 de la longitud de la zona dorsal de la dura involucrada en la cicatriz
3	Marcada, más de 2/3 de la longitud de la zona dorsal de la dura involucrada en la cicatriz



Anexo 2

Densidad de la cicatriz (DC):

0	Sin cicatriz
1	A lo largo de la longitud de la adherencia tejido conectivo escaso y poco organizado
2	La mayor parte de la cicatriz formada por tejido conectivo poco organizado a lo largo de su longitud
3	Cicatriz con mayoría de tejido conectivo denso y organizado a lo largo de su longitud



Anexo 3

Infiltrado inflamatorio

0	Ausencia de infiltrado inflamatorio
1	Leve, área del infiltrado a 100X menor del 30%
2	Moderado, área del infiltrado inflamatorio a 100X entre 30-70%
3	Severo, área de infiltrado inflamatorio de hasta un 70%, evidente a 40X