







Universidad  
Francisco de Vitoria  
**UFV** Madrid

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA, MEDICINA Y CIENCIAS  
BIOSANITARIAS**

**TESIS DOCTORAL**

**DESARROLLO DE FORMULACIONES  
INYECTABLES AVANZADAS PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTROSIS EN  
UN MODELO EXPERIMENTAL DE CONEJO**

**Marta Olmeda Lozano**

**Madrid, 2018**





Universidad  
Francisco de Vitoria  
**UFV Madrid**

**TESIS DOCTORAL**

**DESARROLLO DE FORMULACIONES  
INYECTABLES AVANZADAS PARA EL  
TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTROSIS EN  
UN MODELO EXPERIMENTAL DE CONEJO**

**Autor:** Marta Olmeda Lozano

**Centro:** Facultad de Medicina

**Directores:** Dr. Antonio Pérez-Caballer

Dra. María Blanca Vázquez Lasa



# AGRADECIMIENTOS

El camino hasta aquí ha sido largo y ha presentado dificultades que he podido solventar gracias a la ayuda de múltiples personas que me han brindado su apoyo, enseñanza y ánimos a lo largo de estos años.

Quería agradecer, en primer lugar, a mis directores de tesis, el Dr. Antonio Pérez-Caballer y la Dra. Blanca Vázquez por estimularme y embarcarme en este proyecto, por abrirme las puertas al mundo de la investigación y por su gran ayuda, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizar esta tesis.

Al Dr. Julio San Román, y a su equipo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por su gran profesionalidad y, en especial, de nuevo a Blanca por tantas horas dedicadas a este proyecto, y al Dr. Luis García que ha sido un gran apoyo tanto a nivel investigador como a nivel personal ya que sin él no habría sido posible llegar hasta el final.

Al equipo del Departamento de Anatomía e Histología Humana de la Universidad de Salamanca, principalmente a Lorena, por todo su trabajo y por el gran apoyo que he recibido.

A Marta López Laguna por la ayuda recibida en la propuesta y desarrollo de esta tesis, y por sus consejos sobretodo al inicio de embarcarnos en este proyecto.

A mis compañeros del Servicio de Traumatología del Hospital Universitario Infanta Elena por todas las horas de trabajo, amistad y ánimos en este largo camino.

Por último, quería agradecer a mi familia todo el apoyo que me han dado, a mis padres y hermanas por enseñarme a llevar a cabo mis sueños aunque el camino sea complicado y nunca dejarme sola por muy largo que sea. Y finalmente, gracias Álvaro por toda la paciencia que has tenido en estos últimos y duros años, por sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles y por estar siempre a mi lado.

Gracias a todos.



# ABREVIATURAS

**AB:** *Alamar Blue*

**ACI:** implante de condrocitos autólogos

**AH:** ácido hialurónico

**AINES:** anti-inflamatorios no esteroideos

**DEX:** dextrano

**DEX20:** dextrano de peso molecular 20 kDa

**DEX40:** dextrano de peso molecular 40 kDa

**DEX70:** dextrano de peso molecular 70 kDa

**DEX20-ox:** dextrano de peso molecular 20 kDa oxidado

**DEX40-ox:** dextrano de peso molecular 40 kDa oxidado

**DEX70-ox:** dextrano de peso molecular 70 kDa oxidado

**DEX70-ox(40%):** dextrano de peso molecular 70 kDa oxidado al 40 %

**Dexa:** dexametasona

**DMOAD:** fármacos modificadores de la enfermedad por osteoartritis

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**FDA:** Federación de Alimentos y Medicamentos

**GAG:** glicosaminoglicanos

**Gel:** gelatina

**GLP:** glicoproteína lubricante

**GPC:** cromatografía de permeabilidad en gel

**GTA:** glutaraldehído

**H-Dexa:** hidrogel con dexametasona

**H-Nap:** hidrogel con naproxeno

**H:** hidrogel

**H/D:** ratio de hinchamiento/degradación

**H/E:** hematoxilina/eosina

**HAC:** condrocitos articulares humanos

**HDF:** fibroblastos dérmicos humanos

**HOB:** osteoblastos humanos primarios

**HRP:** peroxidasa de origen natural

**IC<sub>50</sub>:** concentración inhibitoria media

**IEP:** punto isoeléctrico

**IT:** ingeniería tisular

**IUPAC:** Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

**LCA:** ligamento cruzado anterior

**LDH:** lactato deshidrogenasa

**MA:** metacrililo

**MACI:** implante de condrocitos autólogos en membrana

**MEC:** matriz extracelular

**MMP:** metaloproteinasas

**MSC:** células madre mesenquimales

**MTT:** bromuro de 3-5(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

**NaIO<sub>4</sub>:** periodato sódico

**NaOH:** hidróxido de sodio

**Nap:** naproxeno

**OA:** osteoartrosis

**OATS:** tejidos autólogos osteocondrales

**OCAS:** aloinjertos osteocondrales

**P-ACI:** implante de condrocitos autólogos en periostio

**PB:** tampón fosfato

**PBS:** tampón fosfato salino

**PEG:** polietilenglicol

**PEG-DA:** polietilenglicol diacrilato

**PM:** peso molecular

**RHAMM:** receptor de la motilidad mediada por ácido hialurónico

**SEA:** Servicio de Experimentación Animal

**Semi-IPN:** red polimérica semi-interpenetrada

**SGRM:** soportes guiados de medicina regenerativa

**SOV:** safranina-O/verde rápido

**SYSADOA:** fármacos de acción lenta para la osteoartritis

**t-BC:** carbazato de t-butilo

**TMX:** thermanox®

**USAL:** universidad de Salamanca

**UV:** ultravioleta



## LISTADO DE TABLAS

**Tabla 1.** Composición química de los diferentes tampones de pH = 7,4 ensayados como medio de reacción.

**Tabla 2.** Composición final de las formulaciones inyectables. H: hidrogel sin fármaco. H-Nap: hidrogel con naproxeno. H-Dexa: hidrogel con dexametasona. Nap: naproxeno. Dexa: dexametasona.

**Tabla 3.** Grupos de trabajo ensayados *in vivo* en función de la formación de osteoartrosis y del tratamiento dado en cada caso. (PBS: tampón fosfato salino, H-Nap: hidrogel con naproxeno, H-Dexa: hidrogel con dexametasona).

**Tabla 4.** Escala de Yosioka de la osteoartrosis: evaluación macroscópica del cartílago articular.

**Tabla 5.** Determinación del grado de oxidación (% ox.) y peso molecular (PM) de los dextranos antes y después de dializar. DEX20: dextrano de PM 20 kDa. DEX40: dextrano de PM 40 kDa. DEX70: dextrano de PM 70 kDa. Adh, aldehídos; m, muestra.

**Tabla 6.** Variación del grado de oxidación (% ox.) de dextranos de distintos pesos moleculares en función de la ratio  $\text{NaIO}_4/\text{Dextrano}$ .

**Tabla 7.** Variación de peso molecular de dextranos en función de la ratio  $\text{NaIO}_4/\text{Dextrano}$ .

**Tabla 8.** Tiempos de gelificación de gelatina con dextranos de diferentes grados de oxidación y pesos moleculares, en ausencia de ácido hialurónico.

**Tabla 9.** Variación de los tiempos de gelificación de la gelatina con DEX70-ox(40%) en presencia de ácido hialurónico de peso molecular 200 kDa.

**Tabla 10.** Tiempos de gelificación de los diferentes tampones de pH = 7,4 (tampón fosfato con sales potásicas, tampón fosfato con sales sódicas y potásicas, y tampón citrato).

**Tabla 11.** Tiempos de gelificación de las formulaciones con AH de diferentes pesos moleculares manteniendo constante la viscosidad.

**Tabla 12.** Tiempos de gelificación de las formulaciones con AH de peso molecular medio (800 – 1000 kDa) variando la proporción final de AH.

**Tabla 13.** Tiempos de gelificación de las formulaciones con AH de peso molecular medio en presencia de anti-inflamatorios. Nap: naproxeno. Dexa: dexametasona.

**Tabla 14.** Composición de las formulaciones finales inyectables incorporando naproxeno (Nap) o dexametasona (Dexa).





## LISTADO DE FIGURAS

**Figura 1.** Estructura tridimensional del colágeno. Tomada de *Biochemistry-Ch4 protein structure and function*. W.H. Freeman and Company 2003).

**Figura 2.** Representación esquemática de la matriz extracelular y sus principales componentes. Tomada de Murray R, Bender D, Botham K, Kennelly P, Rodweil V, Weil A. *Bioquímica ilustrada*, 29ª edición: [www. accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com).

**Figura 3.** Histología del cartílago articular normal. Imágenes **A** y **B**: en la capa superficial o zona I, los condrocitos son algo más pequeños y aplanados y están situados de forma paralela a la superficie articular. En la zona media o zona II, los condrocitos son algo más grandes, esféricos y se encuentran solos o en grupos. En la zona III o profunda, los condrocitos son más elípticos, forman columnas y se orientan perpendicularmente a la superficie. En la zona IV o calcificada, los condrocitos están más esparcidos. Tomada de López-Armada B, Cillero-Pastor B, Blanco García F. *Fisiopatología de la artrosis ¿cuál es la actualidad?* Rev. Esp. Reumatol. 2004; 31(6):379-9.

**Figura 4.** Histología del cartílago articular artrósico. Las imágenes **A** y **B** muestran los cambios típicos del cartílago artrósico: se produce un descenso en el contenido de la matriz extracelular y del número de condrocitos, principalmente en las capas I y II. Esta hipocelularidad se ocasiona por un incremento en la apoptosis de los condrocitos artrósicos. Tomada de López-Armada B, Cillero-Pastor B, Blanco García F. *Fisiopatología de la artrosis ¿cuál es la actualidad?* Rev. Esp. Reumatol. 2004; 31(6):379-93.

**Figura 5.** (a) Lesión osteocondral en fémur distal tras desbridamiento y previa punción. (b) Postmicrofractura de la lesión con sangrado del hueso subcondral. Tomada de York PJ, Wydra FB, Belton ME, Vidal AF. *Joint Preservation Techniques in Orthopaedic Surgery*. Sports Health. 2017;9(6):545-54.

**Figura 6.** Técnica de mosaicoplastia. Los cilindros osteocondrales se obtienen de zonas que no soportan carga en la articulación afectada y se introducen a presión en el defecto osteocondral, creando un “mosaico” de autoinjerto para rellenar la lesión. Tomada de López-Puerta J, Zamora-Navas P, Claros S, Rico-Llanos G, Avedillo I, Andrades J, Becerna J. *Is the articular cartilage regeneration approachable through mesenchymal stem cells therapies?* Libro “*Regenerative Medicine and Tissue Engineering*” publicado en mayo de 2013.

**Figura 7.** Implantación de aloinjerto osteocondral. (a) Imagen artroscópica de una gran lesión osteocondral. (b) Preparación del lecho óseo de la lesión. (c) El injerto preparado se coloca en el defecto. (d) El injerto se golpea suavemente en su posición teniendo cuidado de alinear los cuadrantes predeterminados. Tomada de York PJ, Wydra FB, Belton ME, Vidal AF. *Joint Preservation Techniques in Orthopaedic Surgery*. Sports Health. 2017;9(6):545-54.

**Figura 8.** (A) Lesión condral tratada con una matriz de fibrina. (B) Medición de la lesión. (C) Colocación de la matriz con condrocitos cultivados. (D) Sutura de estabilización. Tomada de Alvarez ER, P; Restrepo, A; Forriol F. Revisión de la reparación del cartílago. Posibilidades y resultados. *Trauma Fund Mapfre*. 2010;21:117-34.

**Figura 9.** Indicaciones generales para el tratamiento de las lesiones condrales. Tomada de Alvarez ER, P; Restrepo, A; Forriol F. Revisión de la reparación del cartílago. Posibilidades y resultados. *Trauma Fund Mapfre*. 2010;21:117-34.

**Figura 10.** Estructura química del hialuronato sódico.

**Figura 11.** Esquema de los componentes de las formulaciones inyectables y de la estructura de red semi-interpenetrada.

**Figura 12.** Estructura química del dextrano. Tomada de *Polysaccharides Route: A New Green Strategy for Metal Oxides Synthesis* Junio 2012. *Environmental Chemistry for a Sustainable World*.

**Figura 13.** Esquema de preparación de formulaciones con estructura de red semi-IPN incorporando anti-inflamatorios. Representación gráfica de los componentes A y B de la formulación inyectable y de la red semi-IPN incorporando anti-inflamatorios.

**Figura 14.** (A) Estructura química del bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). (B) Reacción de oxido-reducción en la que el lactato se trasforma en piruvato por acción de la LDH. Al reducirse  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}/\text{H}^+$ , la sal de tetrazolio (MTT) se reduce a formazán.

**Figura 15.** La reducción del reactivo *Alamar Blue*, desde su estado oxidado (resazurín) a su estado reducido (resofurín) conlleva un cambio en su color, informando de la viabilidad celular.

**Figura 16.** Línea del tiempo mostrando el periodo en el que se realizan las distintas infiltraciones y la eutanasia de los animales.

**Figura 17.** Viabilidad celular de fibroblastos a diferentes concentraciones de los tres tampones de pH = 7,4 ensayados. Se representa la media y la desviación estándar de los datos.

**Figura 18.** Variación de la ratio de hinchamiento/degradación con el tiempo de inmersión de los hidrogeles H, H-Nap y H-Dexa en tampón a pH = 7,4 y 37 °C de temperatura. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de n = 3.

**Figura 19.** Liberación de naproxeno correspondiente al hidrogel H-Nap y liberación de dexametasona correspondiente al hidrogel H-Dexa en tampón fosfato (pH = 7,4) y a 37 °C de temperatura. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de n = 3.

**Figura 20.** Viabilidad celular de fibroblastos en función de la concentración del DEX70 y DEX70-ox(40%). Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de n = 12.

**Figura 21.** Viabilidad celular de condrocitos en presencia de distintas concentraciones de naproxeno. (Nap: naproxeno). Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de n = 12.

**Figura 22.** Viabilidad celular tras el ensayo MTT para los hidrogeles sin y con fármaco en condrocitos. H: hidrogel sin fármaco, H-Nap: hidrogel con naproxeno, H-Dexa: hidrogel con dexametasona. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de n = 16. Los datos se han comparado con el control mediante el test ANOVA utilizando la ecuación de Tukey (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0,001).

**Figura 23.** Viabilidad celular tras el ensayo MTT para los hidrogeles sin y con fármaco en osteoblastos. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de n = 12. Los datos se han comparado con el control mediante el test ANOVA utilizando la ecuación de Tukey (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0,001).

**Figura 24.** Resultados del ensayo *Alamar Blue* para hidrogeles con y sin fármaco en condrocitos. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de n = 32. Los datos se han comparado con el control mediante el test ANOVA utilizando la ecuación de Tukey (\* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0,001).

**Figura 25.** Resultados del ensayo *Alamar Blue* para hidrogeles con y sin fármaco en osteoblastos. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un

conjunto de  $n = 32$ . Los datos se han comparado con el control mediante el test ANOVA utilizando la ecuación de Tukey (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

**Figura 26.** (A) Aspecto macroscópico de la cápsula articular del grupo II tras 2 infiltraciones de colagenasa. (B) Aspecto macroscópico de la cápsula articular del grupo I tras infiltración con PBS.

**Figura 27.** (A) Membrana sinovial hipertrófica en el grupo II. (B): Membrana sinovial de características normales en el grupo I.

**Figura 28.** (A) Rodilla del grupo II: se observa fibrilación en el cóndilo femoral interno, presentando un aspecto más eritematoso (\*). (B) Rodilla del grupo I: aspecto macroscópico normal.

**Figura 29.** (A) Rodilla del grupo III (con 3 infiltraciones de colagenasa): lesión en cóndilo femoral interno (\*) grado 3 de Yosioka. (B) Rodilla del grupo I de aspecto normal.

**Figura 30.** (A) Rodilla sana (grupo I), con aspecto de la membrana sinovial normal. (B) Rodilla del grupo IV, con progresión de osteoartrosis sin tratamiento con membrana sinovial más congestiva e inflamada y engrosada.

**Figura 31.** Grupo IV: osteofitos en meseta tibial (\*) y lesión condral grado 3 de Yosioka en cóndilo femoral (+).

**Figura 32.** Grupo V: (A) Lesión grado 2 de Yosioka en cóndilo femoral. (B) Pequeñas irregularidades en meseta tibial en menor proporción que el grupo IV.

**Figura 33.** (A) Rodilla del grupo V con menor componente inflamatorio. (B) Rodilla del grupo VI con cambio de coloración de las partes blandas.

**Figura 34.** Imágenes microscópicas de diferentes cortes del grupo I, cartílago articular normal con tinción de hematoxilina/eosina. (a) Imagen a 4x en donde se observa hueso subcondral y cartílago. (b) Imagen a 10x. (c) Imagen a 20x donde se observan condrocitos en columnas rodeados de MEC.

**Figura 35.** Imágenes microscópicas del grupo I mediante la tinción de SO/V. (a) Imagen de MEC homogénea y normal. (b) Se observa un cartílago articular de grosor normal.

**Figura 36.** Imagen microscópica del grupo I donde se observa el marcaje inmunológico frente al colágeno tipo II de forma homogénea y en la totalidad del cartílago articular (10x).

**Figura 37.** Imágenes microscópicas de diferentes cortes del cartílago articular del grupo II con tinción de hematoxilina/eosina. **(a)** Imagen a 10x donde se muestra la zona levemente lesionada con una ligera alteración en la capa superficial del cartílago articular. **(b)** Imagen a 20x donde se observa un leve erosionado de la superficie articular alterada.

**Figura 38.** Imágenes microscópicas del grupo II con tinción de hematoxilina/eosina. **(a)** Imagen a 20x donde se aprecia la casi plena conservación de la disposición de los condrocitos en columnas. **(b)** Imagen a 20x donde se observa el predominio de la distribución en columnas de los condrocitos, distinguiéndose también alguna condrona hiperplásica. La zona más superficial se encuentra levemente erosionada.

**Figura 39.** Imágenes microscópicas correspondientes al grupo III de osteoartrosis inducida con colagenasa con tinción de H/E. **(a)** Imagen a 4x donde se pone de manifiesto la irregularidad del cartílago articular, presentando numerosas y profundas fisuras, acompañado de fragmentos de cartílago desprendido. **(b)** Imagen a 10x donde se observa un aumento tanto en el número como en el tamaño celular.

**Figura 40.** Imagen microscópica del grupo III que refleja fisuras profundas en el cartílago que casi alcanzan la capa calcificada. Esta capa presenta tinción de safranina a diferencia de las capas más superficiales del cartílago (SO/V, 10x).

**Figura 41.** Imagen microscópica del grupo III donde se observa el marcaje inmunológico frente al colágeno tipo II exclusivamente en la zona de transición entre la capa profunda del cartílago articular y el hueso subcondral. **(a)** Imagen 10x donde se observa coloración marrón en la capa profunda en transición con el hueso subcondral y ausencia de colágeno tipo II en las capas superficiales. **(b)** Imagen 10x donde se muestra la superficie articular fisurada y sin detectar colágeno tipo II.

**Figura 42.** Imágenes microscópicas del grupo IV con tinción de H/E de la superficie articular que muestra degeneración del cartílago. **(a)** Imagen 4x donde se observa un cartílago articular muy adelgazado y altamente fragmentado. **(b)** Imagen 10x donde se muestran múltiples fisuras y un componente celular escaso.

**Figura 43.** Imágenes microscópicas del grupo IV mediante tinción de H/E. **(a)** Imagen 20x donde se muestra un desprendimiento en bloque de parte del cartílago con una distribución celular heterogénea. Se observa penetración de la capa calcificada en el hueso subcondral. **(b)** Imagen 20x con gran alteración celular y condronas hiperplásicas. La transición con el hueso subcondral presenta alteraciones, es irregular y tiene una mayor vascularización.

**Figura 44.** Imágenes microscópicas del grupo IV con tinción SO/V. **(a)** Imagen 10x que muestra ausencia de coloración en las capas superficiales debido a la ausencia de proteoglicanos en la MEC. **(b)** Imagen 20x donde se observa que la coloración con safranina está presente únicamente en la capa más profunda del cartílago articular.

**Figura 45.** Imagen microscópica del grupo IV donde se observa ausencia casi completa de marcaje inmunológico frente al colágeno tipo II, mostrándose zonas puntuales inmunomarcadas. **(a)** Imagen 10x. **(b)** Imagen 40x.

**Figura 46.** Imágenes microscópicas del grupo V con tinción de H/E. **(a)** Imagen 4x donde se observan leves fisuras y algún pequeño fragmento aislado de cartílago desprendido. El límite con el hueso subcondral está conservado. **(b)** Imagen 10x donde se muestran fisuras superficiales y una distribución de los condrocitos en columnas. **(c)** Imagen 20x del cartílago articular con condrocitos dispuestos tanto en columnas como agrupados formando pequeñas agrupaciones de condronas hiperplásicas.

**Figura 47.** Imágenes microscópicas del grupo V con tinción SO/V. **(a)** Imagen 10x donde se observa una MEC con una composición muy conservada. **(b)** Imagen 10x donde se pone de manifiesto una coloración homogénea y con patrones característicos de una MEC normal.

**Figura 48.** Imágenes microscópicas del grupo V con tinción SO/V. **(a)** Imagen 10x donde se observan numerosas condronas hiperplásicas y tinción de la MEC tanto en las capas más profundas como dentro de las condronas, indicando la presencia de proteoglicanos. **(b)** Imagen 20x donde se muestra disminución de la tinción de la MEC en las zonas más superficiales, sin embargo la presencia de coloración es más notable en la capa profunda.

**Figura 49.** Imagen microscópica del grupo V de inmunohistoquímica frente a colágeno tipo II donde se observa inmunoreactividad en la capa profunda en transición con el hueso subcondral y una señal inmunológica muy débil en la matriz interterritorial. **(a)** Imagen 10x. **(b)** Imagen 20x.

**Figura 50.** Imágenes microscópicas del grupo VI mediante tinción de H/E. **(a)** Imagen 4x de la superficie articular con notables irregularidades, fisuras y ligera disminución del grosor del cartílago. **(b)** Imagen 10x donde se observa una distribución alterada de los condrocitos formando condronas hiperplásicas. También se observan fragmentos desprendidos del cartílago con celularidad en su interior.

**Figura 51.** Imágenes microscópicas del grupo VI con tinción de H/E. **(a)** Imagen 10x que muestra la presencia de condronas hiperplásicas en la capa más superficial del cartílago. **(b)** Imagen 20x donde se observa la organización de los condrocitos en condronas hiperplásicas distribuidas por todas las capas del cartílago.

**Figura 52.** Imagen microscópica del grupo VI con tinción SO/V donde se aprecia ausencia de coloración en las capas más superficiales del cartílago debido a la alteración de la composición de la MEC. La capa más profunda, en transición con el hueso subcondral, es la que muestra presencia de proteoglicanos.

**Figura 53.** Imagen microscópica del grupo VI de inmunohistoquímica frente a colágeno tipo II donde se observa un marcaje más intenso en la capa profunda en transición con el hueso subcondral y una señal inmunológica muy débil en la matriz interterritorial. **(a)** Imagen 10x. **(b)** Imagen 20x.



# ÍNDICE

<b>Capítulo 1/Chapter 1. Resumen/Summary .....</b>	<b>1/7</b>
<b>Capítulo 2. Introducción.....</b>	<b>13</b>
<b>1. La articulación.....</b>	<b>15</b>
1.1 El cartílago articular.....	15
1.1.1 Componente celular del cartílago .....	16
1.1.2 La matriz extracelular .....	16
1.1.3 Organización del cartílago articular.....	20
1.1.4 Nutrición del cartílago articular.....	21
1.1.5 Propiedades biomecánicas del cartílago articular .....	22
1.2. El hueso.....	22
1.2.1 Las células óseas.....	22
1.2.2 La matriz extracelular ósea.....	23
1.2.3 El hueso subcondral .....	23
<b>2. Renovación tisular normal, capacidad de cicatrización y regeneración del cartílago.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Patología de la articulación.....</b>	<b>24</b>
3.1 Patología degenerativa: osteoartrosis.....	25
3.2 Lesiones traumáticas.....	26
3.3 Alteraciones metabólicas del hueso subcondral.....	27
<b>4. Opciones terapéuticas .....</b>	<b>27</b>
4.1 Tratamiento conservador .....	28
4.2 Tratamiento quirúrgico .....	29

4.2.1. Métodos reparativos .....	29
4.2.2. Métodos reconstructivos .....	30
4.2.3. Métodos regenerativos .....	33
4.2.4. Nuevas estrategias .....	35
<b>5. Uso de biomateriales en biomedicina.....</b>	<b>36</b>
5.1 Biomateriales en Traumatología y Cirugía Máxilofacial.....	37
5.2 Biomateriales en la regeneración del cartílago.....	38
5.2.1. Aplicaciones clínicas.....	40
<b>Capítulo 3. Objetivos.....</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo 4. Materiales y Métodos.....</b>	<b>51</b>
<b>1. Desarrollo de formulaciones inyectables .....</b>	<b>53</b>
1.1 Diseño de formulaciones inyectables con estructura de red semi-interpenetrada de gelatina y ácido hialurónico .....	55
1.2 Elección, preparación y caracterización del agente entrecruzante..	56
1.3 Desarrollo preliminar de formulaciones con estructura de red semi-interpenetrada .....	57
1.3.1 Estudio del tiempo de inyección.....	58
1.3.2 Elección del medio de reacción .....	58
1.3.3 Efecto del peso molecular del ácido hialurónico en el tiempo de inyección .....	59
1.3.4 Incorporación de anti-inflamatorios .....	60
1.4 Composición final y preparación de las formulaciones con estructura de red semi-interpenetrada.....	60
<b>2. Hinchamiento y degradación de los hidrogeles .....</b>	<b>62</b>

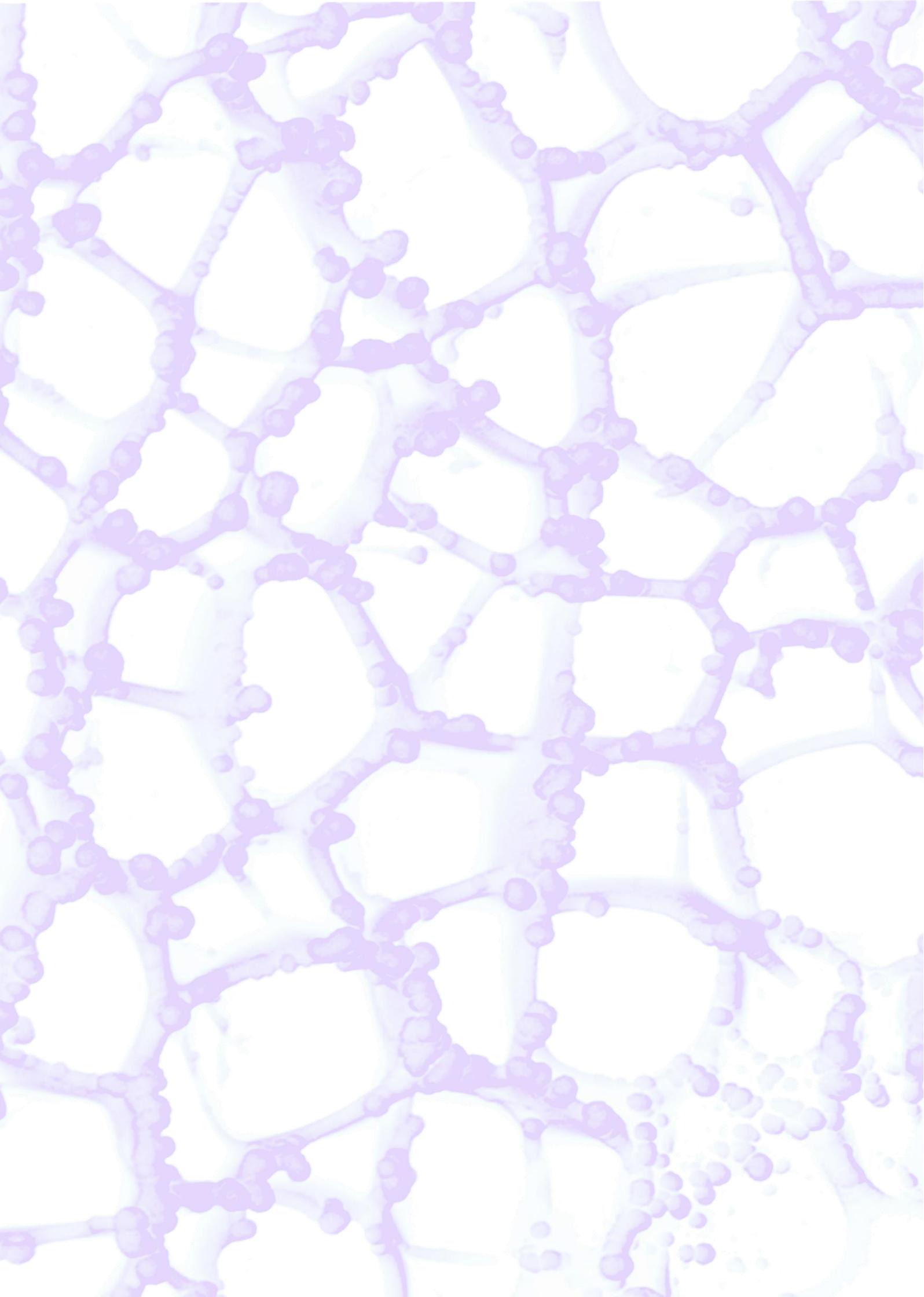
<b>3. Liberación <i>in vitro</i> de los anti-inflamatorios</b> .....	63
<b>4. Comportamiento celular <i>in vitro</i></b> .....	63
4.1 Tipos de células y cultivos celulares.....	64
4.2 Valoración de citotoxicidad mediante el empleo de MTT .....	64
4.2.1 Ensayo de citotoxicidad del agente entrecruzante y los anti- inflamatorios: IC <sub>50</sub> .....	65
4.2.2 Citotoxicidad mediante ensayo indirecto.....	67
4.3 Proliferación celular utilizando el ensayo <i>Alamar Blue</i> .....	67
4.3.1 Ensayo de adhesión celular.....	68
<b>5. Experimentación <i>in vivo</i> de las formulaciones inyectables</b> .....	69
5.1 El animal de experimentación .....	69
5.2 Modelo experimental de osteoartrosis.....	70
5.2.1 Creación de la lesión de osteoartrosis .....	70
5.2.2 Formulaciones y grupos de estudio .....	70
5.3 Procedimiento quirúrgico .....	72
5.4 Eutanasia y recogida de las muestras.....	73
5.5 Análisis macroscópico de las muestras.....	74
5.6 Procesamiento biológico de las muestras.....	74
5.7 Valoración microscópica .....	75
<b>Capítulo 5. Resultados</b> .....	79
<b>1. Preparación y caracterización del agente entrecruzante</b> .....	81
<b>2. Desarrollo de las formulaciones inyectables</b> .....	82

2.1	Estudio del tiempo de inyección.....	83
2.2	Medio de reacción .....	85
2.3	Peso molecular del ácido hialurónico .....	86
2.4	Incorporación de anti-inflamatorios.....	87
2.5	Composición final de las formulaciones inyectables.....	88
<b>3.</b>	<b>Comportamiento <i>in vitro</i> de los hidrogeles: hinchamiento y degradación.....</b>	<b>89</b>
<b>4.</b>	<b>Perfiles de liberación de fármaco <i>in vitro</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>5.</b>	<b>Respuesta celular <i>in vitro</i>.....</b>	<b>91</b>
5.1	Resultados del ensayo de citotoxicidad: IC <sub>50</sub> .....	91
5.1.1	Toxicidad del agente entrecruzante .....	91
5.1.2	Toxicidad de los anti-inflamatorios.....	92
5.2	Resultados de la citotoxicidad de los hidrogeles mediante ensayo indirecto .....	93
5.3	Resultados del estudio de proliferación celular mediante el ensayo de <i>Alamar Blue</i> .....	95
<b>6.</b>	<b>Comportamiento <i>in vivo</i> de los hidrogeles.....</b>	<b>96</b>
6.1	Estudio macroscópico .....	96
6.2	Estudio microscópico.....	101
	<b>Capítulo 6. Discusión.....</b>	<b>117</b>
<b>1.</b>	<b>Formación de los hidrogeles .....</b>	<b>120</b>

<b>2. Hinchamiento y degradación de los hidrogeles</b> .....	126
<b>3. Liberación <i>in vitro</i> de los anti-inflamatorios</b> .....	127
<b>4. Comportamiento celular <i>in vitro</i> de los hidrogeles</b> .....	129
<b>5. Respuesta <i>in vivo</i> de las formulaciones inyectables</b> .....	131
5.1 Modelo experimental .....	131
5.2 El animal de experimentación .....	131
5.3 Creación del modelo experimental de osteoartritis .....	132
5.4 Análisis macroscópico de las muestras.....	133
5.5 Análisis microscópico de las muestras.....	134
5.5.1 Patrón de osteoartritis.....	135
5.5.2 Tratamiento de osteoartritis con los hidrogeles de AH con estructura de red semi-IPN.....	137
<b>Capítulo 7. Conclusiones</b> .....	143
<b>Capítulo 8. Bibliografía</b> .....	149







The background of the slide features a microscopic view of plant tissue, likely a cross-section of a leaf, showing a network of cells with prominent cell walls. A semi-transparent purple hexagonal grid is overlaid on the image. A dark purple horizontal band is positioned at the bottom, containing the title text.

# Capítulo 1

## Resumen



La patología del cartílago articular, ya sea degenerativa o traumática, genera una importante afectación en la calidad de vida de nuestros pacientes, además de un impacto importante en la salud pública y en la economía mundial. El tratamiento de estas lesiones se ve dificultado por las características del cartílago articular de carecer de nervios, vasos sanguíneos y drenaje linfático lo que ocasiona una baja capacidad de auto-reparación. Con el objetivo de evitar la cirugía protésica de reemplazo articular en fases avanzadas de la osteoartritis, se han realizado múltiples avances en la Ingeniería Tisular que tienen como principal objetivo el de estimular la regeneración del cartílago articular, consiguiéndose en todas ellas un tejido fibrocartilaginoso que difiere de las propiedades biomecánicas y estructurales del cartílago articular nativo.

En la presente tesis se propone el desarrollo de hidrogeles inyectables portadores de ácido hialurónico y gelatina cargados con fármacos anti-inflamatorios (naproxeno o dexametasona) y con estructura de red semi-interpenetrada que permita a los hidrogeles mantenerse durante más tiempo en la articulación y así mejorar el efecto del ácido hialurónico y de los correspondientes fármacos en un modelo de osteoartritis inducido químicamente en la rodilla de un animal de experimentación. Además, la administración intraarticular de los fármacos anti-inflamatorios mediante un sistema de hidrogel permite una liberación controlada del medicamento disminuyendo sus efectos secundarios a nivel sistémico y aumentando la biodisponibilidad del mismo potenciando una disminución del proceso inflamatorio en la articulación y facilitando la reparación de las lesiones condrales.

En una primera fase del estudio, se prepararon y optimizaron las formulaciones inyectables formadas por dos componentes principales: el ácido hialurónico y la gelatina que una vez mezclados en el momento de su aplicación en el organismo, gelifican *in situ* (empleando como agente entrecruzante el dextrano oxidado) y dan lugar a la formación de un hidrogel con estructura de red semi-interpenetrada en un máximo de tiempo de 30 min tras el mezclado de los componentes. A continuación, se desarrollaron formulaciones con fármacos anti-inflamatorios: dexametasona o naproxeno.

Posteriormente, mediante estudios *in vitro* y simulando las condiciones fisiológicas, se evaluaron las propiedades de los hidrogeles en relación con el grado de hinchamiento y degradación, observándose una ganancia en peso del hidrogel debido a la absorción de agua del medio en las primeras 4 h. Tras este periodo de tiempo, se produce una pérdida de peso debido a la degradación del hidrogel y la liberación del fármaco, principalmente para el hidrogel sin cargar y para el hidrogel cargado con naproxeno (que se degradan a los 14 días del estudio) en comparación a los datos de degradación

obtenidos para el hidrogel con dexametasona, que se mantiene estable hasta prácticamente 30 días.

En relación al estudio *in vitro* de las cinéticas de liberación de los medicamentos, se observó que el naproxeno se libera de forma rápida alcanzando la liberación del 100 % del fármaco cargado en un periodo inferior a 24 h. Sin embargo, la liberación de la dexametasona se produce de forma más controlada, obteniéndose una liberación del 22 % del medicamento cargado en un periodo de 1 día, para después estabilizarse en el tiempo, por lo que se puede concluir que los hidrogeles con dexametasona son más estables.

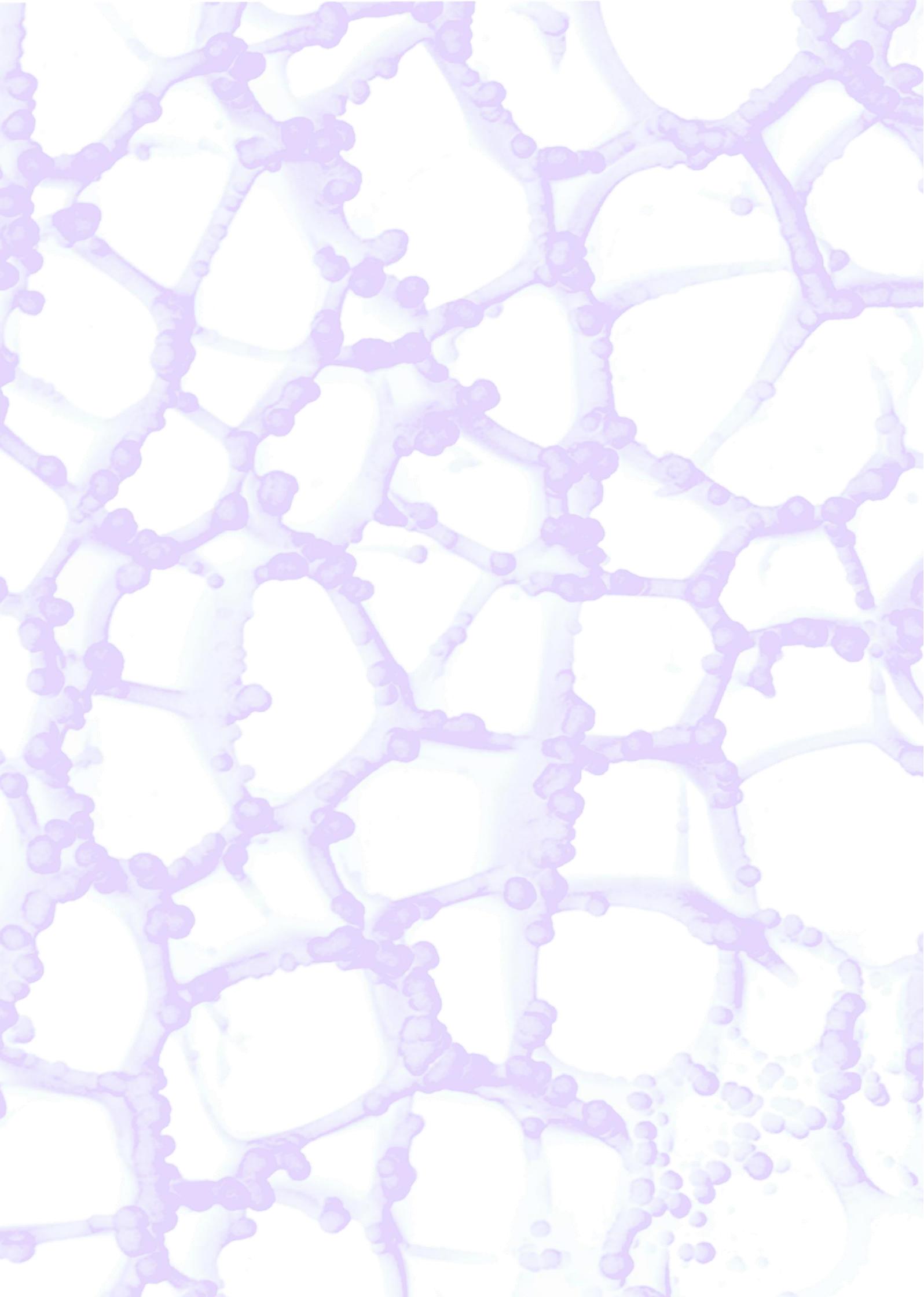
En un segundo momento, se valoró la citotoxicidad y proliferación celular en dichos hidrogeles, con y sin fármaco, mediante estudios *in vitro* de cultivos celulares utilizando condrocitos y osteoblastos, observándose que ninguno de los hidrogeles era tóxico para las células y además ambos estimulaban la adhesión celular al hidrogel y por tanto la proliferación celular.

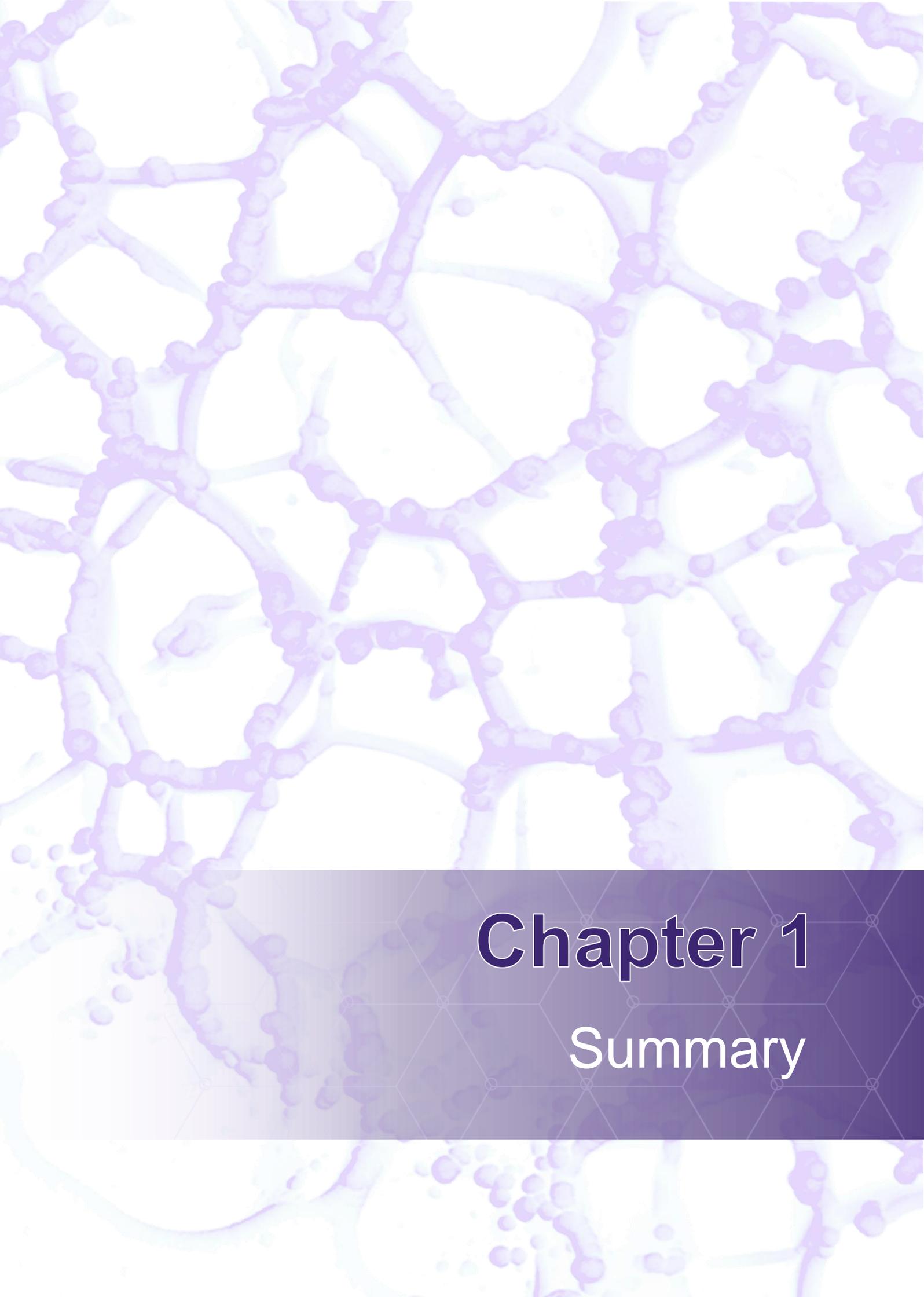
Por último, se estudió la biocompatibilidad y capacidad de reparación osteocondral de los hidrogeles en un modelo experimental de osteoartrosis inducida en rodilla de conejo de raza Nueva Zelanda. Para lo cual se empleó un total de 8 conejos (16 rodillas) y se crearon seis grupos de estudio comenzando por el grupo control (infiltración con suero salino), siguiendo por el grupo de inducción de osteoartrosis mediante la infiltración de colagenasa, y posteriormente en función del tratamiento recibido: hidrogeles con naproxeno, hidrogeles con dexametasona o exclusivamente suero salino.

Se observó que los hidrogeles inyectables con dexametasona evitan la progresión de osteoartrosis inducida por colagenasa, al igual que los portadores de naproxeno, aunque este último grupo, además de evitar la progresión induce una respuesta reparativa en el cartílago articular, si bien este fármaco no es capaz de producir una regeneración del cartílago articular dañado y formar cartílago articular nativo.

Por tanto, los hidrogeles inyectables portadores de ácido hialurónico con estructura de red semi-interpenetrada constituyen una herramienta útil en el tratamiento de la osteoartrosis, ya que se mantienen durante más tiempo en la cavidad articular y además son buenos vehículos de fármacos, células o factores de crecimiento que estimulen la regeneración osteocondral.







# Chapter 1

## Summary



The pathology of articular cartilage, whether degenerative or traumatic, has a significant impact on the quality of life of our patients, as well as on public health and the global economy. The treatment of these injuries is hampered by the characteristics of the articular cartilage, that lacks of nerves, blood vessels and lymphatic drainage, which produces a low self-repair capacity. In order to avoid prosthetic joint replacement surgery in advanced stages of osteoarthritis, many advances have been made in Tissue Engineering which main objective is to stimulate the regeneration of articular cartilage, achieving everytime a fibrocartilaginous tissue that differs from the biomechanical and structural properties of native articular cartilage.

The present thesis proposes the development of injectable hydrogels carrying hyaluronic acid and gelatin loaded with anti-inflammatory drugs (naproxen or dexamethasone) and with a semi-interpenetrated network structure that allows the hydrogels to stay longer in the joint and thus improve the effect of hyaluronic acid and the corresponding drugs in a model of osteoarthritis induced chemically in the knee of an experimental animal. In addition, the intra-articular administration of anti-inflammatory drugs through a hydrogel system allows a controlled release of the medication, decreasing its side effects at a systemic level and increasing its bioavailability, promoting a decrease in the inflammatory process in the joint and facilitating the repair of the chondral injuries.

In the first phase of the study, injectable formulations formed by two main components were prepared and optimized: hyaluronic acid and gelatin that, once mixed at the time of application in the body, gelatinize *in situ* (using oxidized dextran as a crosslinking agent) and form an hydrogel with a semi-interpenetrated network structure, within a maximum of 30 minutes after mixing the components. Afterwards, formulations were developed with anti-inflammatory drugs: dexamethasone and naproxen.

Subsequently, through *in vitro* studies and by simulating the physiological conditions, the properties of the hydrogels were evaluated in relation to the degree of swelling and degradation, observing an increase in weight of the hydrogel due to the absorption of water from the medium in the first 4 hours. After this period of time, a weight loss occurs due to the degradation of the hydrogel and the release of the drug, mainly for the unloaded hydrogel and for the hydrogel loaded with naproxen (which degrades after 14 days of the study) in comparison to the degradation data obtained for the hydrogel with dexamethasone, which remains stable up to practically 30 days.

In relation to the *in vitro* study of the kinetics of drug release, it was observed that naproxen is released quickly reaching the release of 100 % of the drug loaded in a period

less than 24 hours. However, the release of dexamethasone occurs in a more restrained way, obtaining a release of 22 % of the drug loaded in a period of 1 day, then stabilizing in time, so it can be concluded that hydrogels with dexamethasone are more stable.

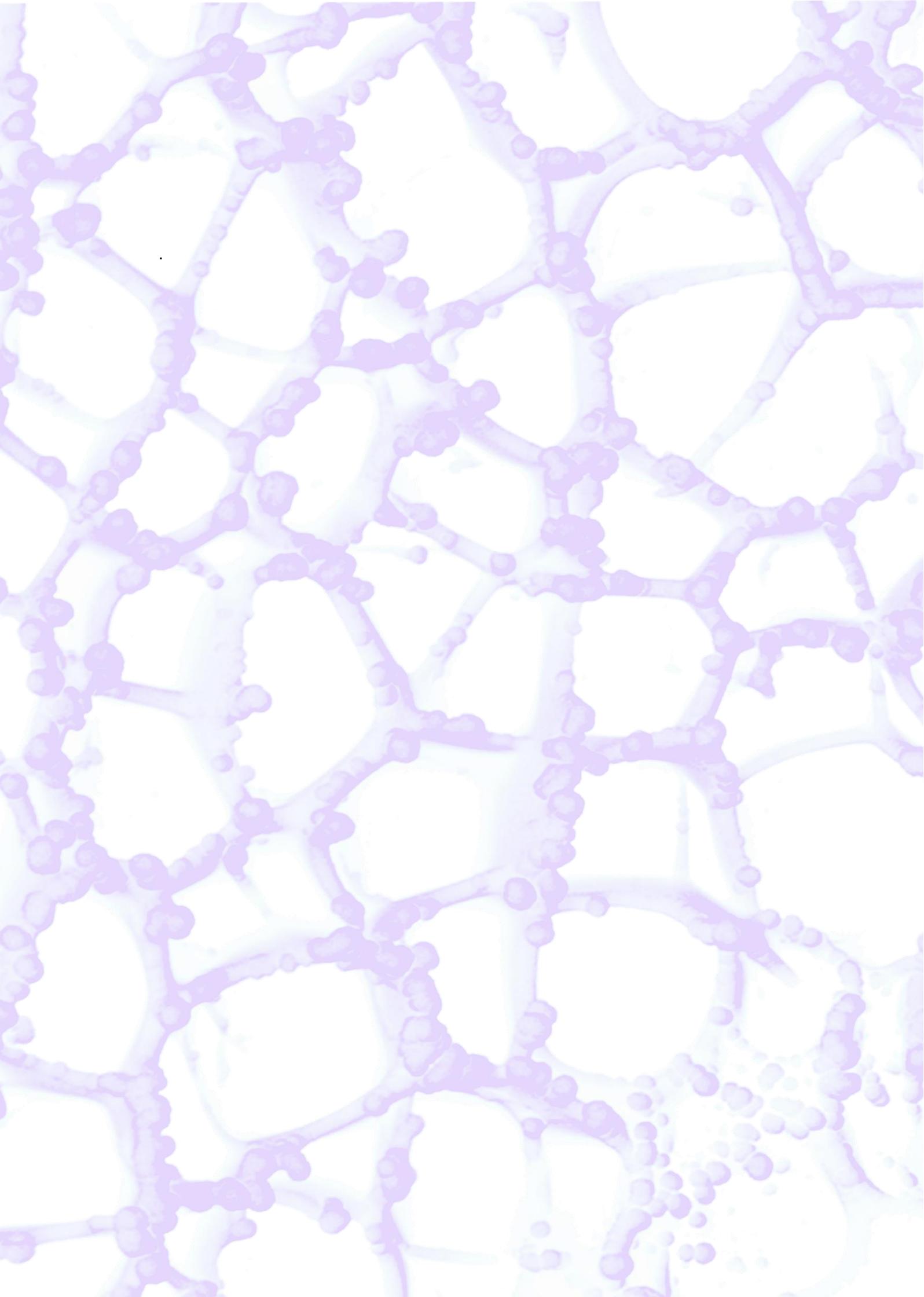
In a second moment, the cytotoxicity and cellular proliferation of these hydrogels, with and without drug, was evaluated through *in vitro* studies of cell cultures using chondrocytes and osteoblasts, observing that none of the hydrogels was toxic for the cells and that both stimulated cellular adhesion to hydrogel and therefore cellular proliferation.

Finally, biocompatibility and osteochondral repair capacity of hydrogels was studied in an experimental model of osteoarthritis induced in the knees of New Zealand rabbits. For this, a total of 8 rabbits (16 knees) were used and six study groups were created starting with the control group (infiltration only with saline buffer), followed by the osteoarthritis induction group through the collagenase infiltration, and subsequently depending on the treatment received: hydrogels with naproxen, hydrogels with dexamethasone or with saline buffer.

It was observed that injectable hydrogels with dexamethasone prevent the progression of osteoarthritis induced by collagenase, as well as naproxen carriers, although this last group, in addition to preventing progression, induces a reparative response in the articular cartilage, although this drug is not able to produce a regeneration of damaged articular cartilage and form native articular cartilage.

Therefore, injectable hydrogels carrying hyaluronic acid with semi-interpenetrated network structure are a useful tool in the treatment of osteoarthritis, since they remain for a longer time in the joint cavity and are also good vehicles for drugs, cells or factors of growth that stimulate osteochondral regeneration







# Capítulo 2

## Introducción



El cartílago articular es un tipo de tejido conectivo altamente especializado que se encuentra recubriendo las articulaciones móviles o diartrosis. Una de las características del cartílago articular es su naturaleza avascular. Esta ausencia de vasos sanguíneos ocasiona que la capacidad de autoregeneración del cartílago articular sea prácticamente nula (1). Debido a ello, se han descrito hasta el momento múltiples técnicas para el tratamiento de las lesiones condrales, sin obtener resultados plenamente satisfactorios (2, 3). En los últimos años, no obstante, el mayor conocimiento existente de la estructura y funcionamiento del tejido y el avance en las técnicas de ingeniería tisular (IT) ha permitido promover la búsqueda de tratamientos alternativos que reproduzcan las características primarias del cartílago.

A continuación, se describen las principales características de los tejidos que forman la articulación, así como la patología que pueden sufrir y las posibilidades terapéuticas hasta la fecha.

## 1. La articulación

Las articulaciones móviles o diartrosis (como es la articulación de la rodilla) son estructuras complejas que permiten la unión entre los huesos del esqueleto para permitir el movimiento, proporcionando además soporte mecánico a la estructura ósea. La integridad articular depende del estado de sus componentes, principalmente el cartílago articular y el hueso (que actúan como una unidad mecánica), pero también del líquido articular y los tejidos blandos peri-articulares (4).

### 1.1 El cartílago articular

El cartílago es, junto con el hueso, uno de los principales tejidos de soporte de los animales. Se trata de un tejido conectivo pudiéndose distinguir tres tipos de cartílago en el organismo (5):

- El **cartílago hialino**: es el más abundante del cuerpo. El **cartílago articular** de las articulaciones diartrodiales se encuentra dentro de este tipo. El cartílago hialino brinda soporte y flexibilidad al tejido, actuando también como amortiguador y disminuyendo la fricción en el caso del cartílago articular (6).
- El **cartílago elástico**: se forma a partir de tejido mesenquimal y contiene una gran cantidad de fibras elásticas, lo que le confiere la capacidad para estirarse sin romper su estructura. Posee poca matriz extracelular (MEC), la cual está formada principalmente por fibras elásticas muy ramificadas y colágeno tipo II.

- El **fibrocartílago**: es un tejido con propiedades mecánicas intermedias entre el tejido conectivo denso y el cartílago hialino, siendo el más resistente de los cartílagos. Su MEC contiene sobre todo colágeno tipo I.

El **cartílago articular** tiene entre 2 y 4 mm de espesor siendo su función principal proporcionar una superficie lisa y lubricada para la articulación y facilitar la transmisión de cargas con un coeficiente de fricción bajo. De esta forma proporciona resistencia a la compresión, actuando además como amortiguador (7, 8). El hueso subcondral, en el que se apoya, desempeña también un papel importante en las funciones de resistencia y deformabilidad (9). Además se trata de un tejido aneural, avascular y alinfático (10) lo que dificulta la regeneración y reparación de las lesiones del mismo y lo que ocasiona que su nutrición se realice por imbibición a partir del líquido articular.

### 1.1.1 Componente celular del cartílago articular

A pesar de tratarse de un tejido super-especializado su composición es relativamente sencilla ya que está formado por un solo tipo celular, el condrocito que se encuentra embebido en la MEC.

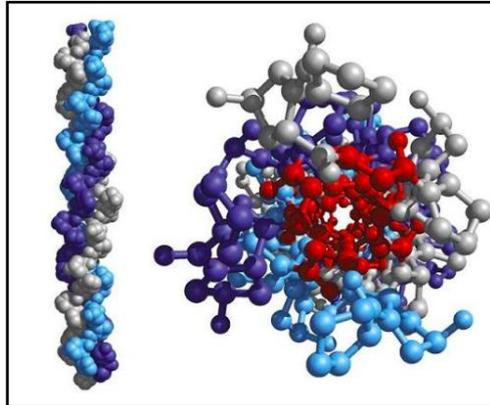
El condrocito es una célula esférica altamente diferenciada y especializada, metabólicamente activa, cuyo papel principal es actuar en el desarrollo, mantenimiento y reparación de la MEC (7, 11). Derivan de células madre mesenquimales (MSC, del inglés *mesenchymal stem cells*) (5) y poseen una capacidad limitada de proliferación con una vida media muy larga (12), dependiendo su supervivencia de un ambiente químico y mecánico óptimo. Representan del 2 al 10 % del volumen total del cartílago, variando la densidad celular según la zona en la que se encuentran y según la edad (13). En estudios recientes se ha observado que los condrocitos presentan largas extensiones de citoplasma que cruzan la MEC y conectan físicamente con los condrocitos vecinos, formando así una red celular tridimensional (14).

### 1.1.2 La matriz extracelular

Es una estructura altamente hidratada ya que el agua representa el 60 – 80 % de su peso, siendo sus otros dos componentes principales los glicosaminoglicanos (GAG), que constituyen el 3 – 10 % del peso, y el colágeno que representa el 10 – 30 % restante (7), que proporcionan las principales características mecánicas del cartílago articular.

**El colágeno** es la proteína mayoritaria en el cartílago articular, presentando una estructura secundaria tridimensional consistente en una "cadena  $\alpha$ " que es una hélice

levógira con alrededor de 3 residuos por vuelta. En cuanto a la estructura terciaria, tres cadenas  $\alpha$  super-enrolladas y conectadas por enlaces intermoleculares forman una triple hélice dextrógira (**Figura 1**).



**Figura 1.** Estructura tridimensional del colágeno. Tomada de *Biochemistry-Ch4 protein structure and function*. W.H. Freeman and Company 2003).

Existen, en pequeñas cantidades, varios tipos de colágeno en el cartílago articular (VI, IX, X y XI y X) cuya principal función es proporcionar al tejido propiedades de tensión e inmovilizar los proteoglicanos de la MEC (7, 15). Sin embargo, el colágeno mayoritario es el colágeno tipo II, que, sin ser totalmente específico, es un marcador del condrocito normal e indica, en cultivo, la diferenciación del mismo. Representa el 95 % de los distintos tipos de colágenos del cartílago y aporta las propiedades de resistencia a la compresión, siendo fundamental para la conservación de su forma y volumen. Existen dos formas colágeno tipo II:

- **Forma IIA:** la más larga y expresada por los condrocitos en el curso del desarrollo (16).
- **Forma IIB:** se expresa en el cartílago adulto (12).

El colágeno tipo X se encuentra alrededor de la zona mineralizada del cartílago articular y participa en el proceso de mineralización de la MEC interviniendo por tanto en el soporte estructural del cartílago (16).

El colágeno tipo IX se une al colágeno tipo II actuando como conector entre las diferentes fibrillas, estabilizando así la red de colágeno tridimensional, al igual que el colágeno tipo XI (10).

El cartílago articular sano tiene la capacidad de deformar y ampliar su área de contacto superficial para disminuir los efectos de las cargas directas disminuyendo el

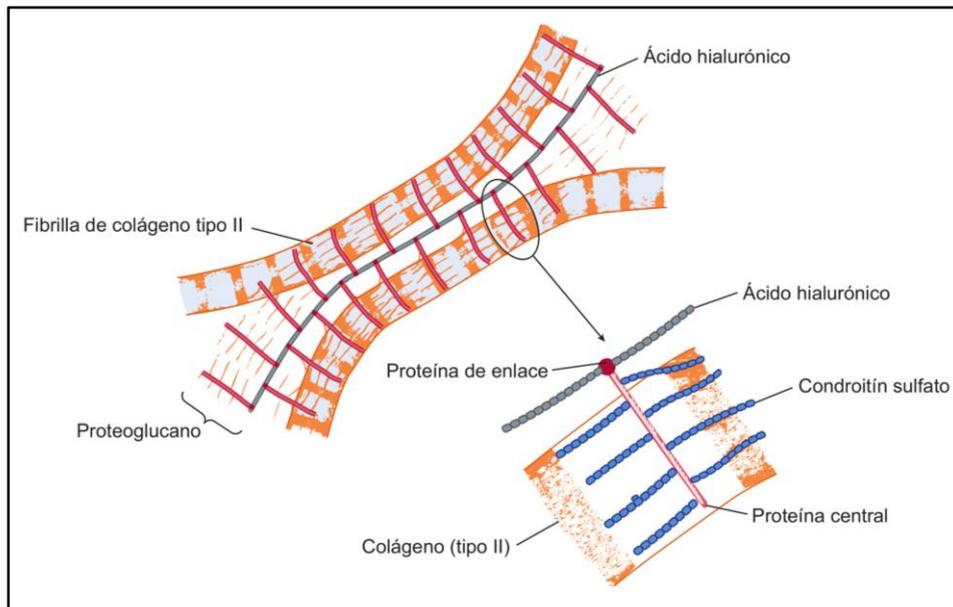
estrés aplicado. Esta propiedad biomecánica es llevada a cabo principalmente por la presencia de GAG atrapados dentro de la complicada red de colágeno insoluble (11).

**Los glicosaminoglicanos y proteoglicanos** son polisacáridos largos sin ramificaciones constituidos por repeticiones de una unidad de disacáridos. Los GAG presentes en el cartílago articular son el condroitín sulfato, el queratán sulfato y el ácido hialurónico (AH) (7). El condroitín sulfato se encuentra principalmente en la MEC, mientras que el resto se encuentran en el condrocito (11). La mayoría de los GAG (excepto el AH) están unidos covalentemente, y de manera perpendicular, a proteínas centrales (*core protein*) formando así proteoglicanos (**Figura 2**).

Existen dos tipos de proteoglicanos:

- **Macroteoglicanos:** entre los que se incluye el agregano. Se encuentran en las mallas formadas por la red de colágeno, y dado su elevado tamaño, se garantiza su permanencia dentro de las fibras de colágeno II.
- **Proteoglicanos de masa reducida:** decorina, biglucano y fibromodulina. Estos proteoglicanos no agregan con el AH pero sí interactúan con el colágeno para mantener la integridad del tejido del cartílago articular, contribuyendo a las propiedades viscoelásticas y osmóticas, y siendo muy importantes en la absorción de las fuerzas continuas que se producen durante actividades en carga, como caminar y correr (17, 18).

Aunque el AH no se une covalentemente a proteínas centrales, sí participa en la formación de superagregados de peso molecular (PM) muy elevado ( $10^5$  y  $10^7$  Daltons) ya que mediante proteínas de enlace, la larga molécula de AH une proteoglicanos de forma no covalente (15, 19, 20). A su vez, estos agregados se entrelazan con las fibras de colágeno dando lugar a una red que proporciona al cartílago una naturaleza bifásica, como se esquematiza en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Representación esquemática de la matriz extracelular y sus principales componentes. Tomada de Murray R, Bender D, Botham K, Kennelly P, Rodweil V, Weil A. Bioquímica ilustrada, 29ª edición: [www. accessmedicina.com](http://www.accessmedicina.com).

El AH es un elemento crucial en la cicatrización de heridas, angiogénesis y organización estructural y propiedades mecánicas de los tejidos (21, 22). Es un componente importante del microambiente celular ya que influye en la organización tisular debido a que interacciona con los receptores de la superficie celular como el CD44 y el receptor de la motilidad mediada por AH (RHAMM), promoviendo la migración celular y la respuesta inflamatoria, y facilitando la remodelación de la matriz extracelular (23). Además, es neutral desde el punto de vista inmunitario, y se ha observado que impide la degeneración articular al inhibir la producción de metaloproteinasas (MMP) de la matriz extracelular y prevenir la apoptosis de los condrocitos (24-26).

Las características elásticas del cartílago articular, posibles gracias a la hidrofilia de los proteoglicanos, permite el movimiento de vaivén de las moléculas de agua mientras que la rigidez se mantiene por el efecto de la red de fibras de colágeno tipo II (9).

Además del colágeno y los proteoglicanos, la MEC incluye enzimas (como las proteasas responsables de la degradación y renovación de los componentes de la MEC, tanto en condiciones normales como patológicas) y glucoproteínas como son la ancorina, fibronectina, laminina y las integrinas (15), cuya función no está bien conocida, aunque es probable que intervengan en la estructura y conservación de la matriz extracelular.

La integridad y correcto funcionamiento del cartílago articular, son consecuencia de

la acción recíproca de sus dos componentes principales. Los condrocitos son responsables del desarrollo, mantenimiento y reparación de la MEC. La actividad metabólica de los condrocitos puede verse alterada por una gran variedad de factores, como las citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral-*alpha*), así como factores de crecimiento que juegan un papel importante en la degradación y síntesis de las macromoléculas de la MEC (7).

Dependiendo de la concentración de los distintos componentes dentro de la MEC se distinguen tres zonas:

- **Zona interterritorial:** es la parte de la MEC más alejada de la célula y proporciona las principales propiedades biomecánicas al cartílago. En esta zona abundan los agregados de proteoglicanos y fibras de colágeno tipo II (7, 9).
- **Zona territorial:** se encarga de satisfacer las necesidades metabólicas, unir las membranas celulares a la matriz que la rodea y proteger las células del daño originado por las deformaciones (12). Está compuesta principalmente de finas fibrillas de colágeno que se disponen formando una red alrededor de las células (27).
- **Zona pericelular:** es rica en proteoglicanos sulfatados y proteínas no colágenas, ácido hialurónico y colágeno tipo VI. A la unidad formada por el condrocito y la matriz que lo rodea se le denomina condrona y constituye la unidad anatómica y mecánica del cartílago (12).

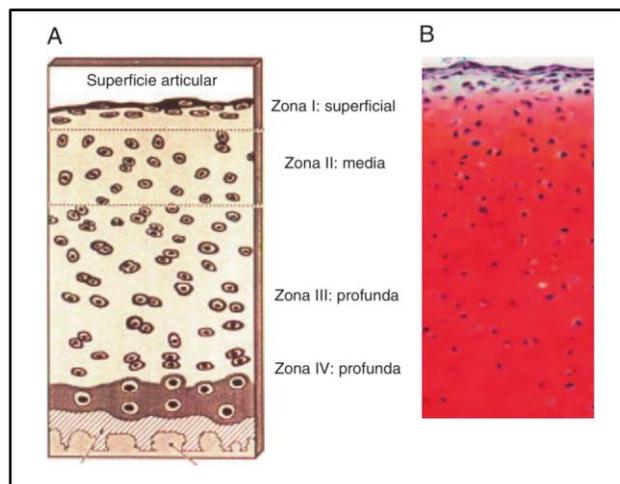
### 1.1.3 Organización del cartílago articular

La estructura del cartílago articular no es en capas superpuestas, sino que presenta cuatro capas que difieren entre sí, como se puede observar en la **Figura 3**:

- **Capa superficial:** representa el 10 – 20 % del grosor del cartílago articular (7) y está formada principalmente por condrocitos pequeños y planos y fibronectina en abundancia. Es un área resistente a las fuerzas de tensión (28). Revistiendo esta capa superficial se encuentra una zona acelular denominada lámina *splenda* que actúa como una capa protectora del cartílago. Algunos de los componentes de la lámina *splenda* son el AH, fosfolípidos y la lubricina (29).
- **Capa intermedia o de transición:** representa el 40 – 60 % del volumen del

cartílago (7) y está formada por condrocitos gruesos y esféricos, con una distribución oblicua de las fibras de colágeno. Contiene gran cantidad de proteoglicanos, y poca cantidad de agua (15).

- **Capa profunda o radial:** representa aproximadamente el 30 % del volumen del cartílago y es la responsable de proporcionar la mayor resistencia a las fuerzas de compresión debido a que los haces de colágeno tienen una distribución perpendicular a la superficie articular y los condrocitos están ordenados en columnas (7).
- **Capa calcificada** que se adhiere a la lámina ósea subcondral. Se trata de una capa rica en calcio y con las fibras de colágeno dispuestas en forma radiada y sin continuidad con las fibras del hueso subcondral. Esta capa se encuentra separada de la zona profunda por una línea de demarcación basófila y ondulada (*tidemark* o línea de calcificación), cuya función es hacer de barrera e impedir el ingreso de los vasos del hueso subcondral.



**Figura 3.** Histología del cartílago articular normal. Imágenes **A** y **B**: en la capa superficial o zona I, los condrocitos son algo más pequeños y aplanados y están situados de forma paralela a la superficie articular. En la zona media o zona II, los condrocitos son algo más grandes, esféricos y se encuentran solos o en grupos. En la zona III o profunda, los condrocitos son más elípticos, forman columnas y se orientan perpendicularmente a la superficie. En la zona IV o calcificada, los condrocitos están más esparcidos. Tomada de López-Armada B, Cillero-Pastor B, Blanco García F. Fisiopatología de la artrosis ¿cuál es la actualidad? Rev. Esp. Reumatol. 2004; 31(6):379-9.

#### 1.1.4 Nutrición del cartílago articular

Dada la naturaleza avascular del cartílago, los nutrientes básicos provienen por

difusión casi exclusivamente del líquido sinovial y en menor medida del hueso subcondral (11, 15, 30, 31).

El líquido sinovial se caracteriza por ser un líquido claro o ligeramente amarillento, de alta viscosidad que es secretado en la cavidad articular a través de la membrana sinovial. Presenta AH de alto peso molecular y una glicoproteína lubricante (GLP) que reduce la fricción (12). De esta forma, el líquido articular actúa como lubricante articular, amortiguando los impactos y evitando el contacto de las superficies articulares entre sí.

### 1.1.5 Propiedades biomecánicas del cartílago articular

El cartílago articular funciona como una superficie lisa resistente a la abrasión y casi sin fricción. Cuando el cartílago articular se somete a una carga presenta un comportamiento viscoelástico, propiedad que se ve influida por la velocidad y el tiempo de dicha carga (32).

## 1.2 El hueso

El hueso es uno de los principales componentes de la articulación. Desde un punto de vista histológico, el hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. Contiene células especializadas, matriz orgánica y una fase mineral (33, 34).

### 1.2.1 Las células óseas

Las células óseas se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea que es rico en MSC pluripotenciales indiferenciadas (35). Se distinguen tres tipos de células:

Los **osteoblastos** son las células formadoras de hueso ya que sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina, que permite la mineralización de dicha matriz (35). Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en **osteocitos**. Los osteocitos presentan una forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas. Participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas (35).

Los **osteoclastos** son células grandes, multinucleadas, procedentes de células madre hematopoyéticas medulares, encargadas de la reabsorción ósea. Se adhieren al

hueso mediante una zona de ribete en cepillo y secretan ácido y enzimas proteolíticas que solubilizan la matriz ósea para reabsorber el hueso por endocitosis.

En el tejido óseo existe una gran actividad celular, por lo que a diferencia del cartílago articular, se renueva continuamente gracias a la actividad coordinada de sus células.

### 1.2.2 La matriz extracelular ósea

Está formada por un componente orgánico y uno mineral.

La **matriz orgánica o sustancia osteoide** representa un tercio del peso óseo y está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca el colágeno (principalmente tipo I), además de proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina, albúmina y factores de crecimiento, y es, además, un reservorio de calcio y fósforo.

La **fracción mineral** de la matriz representa el 65 % del peso óseo, y está formada principalmente por fosfato cálcico en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita (35).

La MEC ósea es la responsable de las extraordinarias propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión (19).

### 1.2.3 El hueso subcondral

El cartílago articular y el hueso subcondral actúan como una unidad de manera que la condición del cartílago articular depende de las propiedades mecánicas del hueso subcondral adyacente. Los cambios en la densidad y la arquitectura del hueso subcondral influyen en la iniciación y progresión de la degeneración del cartílago (4).

## 2. Renovación tisular normal, capacidad de cicatrización y regeneración del cartílago

Dada la naturaleza avascular del cartílago este presenta una capacidad de regeneración y reparación muy limitada. La reparación espontánea sólo se puede producir cuando la lesión afecta al hueso subcondral originando un sangrado y una respuesta inflamatoria, eliminándose así los tejidos necróticos y liberándose mediadores que estimulan la migración y proliferación de MSC condrogénicas desde la médula subcondral (11, 32).

El condrocito tiene una capacidad muy limitada de proliferación y de migración (36), pero ante una lesión condral de pequeño diámetro son capaces de aumentar la tasa de síntesis de la matriz, capacidad que se ve disminuida con la edad (11). Debido a que los condrocitos regulan la composición y estructura de la MEC, si se produce una alteración en su actividad catabólica y anabólica se puede producir una MEC débil y estructuralmente anormal, originando cambios en la respuesta a la carga (12).

Ante una agresión condral, se produce una pérdida de proteoglicanos, un aumento en el contenido de agua y una disminución del espesor del cartílago, que ocasiona una rigidez del hueso subcondral que tiene que soportar mayor cantidad de cargas (36). La respuesta de regeneración hacia esta agresión va a depender de varios factores: tipo de lesión (extensión y severidad), estado previo del cartílago, articulación afecta, edad del paciente y principalmente el tamaño de la lesión inicial (12, 32).

El proceso reparativo del cartílago articular consiste en el reemplazo de la MEC y las células, dañadas o perdidas, por nuevo tejido. Los cambios histopatológicos del cartílago varían según el tipo de lesión. Si la lesión se produce por un mecanismo de contacto persistente en una zona de la articulación, algunas lesiones se pueden reparar, aunque el resultado no sea un cartílago articular normal, sino que se forma un tejido cicatricial con predominio de colágeno tipo I (el fibrocartílago) que es mecánicamente subóptimo. Además, no se produce una MEC fuerte y cohesionada (36-38).

### 3. Patología de la articulación

Las lesiones superficiales, aparentemente triviales de baja energía, pueden interrumpir o dañar las células y la MEC e iniciar una cascada que lleve hacia la degeneración articular en ausencia de cambios visibles en la superficie. Las lesiones de mayor energía pueden dar lugar a fisuras condrales visibles o pérdida parcial del espesor del cartílago, mientras que las lesiones de espesor total se producen cuando el hueso subcondral está afectado, resultando frecuentemente en una fractura osteocondral (36).

La patología del cartílago articular se puede dividir en varios tipos (39):

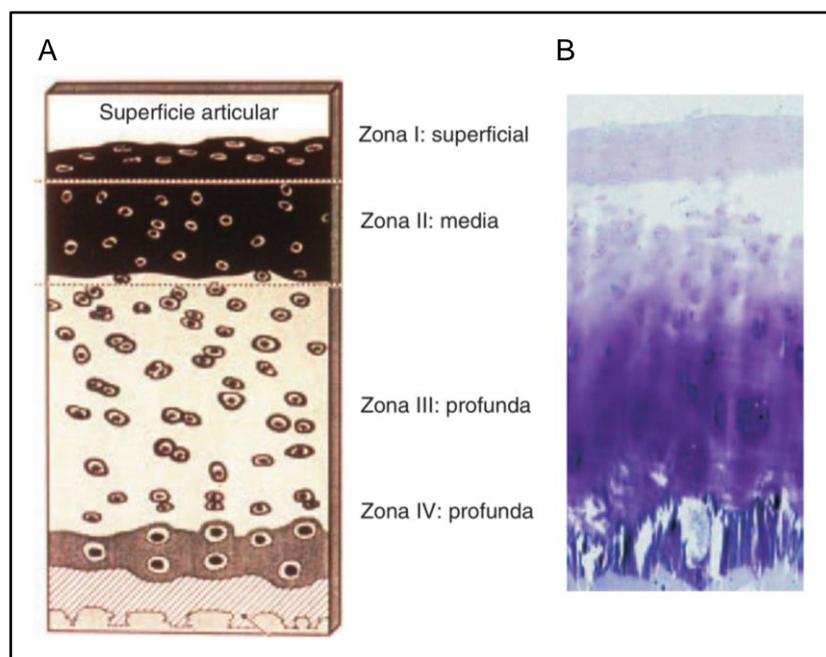
- Patología degenerativa: osteoartrosis (OA).
- Patología traumática.
- Alteraciones metabólicas: osteonecrosis, osteocondritis disecante.

### 3.1 Patología degenerativa: osteoartrosis

La OA es una enfermedad articular degenerativa en la que los factores mecánicos y biológicos juegan un papel importante. Esta enfermedad se caracteriza por un daño progresivo del cartílago y esclerosis del hueso subcondral subyacente (4), afectándose también el tejido sinovial, la cápsula articular y los tejidos blandos periarticulares (40)

Estudios epidemiológicos señalan que aproximadamente el 6 % de los adultos tienen una afección degenerativa de la rodilla, porcentaje que aumenta al 10 % en personas mayores de 65 años. Se ha observado un aumento de la incidencia de OA en aquellos pacientes con lesiones asociadas que producen una alteración en la transmisión de cargas, como pueden ser lesiones meniscales o ligamentosas (principalmente del ligamento cruzado anterior (LCA)) (41). Además, la OA es una de las principales causas de bajas laborales, además de producir un deterioro progresivo que dificulta la realización de las actividades de la vida diaria, ocasionando un importante impacto socio-económico (42).

En los estadios artrósicos iniciales se observa un cartílago más adelgazado y con fisuras en su capa más superficial producidas por el daño ocasionado en la red de colágeno (principalmente del colágeno tipo II), y por la reducción en la rigidez del tejido, afectándose así la unidad funcional del cartílago y el hueso subcondral y presentando una respuesta inferior a las cargas mecánicas (**Figura 4**). El cartílago artrósico sintetiza colágeno tipo I (al igual que los tipos VI y XI) en las fases finales de la degeneración, lo que se identifica con una transformación del cartílago en fibrocartílago (43).



**Figura 4.** Histología del cartílago articular artrósico. Las imágenes **A** y **B** muestran los cambios típicos del cartílago artrósico: se produce un descenso en el contenido de la matriz extracelular y del número de condrocitos, principalmente en las capas I y II. Esta hipocelularidad se ocasiona por un incremento en la apoptosis de los condrocitos artrósicos. Tomada de López-Armada B, Cillero-Pastor B, Blanco García F. Fisiopatología de la artrosis ¿cuál es la actualidad? Rev. Esp. Reumatol. 2004; 31(6):379-93.

### 3.2 Lesiones traumáticas

Las lesiones traumáticas del cartílago se dividen en tres categorías: microtraumatismos, lesiones condrales y lesiones osteocondrales (38). La incidencia de las lesiones condrales sintomáticas no está bien definida. Se estima que del 5 al 10 % de los pacientes jóvenes y activos que presentan un traumatismo en la rodilla con hemartros (derrame hemático intraarticular) presentarán una lesión focal condral (36).

- **Microtraumatismos:** la carga repetitiva en el cartílago ocasiona una pérdida de proteoglicanos superficiales, lo que origina un aumento de la actividad metabólica de los condrocitos, que puede resultar en degeneración o muerte celular, alteración en la estructura del colágeno, fisuración de la superficie articular y un engrosamiento del hueso subcondral, similar a lo que ocurre en etapas incipientes de artrosis (38).
- **Lesiones condrales:** en estos casos se produce una lesión de la superficie articular sin afectar la placa subcondral. En un primer lugar se produce una necrosis de condrocitos, seguida de un aumento en la actividad mitótica y

metabólica de los condrocitos supervivientes que bordean el defecto. Además, aumenta la síntesis de colágeno tipo II y de los componentes de la MEC (38). Sin embargo, la respuesta de reparación después de la lesión superficial es subóptima. El tamaño de la lesión condral influye directamente en la reparación de forma que en lesiones mayores de 3 mm de diámetro la reparación es más compleja.

- **Lesiones osteocondrales:** son aquellas lesiones que cruzan el *tidemark* y afectan la región subcondral (44). En este caso se produce un proceso regenerativo a partir de la vascularización subcondral, formándose un tejido fibrocartilaginoso de reparación que puede funcionar durante un cierto período de tiempo, sin embargo no se aproxima a las propiedades del cartílago articular normal, ya que presenta menos elasticidad y menor capacidad de soportar las cargas (38).

### 3.3 Alteraciones metabólicas del hueso subcondral

Este grupo alberga un conjunto de patologías de origen incierto, como son la osteocondritis disecante y la osteonecrosis.

- **Osteocondritis disecante:** es una lesión osteocondral idiopática de la rodilla que afecta principalmente a pacientes jóvenes y localizada típicamente en el cóndilo femoral interno (45, 46). La evolución de este trastorno depende de la edad del paciente en el momento de la aparición ya que en pacientes con fisas abiertas generalmente se reparan bien en comparación con la que se producen en adultos que suelen precisar tratamiento quirúrgico.
- **Osteonecrosis:** consiste en la muerte de un segmento óseo asociado a colapso y fractura subcondral. Su etiología puede ser por traumatismos, idiopática o por tratamiento crónico con corticoides (46).

## 4. Opciones terapéuticas

Actualmente nos enfrentamos a uno de los grandes retos de la cirugía ortopédica: prevenir las alteraciones mecánicas del cartílago propias de la edad y de las lesiones traumáticas, y repararlo devolviéndole sus propiedades sin tener que recurrir a soluciones drásticas como es el recambio del tejido óseo y cartilaginoso por un sustituto metálico. El tratamiento en el pasado fue limitado, pero actualmente las opciones de tratamiento quirúrgico continúan evolucionando en busca de restaurar la biología natural

del cartílago articular, aunque todavía no existe un consenso en relación a la mejor opción de tratamiento.

Debemos tener en cuenta que el término regeneración implica obtener un tejido idéntico al cartílago articular original, mientras que el término reparación se refiere a un tejido distinto y con calidad potencialmente inferior (39). Actualmente ningún tratamiento da lugar al cartílago hialino nativo, que se considera la reparación más ideal.

### 4.1 Tratamiento conservador

El tratamiento conservador constituye la primera línea de tratamiento de la osteoartrosis, presentando como principal objetivo disminuir la inflamación y por tanto la sintomatología de dolor y así mejorar la capacidad funcional del paciente (47, 48). Se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas:

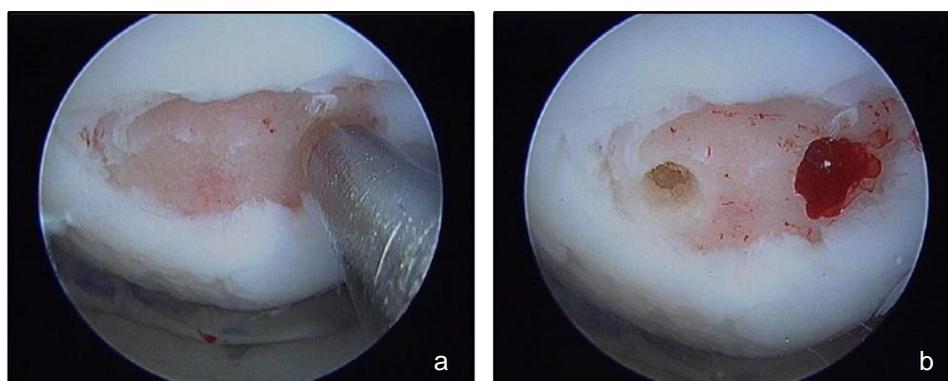
- **Movimiento pasivo continuo:** se ha observado que la inmovilización de las articulaciones presenta un efecto negativo en la cicatrización de lesiones cartilaginosas, mientras que la realización de una movilidad continua pasiva (para evitar la fatiga del músculo) podría mejorar la regeneración de lesiones condrales, aunque todavía el mecanismo biológico por el que se produciría no está bien definido (38).
- **Medicamentos indicados para el alivio sintomático:** incluyen los fármacos de acción lenta para el tratamiento sintomático de la osteoartrosis (SYSADOA, del inglés *symptomatic slow action drugs for osteoarthritis*) y los modificadores de la enfermedad (DMOAD, del inglés *disease-modifying osteoarthritis drugs*). En este grupo se incluyen tratamientos de suplementación dietética como sulfato de condroitina y la glucosamina que están disponibles en el mercado para el tratamiento de la osteoartrosis, pero no están respaldados por estudios acerca del alivio del dolor y la eficacia de los mismos a largo plazo (11, 39).
- **Infiltraciones intraarticulares:** las infiltraciones de corticoide producen un alivio sintomático del dolor en fases iniciales donde se observa una mayor inflamación y sinovitis, pudiendo encontrar mejoría de la sintomatología durante 4 – 6 semanas (11, 39). La inyección intraarticular de AH mejora la función articular y reduce el dolor en comparación con el placebo. Clínicamente, su efecto se establece más tarde que el de los corticoesteroides intraarticulares pero el efecto es más duradero. Faltan datos que confirmen su acción en la progresión de la artrosis (11, 39).

## 4.2 Tratamiento quirúrgico

Como su nombre indica, consiste en el tratamiento de la artrosis mediante procedimientos quirúrgicos, ya sean abiertos o artroscópicos. Se consideran principalmente tres métodos en función del resultado final obtenido:

### 4.2.1 Métodos reparativos

Implican predominantemente técnicas de estimulación de la médula ósea. El hueso subcondral es penetrado para estimular la liberación en el defecto condral de factores de crecimiento, sangre, células madre de médula ósea y células mesenquimales (44). Así se estimula el crecimiento de un nuevo tejido de fibrocartílago, siendo éste estructural y biomecánicamente inferior al cartílago hialino (49). Incluyen las perforaciones con aguja de *Kirschner* o brocas pequeñas (tipo *Pridie*), la artroplastia de abrasión y las microfracturas (38, 50). La **microfractura** es la técnica por excelencia para el tratamiento de las lesiones condrales de menos de 2 – 3 cm<sup>2</sup>. Se deben realizar orificios de 2 a 4 mm de profundidad y con una separación de 3 a 4 mm (51) como se muestra en la **Figura 5**, observándose mejores resultados en pacientes activos menores de 30 – 40 años y en lesiones del cóndilo femoral (44).



**Figura 5.** (a) Lesión osteocondral en fémur distal tras desbridamiento y previa punción. (b) Postmicrofractura de la lesión con sangrado del hueso subcondral. Tomada de York PJ, Wydra FB, Belton ME, Vidal AF. Joint Preservation Techniques in Orthopaedic Surgery. Sports Health. 2017;9(6):545-54.

Para evitar que el sangrado desaparezca de la lesión se ha propuesto el uso de SGRM (del inglés, *scaffold guided regenerative medicine*) que aplica una matriz formada por un polímero natural, como el quitosano, sobre la lesión reabsorbiéndose progresivamente pero manteniendo los productos sanguíneos y las células en la zona de la lesión (50). Además, se puede asociar a la técnica de microfracturas aspirado de médula ósea que estimule la regeneración de la lesión, observándose tasas variables

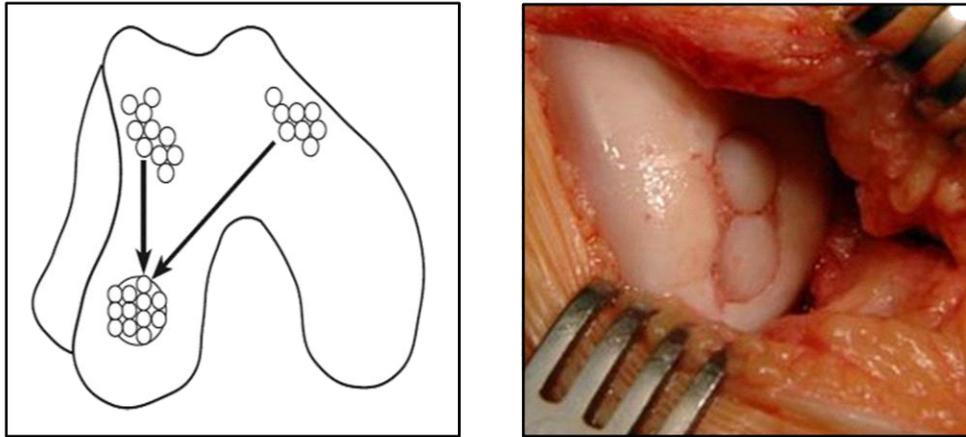
de fracaso y cirugía de revisión entre el 2 y el 31 % (51, 52).

Sin embargo, las microfracturas pueden presentar complicaciones como el sobrecrecimiento óseo y el llenado incompleto de las lesiones, aunque el principal inconveniente es que el estímulo del hueso subcondral genera un tejido cartilaginoso que se degenera rápidamente y evoluciona a fibrocartilago, que es mecánicamente inferior al cartilago hialino (51, 53).

### 4.2.2 Métodos reconstructivos

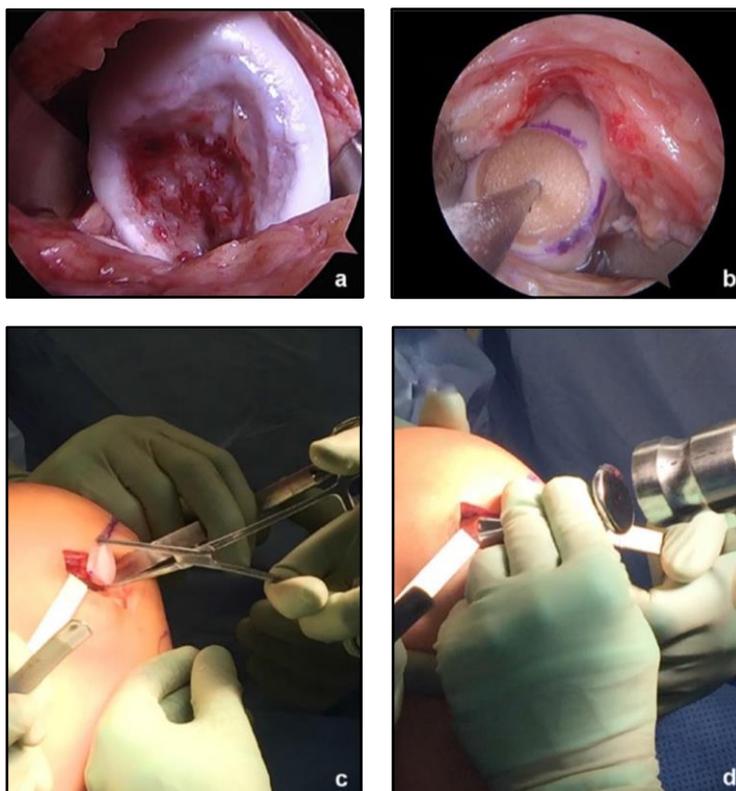
En aquellas lesiones que afecten al hueso y al cartilago se deben plantear estrategias terapéuticas que traten de reparar ambas estructuras para restablecer la unidad funcional de cartilago hialino–hueso subcondral. Se pueden emplear tejidos autólogos (OATS, del inglés *osteochondral autograft transfer*), aloinjertos o tejidos sintéticos.

- **Injertos osteocondrales autólogos:** es un método eficaz para el tratamiento de lesiones de espesor completo. Consiste en el uso de uno o varios cilindros osteocondrales (con cartilago y hueso subcondral sano) que se transfieren a la zona enferma, pudiéndose realizar de manera artroscópica o mediante una pequeña artrotomía, en función del tamaño del defecto. La mosaicoplastia utiliza múltiples cilindros de autoinjerto osteocondral de pequeño tamaño (de 2,7 a 8,5 mm de diámetro) de la zona periférica de los cóndilos femorales que soportan menos carga trasplantándose a la zona defectuosa, como se muestra en la **Figura 6**. De esta manera, los defectos se rellenan con hueso esponjoso y fibrocartilago (38). El autoinjerto osteocondral aporta una estructura de fácil integración y se debe incorporar a presión para que haya un buen contacto con el tejido sano (50, 54). La principal indicación son pequeños defectos focales (menores de 1,5 cm de diámetro) en menores de 50 años (44). Las principales ventajas de esta técnica son el bajo coste y que se puede realizar en un solo acto quirúrgico. Sin embargo, la mosaicoplastia está asociada con dificultades técnicas como la pobre integración tisular, la muerte celular por impacto y la pérdida de la topografía articular (50), además de la morbilidad asociada de la zona dadora del cilindro osteocondral.



**Figura 6.** Técnica de mosaicoplastia. Los cilindros osteocondrales se obtienen de zonas que no soportan carga en la articulación afectada y se introducen a presión en el defecto osteocondral, creando un “mosaico” de autoinjerto para rellenar la lesión. Tomada de López-Puerta J, Zamora-Navas P, Claros S, Rico-Llanos G, Avedillo I, Andrades J, Becerna J. *Is the articular cartilage regeneration approachable through mesenchymal stem cells therapies?* Libro “*Regenerative Medicine and Tissue Engineering*” publicado en mayo de 2013.

- Aloinjertos osteocondrales (OCAs):** se emplean principalmente en defectos osteocondrales de gran tamaño ( $> 2 \text{ cm}^2$ ), siendo particularmente útiles para re-establecer la arquitectura de la articulación, como puede ocurrir en la osteocondritis disecante (51). La ventaja del aloinjerto es su adaptabilidad a cualquier tamaño y curvatura de la lesión, además de obtenerlo de las zonas de carga (**Figura 7**). El inconveniente es que el cartílago criopreservado es una matriz con pocas células viables lo que repercute en la recuperación de la morfología cartilaginosa (50). El almacenamiento a temperatura corporal ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mejora la viabilidad de los condrocitos en comparación con la refrigeración a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , y se debe implantar dentro de los 28 días posteriores a la adquisición del injerto, ya que el almacenamiento prolongado puede afectar a la supervivencia de los condrocitos (51). Otros inconvenientes son la baja disponibilidad de donantes y el alto riesgo de colapso subcondral sobretodo durante el primer año produciendo una alteración en la mecánica de las articulaciones y el deterioro del cartílago trasplantado, y todavía persiste el riesgo de reacciones inmunológicas y de transmisión de enfermedades (51).



**Figura 7.** Implantación de aloinjerto osteocondral. (a) Imagen artroscópica de una gran lesión osteocondral. (b) Preparación del lecho óseo de la lesión. (c) El injerto preparado se coloca en el defecto. (d) El injerto se golpea suavemente en su posición teniendo cuidado de alinear los cuadrantes predeterminados. Tomada de York PJ, Wydra FB, Belton ME, Vidal AF. Joint Preservation Techniques in Orthopaedic Surgery. Sports Health. 2017;9(6):545-54.

- **Soportes poliméricos:** facilitan las técnicas de relleno de los defectos osteocondrales ya que permiten elegir el grosor y la longitud adecuada según la profundidad del defecto. Además, se trata de un procedimiento biológicamente seguro, ya que no existe riesgo de transmisión de enfermedades (50). Los soportes pueden estar formados por polímeros naturales o sintéticos biocompatibles, como son poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), quitosanos, gelatinas, etc (55, 56). El diseño de estos soportes se suele llevar a cabo en diferentes fases para permitir la regeneración de los diferentes tejidos en contacto con el soporte (hueso subcondral y cartílago) (57). Sin embargo, dado que se ha observado una pérdida de resistencia a corto plazo y que su eficacia clínica no está totalmente demostrada, son necesarios estudios controlados a largo plazo para valorar que sustituyan a los auto o aloinjertos (57, 58).

### 4.2.3 Métodos regenerativos

En los últimos años se han estado empleando técnicas basadas en la ingeniería de tejidos para promover la formación de cartílago hialino. Podemos distinguir dos técnicas. En una de ellas se desarrolla una MEC de tamaño y geometría adecuados empleando únicamente las células necesarias (ya sean osteoblastos, condrocitos o MSC) para la regeneración de la lesión. En la otra técnica se combinan las células con un hidrogel, y el conjunto se cultiva para dar lugar a un constructo (del inglés, *construct*) con el objetivo de obtener una MEC cartilaginosa tridimensional (50).

#### Trasplante autólogo de condrocitos

Los intentos de restaurar la superficie articular con cartílago hialino nativo en defectos grandes ( $> 2 - 3 \text{ cm}^2$ ) llevaron al desarrollo del trasplante de condrocitos, principalmente autólogos (ACI), para disminuir la posible respuesta inmune del huésped, así como la posible transmisión de enfermedades. Cabe mencionar que, aunque el cartílago se consideró durante mucho tiempo como un tejido inmunológicamente privilegiado son múltiples los estudios que han demostrado que el cartílago, y específicamente los condrocitos, poseen antígenos y son capaces de provocar una respuesta inmune (38, 39).

Para llevar a cabo el ACI, primero se realiza una biopsia de cartílago hialino articular. Las células se cultivan y se expanden *in vitro*, y se implantan en el defecto en un segundo tiempo quirúrgico, recubriéndose con una membrana que se sutura al cartílago sano sellándolo además con fibrina (50). En grandes defectos osteocondrales (como los que se pueden encontrar en la osteocondritis disecante) se puede realizar el relleno del defecto con injerto óseo, colocándose una membrana sobre la que se depositan las células, que se vuelven a recubrir con otra membrana, suturada y sellada. Por ello esta técnica fue denominada ACI «en sandwich» (39, 45, 50).

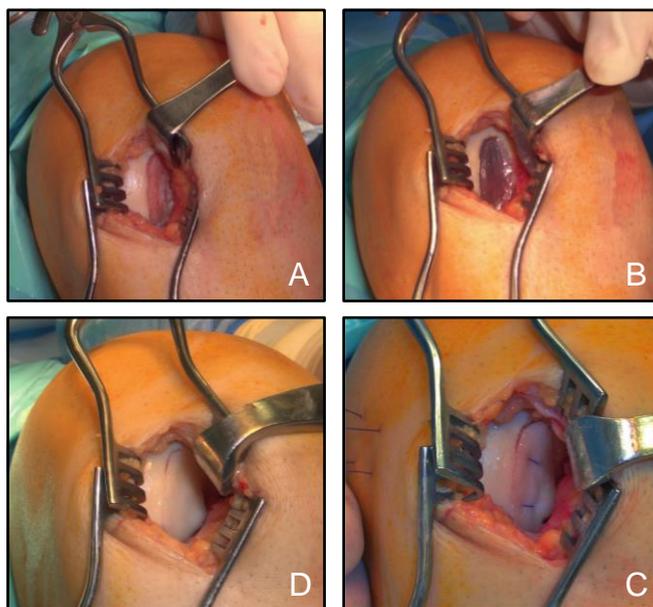
La primera generación de ACI (P-ACI) fue descrita en 1987 por Brittberg y consistía en condrocitos implantados bajo una membrana periostal sellada con pegamento de fibrina. Sin embargo, se observaron problemas con el periostio (59). Los mejores resultados se presentan en pacientes con sintomatología inferior a 3 años y con lesiones condrales de espesor completo en cóndilo femoral medial que presenten los bordes de cartílago sanos y sin afectación de hueso subcondral (50).

En el ACI de segunda generación se introdujo el uso de las membranas, principalmente de colágeno (MACI), para cubrir el cultivo de condrocitos. Las

membranas se pueden fijar con pegamento de fibrina, permitiendo así el procedimiento artroscópico y disminuyendo por tanto la morbilidad de la técnica abierta y la morbilidad asociada a la obtención del periostio. Sin embargo, se han observado amplias zonas de fibrocartílago (50, 51, 59), y no se han encontrado diferencias clínicas entre el uso de la primera y la segunda generación.

Por ello, se desarrolló una tercera generación proponiendo el uso de soportes o andamios condroinductivos o condroconductivos (en inglés, *scaffolds*), con estructura tridimensional, y con células alogénicas que permitan desarrollar un tejido óptimo antes de la cirugía (50, 60). Son adecuados para su aplicación mediante artroscopia y en un único procedimiento quirúrgico en lesiones de gran tamaño (45), como se puede observar en la **Figura 8**. En la práctica clínica habitual las matrices más empleadas son las de colágeno, AH y quitosano (50).

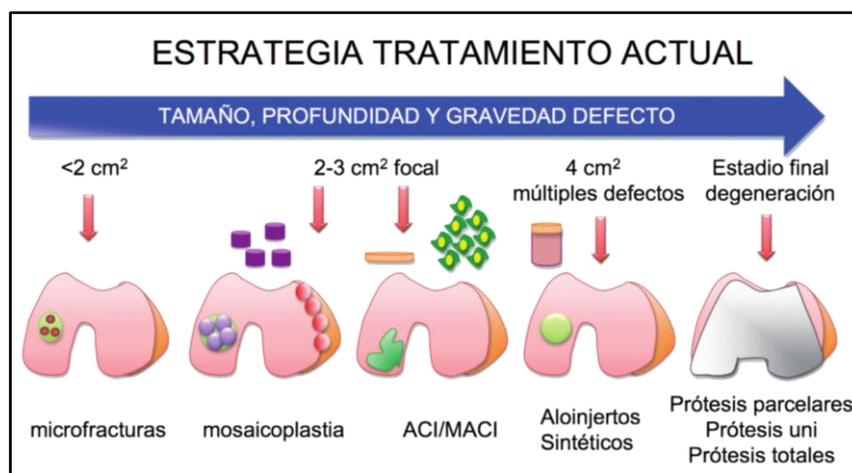
Los estudios actuales muestran que el ACI comparado con los procedimientos estimulantes de la médula ósea resulta en una mejor reparación histológica, aunque los resultados clínicos son similares (61).



**Figura 8.** (A) Lesión condral tratada con una matriz de fibrina. (B) Medición de la lesión. (C) Colocación de la matriz con condrocitos cultivados. (D) Sutura de estabilización. Tomada de Alvarez ER, P; Restrepo, A; Forriol F. Revisión de la reparación del cartílago. Posibilidades y resultados. Trauma Fund Mapfre. 2010;21:117-34.

En resumen, son múltiples los tratamientos existentes en la actualidad aplicados en lesiones osteocondrales, sin embargo no se ha podido demostrar una evidencia que se decante por uno de ellos a largo plazo, aunque la tendencia actual en la literatura indica

que el ACI de segunda y tercera generación por artroscopia es una buena herramienta para la reparación de lesiones osteocondrales (59). En la **Figura 9** se muestra un esquema de las opciones de tratamiento quirúrgico comentados en esta memoria, en función del tamaño y número de las lesiones osteocondrales.



**Figura 9.** Indicaciones generales para el tratamiento de las lesiones condrales. Tomada de Alvarez ER, P; Restrepo, A; Forriol F. Revisión de la reparación del cartílago. Posibilidades y resultados. Trauma Fund Mapfre. 2010;21:117-34.

#### 4.2.4 Nuevas estrategias

El ACI (en cualquiera de las tres generaciones) presenta inconvenientes, como ya se han mencionado en la sección 4.2.3. Esto ha llevado al desarrollo de nuevas líneas de investigación centradas en el uso de la IT. La **ingeniería tisular** es un campo multidisciplinar que busca el desarrollo de sustitutos biológicos con el objetivo de restaurar, mantener o mejorar la función tisular. Esta estrategia combina el aporte de células, ya sean diferenciadas o no, con un soporte, andamio o *scaffold* al cual se pueden añadir distintos factores que aceleren la proliferación y diferenciación celular, para posteriormente, ser trasplantado al tejido dañado para estimular su regeneración y reconstruir la estructura y la función del tejido original. Es decir, la IT combina el uso de biomateriales, factores de crecimiento y células para reparar tejidos (62-64).

Existen tres tipos de células no alteradas genéticamente que pueden utilizarse en la IT (62):

- Las células indiferenciadas de origen embrionario o umbilical. Presentan problemas éticos a la hora de utilizarlas, y además son mucho más inmunogénicas que las del adulto.

- Las células diferenciadas como son los osteoblastos, condrocitos, etc.
- Entre ambas, se encuentran las células madre mesenquimales que pueden diferenciarse a distintas líneas celulares. A diferencia de las de origen embrionario, las MSC no generan conflictos éticos, tiene menor capacidad cancerígena, son inmunoprivilegiadas y pluripotenciales y pueden diferenciarse en múltiples líneas celulares, como son los linajes cartilagosos y óseos (50, 60). Además, pueden ser obtenidas y aplicadas en un solo acto quirúrgico, aunque también puede ser extraídas en un primer momento, y cultivadas en andamios tridimensionales junto con factores de crecimiento que induzcan la diferenciación condrogénica, y posteriormente ser implantadas en un segundo tiempo quirúrgico.

Son múltiples los reservorios de los que se pueden obtener las MSC como son el hueso trabecular, el tejido adiposo y la médula ósea. Una fuente ideal de células madre autólogas puede ser el tejido adiposo del propio paciente (63, 65, 66) ya que estas células madre se diferencian en células similares a los osteoblastos y condrocitos y son capaces de formar una MEC mineralizada muy similar a la del tejido nativo (67).

En cuanto al empleo de MSC, clínicamente, tras dos años de tratamiento, se han observado resultados similares después del trasplante de MSC en comparación con ACI, observándose un tejido de reparación fibrocartilaginoso. Sin embargo, a pesar de su potencial, la administración intraarticular de MSC está en discusión para el tratamiento de la osteoartrosis siendo necesarios estudios clínicos con niveles de evidencia más altos antes de recomendar su uso (39).

## 5. Uso de biomateriales en medicina

Los biomateriales se definen como aquellos materiales usados en la fabricación de determinados dispositivos que son capaces de interactuar con los sistemas biológicos, y, por tanto, se pueden aplicar en distintas ramas de la medicina. Deben ser materiales biocompatibles que no produzcan reacciones adversas en el tejido vivo, así como biodegradables, no citotóxicos, no inmunogénicos y deben ser fácilmente reproducibles y estables desde el punto de vista mecánico (68, 69).

El uso de los biomateriales en el campo de la biomedicina está muy extendido ya que se ha observado su utilidad en la liberación de fármacos o en la regeneración de tejidos mediante la IT en la que se diseñan soportes o *scaffolds* (69) que tratan de simular la MEC generada por las propias células cuya función es facilitar la interacción

célula – célula, la proliferación y diferenciación celular (70-72).

## 5.1 Biomateriales en Traumatología y Cirugía Maxilofacial

Existen una gran cantidad de biomateriales, que en función de su composición se pueden clasificar en 3 grandes grupos (68):

- **Biomateriales metálicos**, entre los que se encuentran las aleaciones de cobalto, aluminio y cromo entre otros. Presentan como principal ventaja su resistencia a los impactos y al desgaste, sin embargo, el principal problema es la corrosión que pueden sufrir en contacto con el organismo. El principal uso es en la fabricación de material de osteosíntesis en Cirugía Ortopédica y Traumatología.
- **Biomateriales cerámicos**, como la hidroxiapatita. Pueden ser materiales inertes o reabsorbibles según su composición y por tanto suelen ser biocompatibles. Sin embargo, debido a su baja resistencia mecánica y a que no son elásticos presentan mayor riesgo de rotura o fractura del material. Son muy adecuados en aplicaciones en tejido óseo por la similitud que presentan con la MEC del hueso compuesta de hidroxiapatita. También son útiles en la fabricación de prótesis de cadera o implantes dentales, así como la formación de cementos quirúrgicos que son capaces de estimular la diferenciación tisular y la formación de hidroxiapatita y así potenciar la reparación ósea (73, 74).
- **Biomateriales polímeros**, se tratan de materiales fácilmente manipulables y con unas características físico-químicas bien definidas, siendo los biomateriales más empleados en la biomedicina. Son bioabsorbibles (es decir, son degradados y eliminados con el tiempo por parte del organismo) y se pueden emplear como soportes en IT y en liberación de fármacos (69, 75). Podemos distinguir tres tipos de polímeros.
  - **Naturales**: se incluyen en este grupo principalmente polisacáridos (como la agarosa, alginato, AH o quitosano) y proteínas (como la gelatina y derivados de colágeno) (59). Los principales inconvenientes de los polímeros naturales radican en su menor fuerza mecánica y una degradación más rápida y dependiente del huésped (69, 76). Por otro lado, las proteínas de la MEC y los polisacáridos son muy empleados en la IT ya que presentan un alto rendimiento biológico permitiendo

presentar propiedades antibacterianas y mucoadhesivas, además de ser biocompatibles, biodegradables y no inmunogénicos (77, 78).

- **Sintéticos:** presentan mayor facilidad para modificar sus propiedades mecánicas y una gran versatilidad química en comparación con los polímeros naturales. Entre ellos se encuentran el polietilenglicol (PEG), poli(ácido L-glutámico), policaprolactona, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y copolímeros (79, 80).
- **Híbridos:** formados por biopolímeros naturales y sintéticos como el uso de hidrogeles de alginato con poli(alcohol vinílico). Combinan la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y la resistencia mecánica (81, 82).

### 5.2 Biomateriales en la regeneración del cartílago articular

Son varios los soportes estudiados en el campo de la regeneración tisular, siendo los **hidrogeles** uno de los tipos más empleados. Los hidrogeles son redes tridimensionales compuestas por polímeros hidrófilos que retienen un alto contenido de agua y presentan propiedades elásticas no adhesivas (83, 84). Son capaces de promover el transporte de nutrientes y los productos de desecho hacia y desde las células encapsuladas en el hidrogel. Por otro lado, se pueden encapsular dentro del hidrogel micropartículas que contengan factores de crecimiento o fármacos, actuando como soportes de liberación controlada de fármacos (85). Actualmente, una gran cantidad de hidrogeles derivados de polímeros naturales o sintéticos se están investigando para la reconstrucción del cartílago articular (86, 87). En concreto, los hidrogeles de AH son aplicados como vehículos de principios activos capaces de promover la regeneración del cartílago (88-90). Además, los hidrogeles tienen la capacidad de actuar como una MEC artificial que estimula la infiltración, adhesión y proliferación celular, proporcionando un soporte estructural inicial para la regeneración tisular (77).

Un avance importante ha sido el desarrollo de hidrogeles inyectables. Se basan en sistemas que se encuentran en fase líquida antes de la inyección y que se convierten en un sólido en el cuerpo humano por diferentes mecanismos. Estos sistemas permiten que una mezcla acuosa de precursores del gel junto con agentes bioactivos (fármacos, células o factores de crecimiento) se mezclen e inyecten en el defecto cartilaginoso, produciéndose un entrecruzamiento *in situ* de los precursores del gel (69, 91-94). Los hidrogeles inyectables son muy útiles en el tratamiento de lesiones osteocondrales, ya

que se aplican mediante procedimientos mínimamente invasivos y permiten una fácil incorporación de células y moléculas bioactivas (95, 96). Las principales características que deben cumplir las formulaciones que vayan a inyectarse intraarticularmente, así como los hidrogeles que se obtienen *in situ* son: biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y no inmunogenicidad (97).

Como se ha comentado en el apartado 1.1.2., la MEC del cartílago articular posee una naturaleza bifásica que puede ser considerada como una red polimérica semi-interpenetrada (semi-IPN, del inglés *semi-interpenetrating polymer network*) de proteínas entrelazadas con moléculas de alto peso molecular. Las redes semi-IPN consisten en una estructura reticular (es decir, un polímero en forma de red) en la que otro polímero lineal o ramificado de diferente naturaleza penetra a escala molecular, sin llegar a unirse químicamente. Es decir, se trata de mezclas de polímeros no unidos covalentemente entre sí, y que, por tanto, se pueden separar de la red sin romper enlaces químicos. Estos sistemas pueden presentar propiedades mejoradas con respecto a las de sus componentes por separado, como son una mayor bioadhesión y biocompatibilidad (98). La similitud entre la MEC del cartílago y la estructura semi-IPN, ha provocado un interés creciente en el desarrollo de hidrogeles que presenten este tipo de estructura. Estos hidrogeles con estructura semi-IPN tienen muchas aplicaciones en el campo biomédico y farmacéutico. Se tratan de biomateriales muy útiles que encuentran aplicación como soportes para la administración de fármacos y para IT estimulando la regeneración del tejido cartilaginoso (99-101).

Se ha demostrado el importante papel del AH y de la gelatina (Gel) en la formación de hidrogeles con el objetivo de estimular la regeneración tisular. La gelificación en el interior del organismo puede verse inducida por diferentes factores ambientales como son el cambio de temperatura, de pH, iones, etc. Por otro lado, existen varios métodos de entrecruzamiento de estos hidrogeles: mediante interacciones físicas (por interacción iónica) y mediante interacciones químicas (con formación de enlaces covalentes utilizando agentes entrecruzantes no tóxicos o enzimas). Los principales métodos de entrecruzamiento se muestran a continuación:

- **Fotopolimerización:** consiste en la adición química de grupos metacrililoilo (MA) introducidos previamente en la Gel o el AH, que polimerizan mediante irradiación con luz ultravioleta (UV) o visible, formando así hidrogeles Gel-MA/AH-MA. Este método de entrecruzamiento permite controlar el comportamiento celular (adhesión, proliferación y diferenciación celular) en el andamio (102, 103). Sin embargo, la generación de radicales libres por la

exposición a rayos UV originan una citotoxicidad y respuesta inflamatoria que pueden dañar el ADN celular (71, 88).

- **Reacción de adición tipo Michael:** consiste en la adición de tioles a un compuesto que contenga dobles enlaces. Se ha descrito su uso en regeneración de cuerdas vocales (104) y tejido hepático (105).
- **Formación de base de Schiff:** en este proceso de entrecruzamiento la reacción está mediada entre grupos amina de la gelatina y grupos aldehído. Debido a la alta toxicidad y los problemas de biocompatibilidad del glutaraldehído (GTA) se han desarrollado nuevos agentes entrecruzantes con polisacáridos oxidados como por ejemplo el dextrano (DEX). De esta manera, los grupos aldehídos del dextrano oxidado reaccionan con los grupos amina de la gelatina formando un hidrogel. Si la reacción se lleva a cabo en presencia de AH se obtiene un hidrogel con estructura de red semi-IPN, siendo muy útiles en la reparación condral (106).
- **Reacciones de amidación:** el entrecruzamiento se produce por reacción entre grupos carboxilo y grupos amina de la lisina e hidroxilisina de la gelatina. Este método permite añadir sustancias que estimulen la regeneración de tejido óseo (107) y la adhesión y proliferación celular (108).
- **Entrecruzamiento enzimático:** se emplean enzimas muy selectivas sin producir sustancias tóxicas. Para los sistemas de AH y gelatina se usan la peroxidasa de origen natural (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) y la transglutaminasa (109, 110).

### 5.2.1 Aplicaciones clínicas

Existen en la actualidad varios productos comercializados para el tratamiento de lesiones condrales formados por hidrogeles, como son BST-CarGel® (*Piramidal Life Science*), formado por quitosano y glicerofosfato o Gelrin C® (*Regents Biomaterials*) compuesto por polietilenglicol diacrilato (PEG-DA) y fibrinógeno humano que fotopolimeriza tras la exposición con luz UV. Ambos son capaces de transformarse en un gel a temperatura corporal, presentando por tanto una gelificación *in situ*.

Ambos geles comerciales se utilizan principalmente en la técnica de microfracturas con el objetivo de estabilizar el coágulo de fibrina que se forma a partir de la penetración en hueso subcondral, y se aplican mediante un procedimiento quirúrgico abierto.

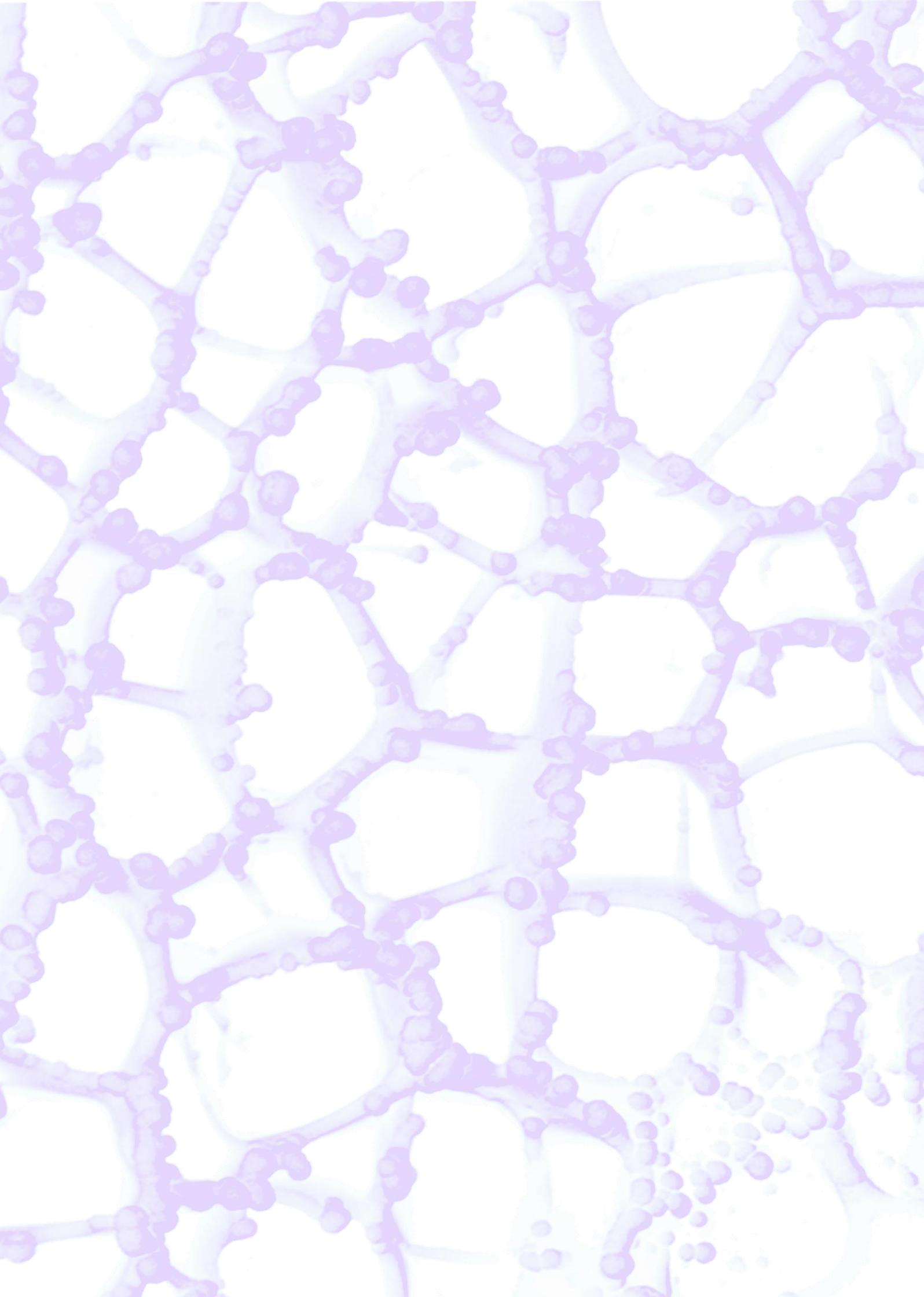
Presentan algunos inconvenientes como son su largo tiempo de gelificación y su poca adhesión al hueso.

Aunque existen varios estudios clínicos publicados en la bibliografía en los que se observa la formación de fibrocartílago como tejido de reparación (111-116), en el estudio realizado por Hoemman y col. de lesiones condrales realizadas en rodillas de ovejas y tratadas con microfracturas y BST-CarGel® se forma un cartílago de reparación más similar al hialino que al fibrocartílago, con unas propiedades mecánicas mejoradas (117).

Sin embargo, hasta el momento y en lo que respecta a nuestro conocimiento, no hay disponibles en la práctica clínica sistemas inyectables basados en redes semi-IPN que estén indicados para su inyección en lesiones condrales, y que eviten un procedimiento quirúrgico. Es por esto, que existe una necesidad de investigar en el desarrollo de composiciones alternativas de hidrogeles que permitan conseguir una regeneración del cartílago articular de una forma lo más eficaz posible y con el menor perjuicio para el paciente.









# Capítulo 3

## Objetivos



Las enfermedades osteoarticulares son muy frecuentes en nuestra sociedad, con una prevalencia que oscila entre el 10 y el 40 % de la población general. La OA es la patología osteoarticular más frecuente con una prevalencia entre 6 – 20 % en mayores de 20 años, suponiendo un impacto muy importante en el estado de salud (disminuyendo la calidad de vida del paciente) y el uso de recursos, siendo la primera causa de bajas laborales permanentes (42). Además se estima que en el año 2020 será la cuarta causa de discapacidad a nivel mundial (118).

Debido a las características del cartílago articular la reparación de las lesiones osteocondrales se ve muy limitada, ya que el cartílago articular tiene una baja capacidad de autorreparación. Son varias las técnicas quirúrgicas descritas para el tratamiento de las lesiones osteocondrales pero en todas se consigue una reparación del cartílago articular subóptima, con unas propiedades bioquímicas y mecánicas que difieren del tejido articular nativo (38, 118). En el caso de la artrosis de rodilla el último escalón quirúrgico es la artroplastia total de la articulación, que consiste en una técnica quirúrgica agresiva, con elevada morbilidad para el paciente, y que está poco indicada en pacientes jóvenes. Es decir, es necesario encontrar otras opciones terapéuticas que estimulen la proliferación y aumenten la viabilidad de los condrocitos. En los últimos años la investigación de posibles estrategias terapéuticas se ha orientado hacia el desarrollo de técnicas que estimulen la regeneración del cartílago hialino sin necesidad de realizar agresivas intervenciones quirúrgicas y permitiendo disminuir la morbilidad para el paciente y el coste para la sociedad.

Se ha observado que los primeros signos de degeneración del cartílago articular son la pérdida de glicoproteínas así como la disminución del ácido hialurónico en el líquido sinovial (119). Es por esto que se ha extendido el uso de infiltraciones intraarticulares de AH con el objetivo de mejorar la clínica e intentar mejorar el tejido de reparación que se pueda formar, además de tratarse de un procedimiento sencillo. Sin embargo, el ácido hialurónico infiltrado se elimina del cuerpo a través de las enzimas hialuronidasas en pocos días o semanas por lo que el efecto puede no ser óptimo debido al poco tiempo de exposición (98). Por esta razón, resulta interesante estabilizarlo de alguna manera en una red de hidrogel para prolongar su vida media, como se desarrolla en esta tesis.

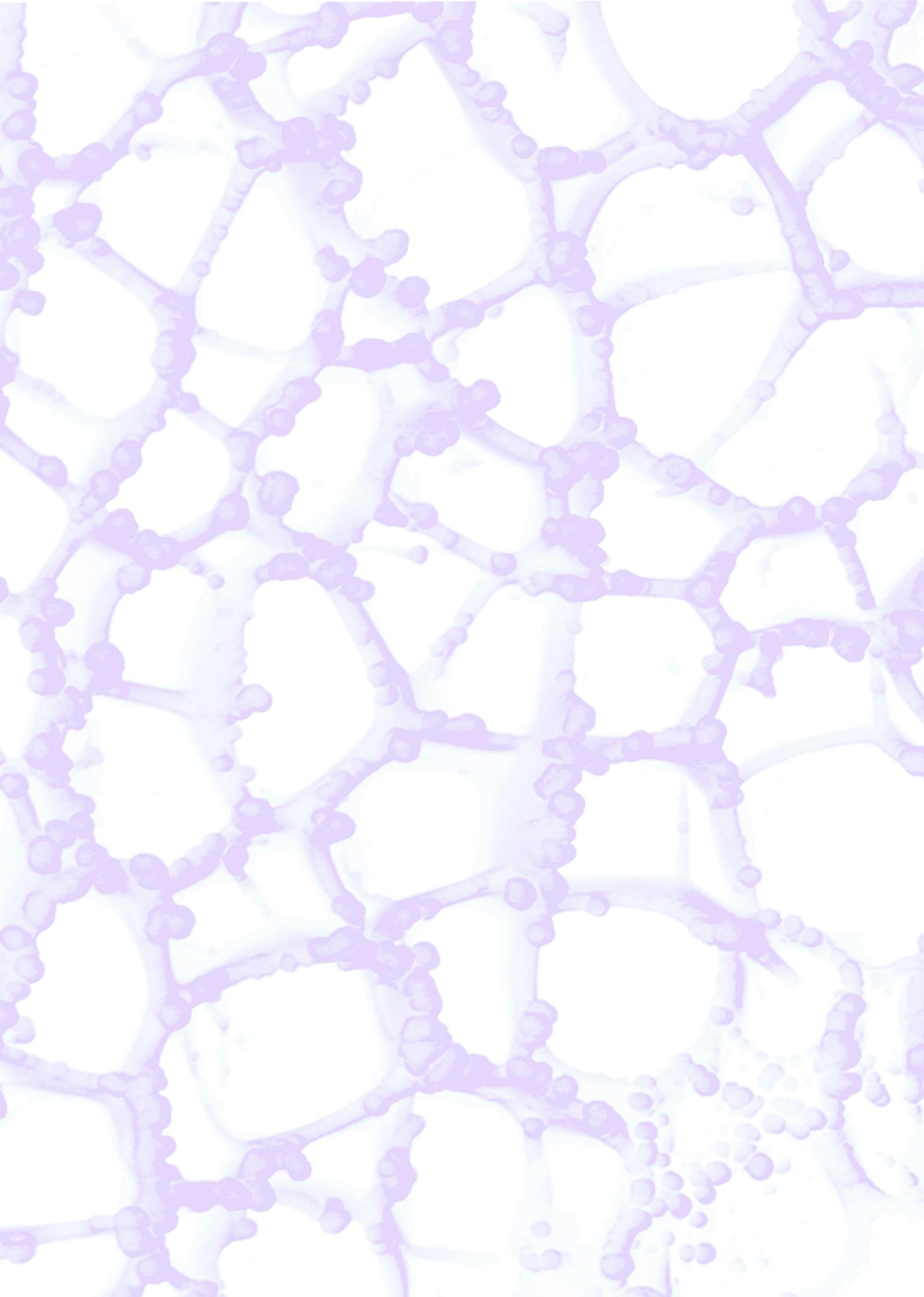
La **hipótesis** que planteamos en este estudio es la siguiente: la capacidad reparativa de los hidrogeles portadores de ácido hialurónico y cargados con fármacos anti-inflamatorios (ya sea corticoide o anti-inflamatorios no esteroideos - AINEs - ) se ve aumentada debido a la formación de un hidrogel con estructura de red semi-interpenetrada capaz de mantenerse durante más tiempo en la articulación y mejorar el

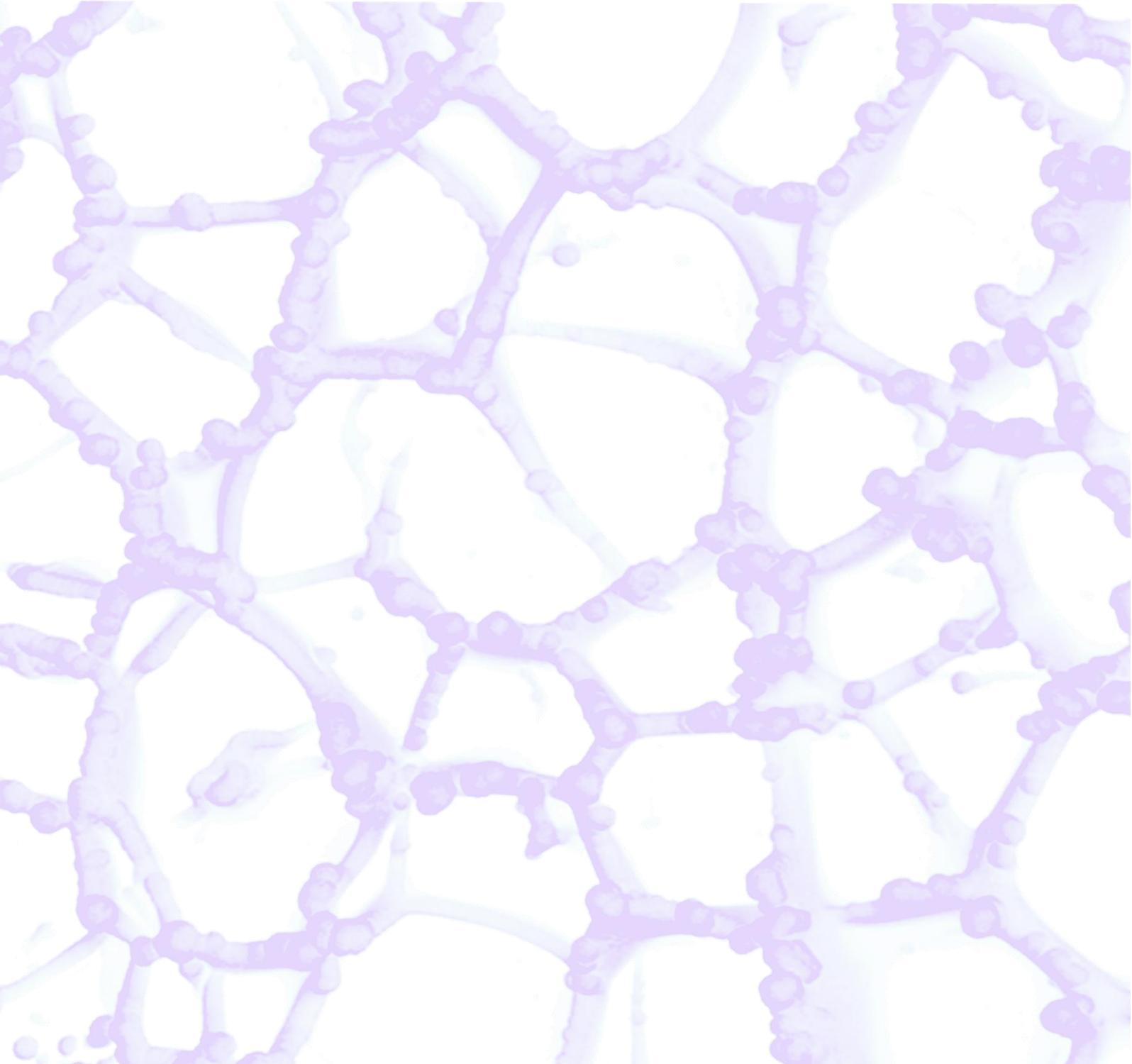
efecto del ácido hialurónico en un modelo de osteoartrosis inducido artificialmente en la rodilla de un animal de experimentación. Además, la administración intraarticular de los fármacos anti-inflamatorios en un sistema de hidrogel inyectable permite una liberación *in situ* y controlada del fármaco lo que aumenta la biodisponibilidad del mismo y disminuye los efectos secundarios que conlleva la administración por vía sistémica, a la vez que se produce una disminución del proceso inflamatorio en la articulación lo que facilita y estimula la reparación de las lesiones condrales.

Los **objetivos específicos** del presente trabajo son:

- Preparación de agentes de entrecruzamiento de toxicidad reducida.
- Desarrollo de formulaciones inyectables con dos componentes, que una vez mezclados en el momento de su aplicación en el organismo, gelifiquen *in situ* y den lugar a la formación de un hidrogel que contenga ácido hialurónico. Estos hidrogeles tienen una estructura de red semi-interpenetrada obteniéndose en un máximo de 30 minutos después del mezclado de los componentes, aumentando la bioadhesión y biocompatibilidad del producto final.
- Desarrollo de las formulaciones inyectables cargadas con medicamentos anti-inflamatorios: dexametasona (Dexa) como corticoide y naproxeno (Nap) como AINE.
- Evaluación de las propiedades de los hidrogeles *in vitro* en cuanto a grado de hinchamiento y estabilidad/degradación.
- Estudio *in vitro* de las cinéticas de liberación de los medicamentos en medios fisiológicos simulados.
- Determinación de la citotoxicidad y proliferación celular de los hidrogeles portadores de AH, cargados o no con fármaco, mediante estudio *in vitro* de cultivos celulares utilizando condrocitos y osteoblastos.
- Estudio *in vivo* de la capacidad de reparación osteocondral de los hidrogeles en un modelo experimental de osteoartrosis inducida en rodilla de conejo de raza Nueva Zelanda.







# Capítulo 4

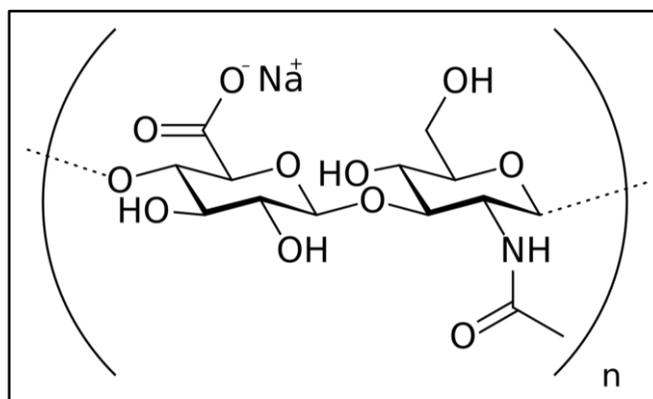
## Materiales y métodos



## 1. Desarrollo de formulaciones inyectables

Como se ha comentado en secciones anteriores, la articulación de la rodilla contiene de 1 a 5 mL de líquido sinovial formado por ácido hialurónico y glicoproteínas lubricantes que reducen la fricción. La concentración de AH en articulaciones con lesiones condrales se encuentra disminuida de forma significativa, así como la capacidad de lubricación y resistencia mecánica a las distintas cargas. Es por esto que cada vez está más extendido el uso de AH en el campo de la regeneración de tejidos.

El AH es un polímero natural ampliamente distribuido en el tejido conectivo. Se trata de un polisacárido compuesto por unidades repetidas del disacárido formado por *N*-acetilglucosamina y ácido glucurónico, unidos por enlaces glucosídicos alternantes  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4. Es el principal responsable de las propiedades viscoelásticas del líquido sinovial. Además, debido a su capacidad para interactuar con algunos receptores celulares, el AH juega un papel importante en procesos como la proliferación celular, migración y diferenciación. Debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, es uno de los biopolímeros más usados en el campo biomédico, en aplicaciones como reparación de tejidos, tratamiento de problemas articulares, y como soportes en IT (119).



**Figura 10.** Estructura química del hialuronato sódico.

En este trabajo se han preparado formulaciones inyectables que dan lugar a hidrogeles de AH con una estructura de red semi-IPN. La **Figura 10** muestra la estructura química de la sal sódica del AH (hialuronato sódico) empleada en la presente tesis.

### 1.1 Diseño de formulaciones inyectables con estructura de red semi-interpenetrada de gelatina y ácido hialurónico

Las formulaciones inyectables que se han desarrollado constan de dos componentes

que deben mezclarse previamente a la inyección. Uno de ellos es el AH y la elección del otro componente está basada en materiales que se asemejen a los que están presentes de manera natural en la articulación o que pretendan mejorar y frenar la osteoartritis.

Como se ha comentado en la Introducción, el colágeno tipo II es uno de los principales componentes del cartílago articular. Debido a su estructura molecular es insoluble en agua, si bien puede solubilizarse por hidrólisis enzimática con pepsina, que elimina selectivamente los extremos C y N terminal. Sin embargo, según informe de la empresa *Collagen Solutions* (120), es posible mantener colágeno en disolución a pH ácido, pero gelifica al neutralizar el pH. Esto limita la utilización de colágeno soluble en la formulación inyectable diseñada en este trabajo, ya que esta precisa mantener los dos componentes de la formulación a pH neutro para que reaccionen adecuadamente y formen la red semi-IPN (como se explica más adelante en la sección 1.3).

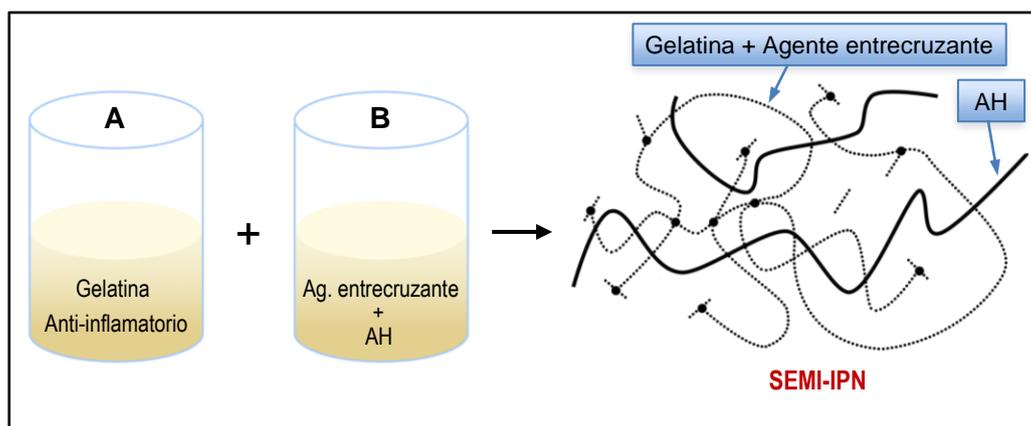
Por ello, ante la dificultad de utilizar colágeno para este trabajo, se propone la utilización de gelatina. La gelatina es una proteína que se obtiene por hidrólisis del colágeno (121). Es soluble en agua caliente y gelifica en frío, tiene por tanto un comportamiento sol-gel. Su composición en aminoácidos es similar a la del colágeno, conteniendo 8 de los 9 aminoácidos esenciales.

Debido a la naturaleza sol-gel de la gelatina, es necesario entrecruzarla químicamente para formar una red de hidrogel a 37 °C (ya que si no quedaría en disolución a esa temperatura). Es por ello que hay que añadir también un agente entrecruzante a la formulación inyectable.

Por tanto, la formulación se diseña en base a dos componentes:

- **Componente A:** Disolución de gelatina (Gel).
- **Componente B:** Disolución de AH y agente entrecruzante.

Al mezclar los dos componentes, la gelatina y el agente entrecruzante reaccionan formando una red de hidrogel, atrapando las cadenas lineales de AH para formar la red semi-IPN. La **Figura 11** muestra una representación esquemática de los componentes de la formulación inyectable y de la estructura semi-IPN formada. Se ha pretendido optimizar la formulación de tal forma que se obtenga una gelificación completa en un máximo de 30 min después del mezclado e inyección de los dos componentes.

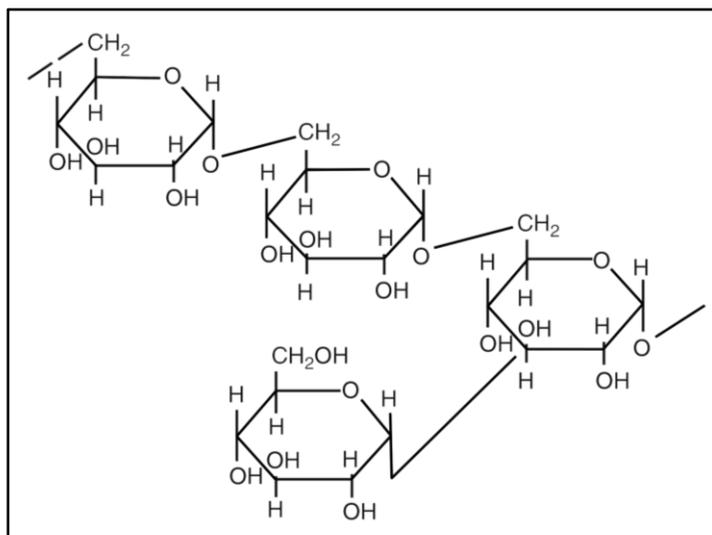


**Figura 11.** Esquema de los componentes de las formulaciones inyectables y de la estructura de red semi-interpenetrada.

## 1.2 Elección, preparación y caracterización del agente entrecruzante

Para entrecruzar la gelatina químicamente, una de las opciones es hacer reaccionar los grupos amina de los aminoácidos lisina e hidroxilisina con moléculas que tengan grupos dialdehído. El agente entrecruzante más empleado para este tipo de reacciones es el glutaraldehído, sin embargo, presenta una alta citotoxicidad, por lo que se ha propuesto la utilización de polialdehídos de alto peso molecular (122). Estos se pueden obtener oxidando parcialmente carbohidratos, ya que contienen numerosos grupos alcohol (diol), que pueden modificarse químicamente en presencia de un agente oxidante como el periodato sódico ( $\text{NaIO}_4$ ), oxidándose a dialdehídos.

En este estudio se han evaluado tres tipos de dextranos de distinto peso molecular para llevar a cabo la función entrecruzante. Los dextranos son carbohidratos compuestos por unidades monoméricas de anhidroglucosa, unidas por enlace  $\alpha$  (1,6). Pueden tener algunas cadenas laterales de máximo 1 o 2 unidades de anhidroglucosa unidas a la cadena principal por enlace  $\alpha$  (1,3). Son mayormente lineales ya que contienen como máximo alrededor del 5 % de ramificación. Esto les confiere una elevada solubilidad en agua. Su estructura química se muestra en la **Figura 12**.



**Figura 12.** Estructura química del dextrano. Tomada de *Polysaccharides Route: A New Green Strategy for Metal Oxides Synthesis* Junio 2012. *Environmental Chemistry for a Sustainable World*.

Para llevar a cabo la función de entrecruzamiento se emplearon dextranos de varios pesos moleculares: 20 kDa, 40 kDa y 70 kDa denominados DEX20, DEX40 y DEX70 respectivamente, (cedidos amablemente por la empresa Pharmacosmos, Dinamarca) con grado farmacéutico, es decir, bien caracterizados química y biológicamente, observándose que presentan una alta solubilidad en agua a elevadas concentraciones.

Se realizaron reacciones de oxidación con  $\text{NaIO}_4$  variando la ratio  $\text{NaIO}_4/\text{Dextrano}$ , para optimizar las condiciones de reacción. Todas las reacciones se realizaron a partir de disoluciones de partida de dextrano y  $\text{NaIO}_4$  a 100 mg/mL y el tiempo de reacción se mantuvo 4 h a temperatura ambiente. Los dextranos oxidados se denominaron como DEX20-ox, DEX40-ox y DEX70-ox.

Una vez concluida la reacción, se purificaron los dextranos oxidados por diálisis durante 3 – 5 días para eliminar posibles restos de  $\text{NaIO}_4$ . Para ello se empleó una membrana de diálisis con un *cut-off* de 1 kDa, consiguiéndose así la purificación al ser permeables a través de la membrana sólo las sustancias de muy bajo peso molecular. Una vez purificada la mezcla el dextrano oxidado se aisló por liofilización.

Los productos de la reacción se caracterizaron en base a su grado de oxidación y peso molecular.

- **Grado de oxidación:** se utilizó el método descrito por Zhao y col. (123) que consiste en hacer reaccionar las muestras oxidadas con clorhidrato de hidroxilamina y después realizar una valoración ácido-base con hidróxido de

sodio (NaOH). Se determinó la exactitud y precisión de este método de análisis resultando en una exactitud del 98 – 100 % y una precisión del 2,5 %.

- **Distribución de pesos moleculares por cromatografía de permeabilidad en gel (GPC):** es interesante controlar este parámetro porque durante la reacción de oxidación puede tener lugar la hidrólisis de las cadenas de dextrano, rompiéndose en fragmentos de menor peso molecular. Para su determinación se empleó un equipo GPC Shimadzu 20A con columnas Agilent PL Aquagel-OH (30, 40 y 50), de dimensiones 300 x 7,5 mm y tamaño de partícula de 8  $\mu\text{m}$ . Se usó el agua como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección de las muestras fue de 50  $\mu\text{l}$  a una concentración de 2 mg/mL durante un tiempo de desarrollo de 45 min. Se utilizaron patrones de pululanos (Pullulan, Varian) en el rango 708 kDa – 80 Da.

A continuación, para valorar el **efecto de la diálisis**, se determinaron los grados de oxidación y los pesos moleculares de los dextranos sin someterlos a ninguna reacción, antes y después del proceso de purificación.

Además, se evaluaron diferentes **ratios de  $\text{NaIO}_4$ /Dextrano** (con una proporción final de 0,15 mol y 0,30 mol) con los tres dextranos de diferentes pesos moleculares (DEX20, DEX40 y DEX70) manteniendo como medio de reacción el agua, con el objetivo de valorar los diferentes grados de oxidación conseguidos en el dextrano y si, además, el grado de oxidación variaba en función del peso molecular del mismo. También se valoró el grado de oxidación del dextrano sin modificar, es decir, antes de hacerlo reaccionar con  $\text{NaIO}_4$ , para conocer el grado de oxidación del producto de partida.

### 1.3 Desarrollo preliminar de formulaciones con estructura de red semi-interpenetrada

Para el desarrollo inicial de las formulaciones inyectables con estructura de red semi-IPN se realizaron diversos estudios con el objetivo de optimizar el mejor medio de reacción y valorar el efecto del peso molecular del AH y la incorporación de fármacos anti-inflamatorios en el tiempo de entrecruzamiento y, por tanto, poder determinar el tiempo óptimo de inyección de los hidrogeles. Los estudios realizados se detallan a continuación.

### 1.3.1 Estudio del tiempo de inyección

Para el desarrollo inicial de las formulaciones y optimización de tiempos de entrecruzamiento, (el objetivo es la formación de un gel en 30 min a 37 °C), se prepararon formulaciones utilizando hialuronato sódico de Bioibérica y gelatina suministrada por Sigma-Aldrich, de Tipo A y 300 Bloom. Esta gelatina no tiene calidad farmacéutica y por tanto se utilizó sólo en la fase preliminar de desarrollo.

Para optimizar los **tiempos de entrecruzamiento** de las formulaciones se varió la concentración de gelatina en disolución, la ratio Dextrano oxidado/Gelatina (DEX-ox/Gel), el grado de oxidación y el peso molecular del dextrano oxidado.

Para que la reacción de entrecruzamiento entre los grupos amina de la gelatina y aldehído del dextrano oxidado tenga lugar, el pH del medio de reacción debe acercarse al del punto isoeléctrico (IEP) de la gelatina (124). La razón es que los grupos amina de la gelatina deben estar desprotonados para poder reaccionar adecuadamente con los grupos aldehído. La gelatina empleada es de Tipo A (ácida), y tiene un punto isoeléctrico entre 7,0 y 9,0. Es por ello que se mantuvo el pH del medio de reacción en 7,4 utilizando tampón fosfato (PB) a una concentración de 0,1 M.

Una vez mezclados todos los componentes, se incubaron las muestras a 37 °C. El tiempo de gelificación se determinó invirtiendo el vial y considerando el tiempo en el que dejaba de fluir la mezcla.

A continuación, se realizaron estudios para valorar el tiempo de gelificación en presencia de ácido hialurónico utilizándose el de bajo peso molecular (200 kDa), y DEX70 oxidado al 40 % (DEX70-ox(40%)). Se varió la relación entre DEX70-ox(40%) y gelatina, la relación entre Gelatina/Ácido Hialurónico (Gel/AH), la concentración de gelatina en la mezcla final y la concentración del tampón en el medio de reacción.

### 1.3.2 Elección del medio de reacción

Para la optimización final de las formulaciones, se utilizó gelatina grado Pharma de Tipo A y 280 Bloom suministrada por Reinert-Gruppe. En este estudio se realizaron diferentes reacciones variando el tampón del medio. A continuación, se valoró la viabilidad celular de los fibroblastos durante 24 h a 37 °C, en presencia de los distintos tampones con el objetivo de calcular la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) del mismo y así determinar la concentración máxima posible a utilizar sin toxicidad para las células. Además, hay que tener en cuenta que es necesario mantener el medio lo más concentrado posible para disminuir el tiempo de gelificación.

La **Tabla 1** muestra la composición química de los diferentes tampones ensayados comparado con el PBS 0,01 M pH = 7,4 que se emplea en ensayos celulares (Dulbecco's).

**Tabla 1.** Composición química de los diferentes tampones de pH = 7,4 ensayados como medio de reacción.

	Dulbecco's PBS 0,01 M Sigma Aldrich D837 (mol/L)	PB 0,1 M Sales Potásicas (mol/L)	PB 0,1 M Sales sódicas y potásicas (mol/L)	Tampón citrato 0,7 M pH 7,4 (mol/L)
KCl	0,003	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,001	0,023	0,015	-
NaCl	0,137	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,008	-	0,081	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,077	-	-
Citrato trisódico 5,5 H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,07

Para evaluar la influencia en el tiempo de gelificación de la utilización de los distintos tampones en concentraciones no citotóxicas, se prepararon formulaciones conteniendo únicamente gelatina grado Pharma y DEX70-ox(40%) (en ausencia de ácido hialurónico) con las siguientes características:

- Relación Gel/DEX70-ox(40%): 1/1.
- Concentración de gelatina en la mezcla final: 50 mg/mL.
- Medio de reacción a pH = 7,4:
  - Tampón fosfato 0,1 M y 0,025 M preparado sólo con sales potásicas.
  - Tampón fosfato 0,025 M preparado con sales sódicas y potásicas.
  - Tampón citrato 0,07 M y 0,015 M.

### 1.3.3 Efecto del peso molecular del ácido hialurónico en el tiempo de inyección

Una vez seleccionado el medio de reacción más adecuado se valoró la posible influencia del peso molecular del AH en el tiempo de gelificación de las formulaciones. Para este estudio se empleó AH de Bioibérica de peso molecular bajo (200 kDa), medio (entre 800 y 1000 kDa) y alto (mayor de 1000 kDa).

Para mantener la misma viscosidad en las tres formulaciones ensayadas se ajustó

la relación Gel/AH, y se mantuvo una relación Gel/DEX70-ox(40%) de 1/1.

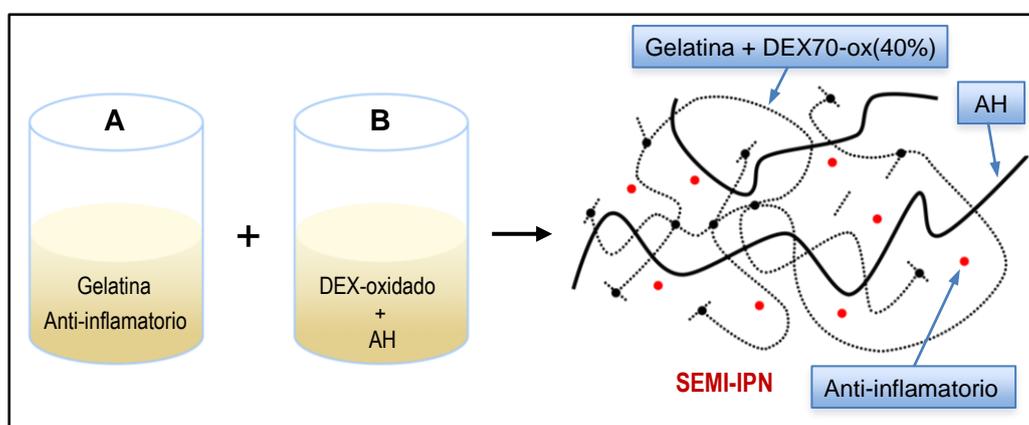
Una vez obtenidas las distintas formulaciones, se realizó el ensayo de inyectabilidad utilizando jeringas de 1 mL y agujas de calibre 21 G.

Una vez seleccionado el AH de peso molecular medio (800 – 1000 kDa) en función de los resultados obtenidos en los estudios previos, se determinaron los tiempos de gelificación en tampón fosfato 0,025 M aumentando la proporción de AH en la formulación, lo que supone un aumento de la viscosidad de la misma.

### 1.3.4 Incorporación de anti-inflamatorios

Como último estudio en el desarrollo preliminar de las formulaciones inyectables, se incorporó a las formulaciones un anti-inflamatorio no esteroideo (naproxeno) o bien un corticoide (dexametasona) separadamente. Las formulaciones se prepararon en PB 0,025 M, conteniendo un 29 % de AH de peso molecular 800 – 1000 kDa. Se mantuvo una relación Gel/DEX70-ox(40%) de 1/1 y una concentración de gelatina en la mezcla final de 50 mg/mL. A continuación, se estudiaron los tiempos de gelificación una vez incorporados los fármacos.

Los anti-inflamatorios se incorporaron en forma de dispersión en el componente A, junto a la gelatina, tal como se indica en la **Figura 13**.



**Figura 13.** Esquema de preparación de formulaciones con estructura de red semi-IPN incorporando anti-inflamatorios. Representación gráfica de los componentes A y B de la formulación inyectable y de la red semi-IPN incorporando anti-inflamatorios.

## 1.4 Composición final y preparación de las formulaciones con estructura de red semi-interpenetrada

Analizando los resultados obtenidos en el apartado 1.3 se fijan los siguientes

parámetros de reacción:

- Ratio Gel/DEX70-ox(40%): 1/1.
- Ratio Gel/AH: 71/29.
- Concentración de Gel en la mezcla final: 50 mg/mL.
- Concentración de AH en la mezcla final: 20 mg/mL.
- Peso molecular de AH: 800 – 1000 kDa.
- Medio de reacción (pH 7,4): PB 0,025 M.

En la **Tabla 2** se muestra la composición de las formulaciones inyectables finalmente utilizadas.

**Tabla 2.** Composición final de las formulaciones inyectables. H: hidrogel sin fármaco. H-Nap: hidrogel con naproxeno. H-Dexa: hidrogel con dexametasona. Nap: naproxeno. Dexa: dexametasona.

	COMPONENTE A				COMPONENTE B		
	Gel (mg)	Nap (mg)	Dexa (mg)	Tampón (mL)	AH (mg)	DEX70-ox (40%) (mg)	Tampón (mL)
H	50	-	-	0,5	20	50	0,5
H-Nap	50	6	-	0,5	20	50	0,5
H- Dexa	50	-	6	0,5	20	50	0,5

Para la preparación de 1 mL de formulación cargada con anti-inflamatorio se siguió el siguiente protocolo:

- **Componente A:** se disuelven 50 mg de gelatina en 0,5 mL PB 0,025 M a 37 °C, y una vez disuelta se añaden 6 mL del fármaco (ya sea dexametasona o naproxeno) y se introduce en el baño de ultrasonidos hasta obtener una dispersión homogénea posible. Durante el proceso se debe evitar que baje la temperatura en exceso, ya que la gelatina puede formar un gel.
- **Componente B:** se disuelven, bajo agitación magnética, 50 mg de DEX70-ox(40%) en 0,5 mL PB 0,025 M a temperatura ambiente durante 30 – 45 min. Una vez disuelto, se añaden 20 mg de AH (800 – 1000 kDa) y se continúa con la agitación hasta obtener una disolución completa del AH (aproximadamente 45 – 60 min). Se atempera el vial del componente B a 37 °C.

Por último, se mezclan los dos componentes. Debido a la viscosidad del medio, lo más adecuado es pipetear el componente A y añadirlo al vial del componente B, agitándose posteriormente mediante el uso de un vórtex para conseguir mezclar los dos componentes durante 2 – 3 min. A continuación, se introduce la mezcla en la estufa a 37 °C para que recupere la temperatura óptima de inyección, evitando la gelificación física de la gelatina que se produce si desciende la temperatura.

Una vez atemperada la mezcla, se retira del vial utilizando una jeringa de 1 mL y se inyecta mediante el uso de una aguja de diámetro 21 G.

El tiempo máximo que puede transcurrir entre el mezclado y la inyección es el siguiente:

- **Formulación sin anti-inflamatorio:** 10 min (el entrecruzamiento químico finaliza transcurridos 35 min después del mezclado de los dos componentes).
- **Formulación con anti-inflamatorio:** 30 min (el entrecruzamiento químico termina transcurridos 60 min después del mezclado de los dos componentes).

## 2. Hinchamiento y degradación de los hidrogeles

Para el **ensayo de hinchamiento/degradación** se prepararon previamente los correspondientes hidrogeles (H, H-Nap y H-Dexa). Una vez transcurrido el tiempo de gelificación, el correspondiente hidrogel se pesó ( $W_h$ ) y seguidamente se sumergió en 10 mL de solución tampón fosfato salino de pH 7,4 (PBS) y se introdujo en una estufa a 37 °C. Transcurridos diferentes intervalos de tiempo, cada muestra fue sacada de la solución y pesada tras eliminar los restos de agua superficial ( $W_t$ ). Después de cada pesada, la muestra se introdujo en el mismo medio. El valor hinchamiento/degradación (H/D) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Ratio H/D} = (W_t - W_h)/W_h$$

Donde  $W_h$  es el peso inicial de la muestra, y  $W_t$  es el peso de la muestra hidratada a tiempo t.

Se midieron un mínimo de tres réplicas de cada muestra y se promediaron los resultados.

### 3. Liberación *in vitro* de anti-inflamatorios

Para el **ensayo de liberación** se prepararon hidrogeles cargados con los fármacos anti-inflamatorios (H-Nap y H-Dexa). Una vez gelificados los hidrogeles se sumergieron en 10 mL de una disolución tamponada de PBS a pH 7,4 a 37 °C. El medio de disolución se cambió con tampón fresco a determinados tiempos y el medio sustituido se estudió a través de espectroscopía UV en un equipo *NanoDrop one* (*Thermo Fisher Scientific*) para determinar la concentración del fármaco. Para el naproxeno se analizó el pico de máxima absorbancia a una longitud de onda  $\lambda = 230$  nm y para la dexametasona a una  $\lambda = 243$  nm. La concentración del medicamento se evaluó aplicando la ecuación de *Lambert-Beer* ( $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$ , siendo  $\varepsilon$  el coeficiente de extinción molar,  $l$  el espesor de la muestra en cm y  $C$  la concentración) utilizando rectas de calibrado, previamente obtenidas a partir de la medición de la absorbancia de disoluciones de concentración conocida de naproxeno ( $1,2 \cdot 10^{-2}$  - 1 mg/mL) y de dexametasona ( $10^{-3}$  -  $6 \cdot 10^{-2}$  mg/mL). El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra y se promediaron los resultados.

### 4. Comportamiento celular *in vitro*

Se analizó la biocompatibilidad de las formulaciones preparadas con distintos tipos celulares: condrocitos, osteoblastos y fibroblastos, mediante el uso de diversos ensayos biológicos con el objetivo de conocer toxicidad y la interacción biológica de los diferentes sistemas preparados. Los ensayos de biocompatibilidad de cualquier biomaterial vienen determinados por la Norma Española UNE-EN-ISO 10993-1.

Los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* tienen como objetivos principales:

- Analizar la citotoxicidad de los compuestos empleados en la síntesis de las formulaciones.
- Determinar la posible toxicidad de residuos presentes en el hidrogel y que puedan afectar a la viabilidad del cultivo celular.
- Estudiar la proliferación celular cuando se siembra directamente sobre los hidrogeles, además de proporcionar información sobre la adhesión celular en estos biomateriales.

### 4.1 Tipos de células y cultivos celulares

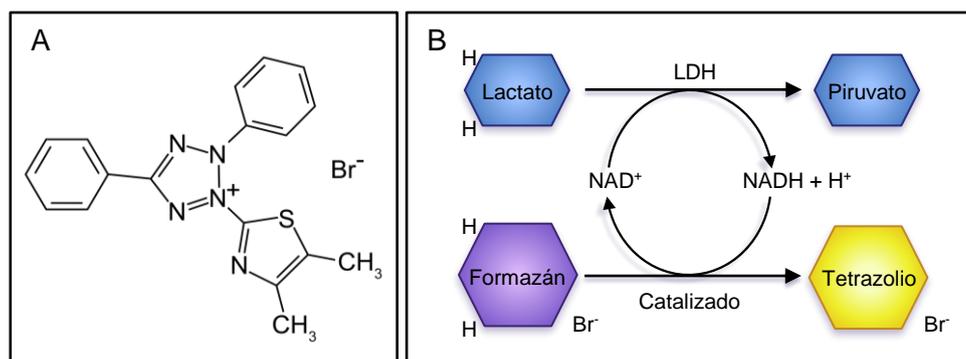
Las líneas celulares empleadas en nuestro estudio fueron osteoblastos humanos primarios (HOB) obtenidos de tejido óseo femoral, condrocitos articulares humanos (HAC) obtenidos del cartílago articular de rodilla (Innoprot, Derio, España) y fibroblastos dérmicos humanos (HDF, Innoprot, Derio, España), cultivadas a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub>.

El medio de cultivo utilizado para los distintos tipos celulares fue una mezcla 1:1 de Medio Modificado de Eagle-Dulbecco y solución nutritiva de Ham F-12 (DMEM/F12 HAM Gibco®, *Life Technologies*, Carlsbad, CA, EE. UU.) suplementado con:

- Suero bovino fetal al 10 % (v/v) (FBS; *Life Technologies*, Carlsbad, CA, EE. UU.)
- Solución antibiótica/antimicótica al 1 % (v/v) (concentración final de penicilina 100 unidades/mL y estreptomycin 100 mg/mL, *Life Technologies*, Carlsbad, CA, EE.UU.).

### 4.2 Valoración de citotoxicidad mediante el empleo de MTT

Mediante la realización de este ensayo se estudió la citotoxicidad del dextrano oxidado en fibroblastos y la citotoxicidad de los extractos de los geles (H, H-Nap y H-Dexa) en condrocitos y osteoblastos, mediante el uso del reactivo MTT. Dicho reactivo [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (Sigma M5655, mostrado en la **Figura 14 (A)**) es una sal de tetrazolio insoluble en el medio de cultivo que va a poder reducirse, virando de color amarillento a azul, a la sal de formazán correspondiente, merced a dos reacciones enzimáticas secuenciales. En la primera reacción la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la conversión de lactato a piruvato, que conlleva la reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH/H<sup>+</sup>. En el segundo paso, el catalizador (diaforasa) transfiere dos protones desde NADH/H<sup>+</sup> a la sal de tetrazolio, que es reducida a formazán (**Figura 14 (B)**). La enzima LDH únicamente está presente en las células vivas, por lo que la intensidad del virado es proporcional al número de células viables (125).



**Figura 14.** (A) Estructura química del bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). (B) Reacción de oxido-reducción en la que el lactato se trasforma en piruvato por acción de la LDH. Al reducirse NAD<sup>+</sup> en NADH/H<sup>+</sup>, la sal de tetrazolio (MTT) se reduce a formazán.

El reactivo MTT, al igual que otras sales de tetrazolio, no es capaz de penetrar a través de las membranas celulares, por lo que su introducción en el interior del citoplasma va a estar mediada por procesos de endocitosis, es decir, es absorbido activamente por las células cultivadas y a continuación, es reducido en una reacción dependiente de la actividad mitocondrial, generando formazán y virando su color. Este producto se acumula en el interior de las células, ya que no es capaz de atravesar la membrana celular. Tras la adición de un disolvente, como el dimetilsulfóxido (DMSO), los cristales de formazán se disuelven, pudiendo cuantificar colorimétricamente la intensidad del cambio de color.

La capacidad de las células para reducir el reactivo MTT proporciona información acerca de la integridad y actividad mitocondrial, lo que permite interpretar los resultados obtenidos como una medida de la viabilidad celular.

#### 4.2.1 Ensayo de citotoxicidad del agente de entrecruzamiento y de los anti-inflamatorios: IC<sub>50</sub>

En esta fase se estudió la citotoxicidad en condrocitos y fibroblastos de los anti-inflamatorios y del agente entrecruzante respectivamente. Los reactivos empleados en este ensayo son los siguientes:

- Medio de cultivo completo.
- Tampón fosfato salino (PBS).
- MTT en polvo (Sigma M5655).
- Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma D2650 TC grade).

- Discos Thermanox® (TMX; Labclinics S.L): control negativo no citotóxico.

En el ensayo IC<sub>50</sub> se preparó una disolución madre del compuesto a estudiar (2 mg/mL de naproxeno o dexametasona, y 80 mg/mL de DEX70-ox(40%)) en medio de cultivo y se realizaron diluciones consecutivas. Todas las disoluciones se esterilizaron por filtración utilizando filtros de 20 micras.

Paralelamente, se realizó la siembra de las células, utilizando medio de cultivo completo fresco, a una concentración de  $11 \cdot 10^4$  células/mL, sobre placas de 96 pocillos. Tras adicionar 100 µL de concentrado de células en cada uno de los pocillos y mantener estas placas durante 24 h a 37 °C y una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub>, se intercambié el medio de cultivo por las diluciones del dextrano oxidado o el fármaco previamente preparadas (n = 8), incubándose las placas posteriormente durante 24 h en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, se retiró el contenido de los pocillos, añadiéndose en su lugar la disolución de MTT (al 10 % en medio fresco). El reactivo MTT se mantuvo en contacto con los cultivos a 37 °C, durante 4 h, tras las que se extrajo el contenido de los pocillos y se añadió en cada uno de ellos 100 µL de DMSO, con el fin de disolver los cristales de formazán que se pudieran haber formado. Después de una agitación de 20 s a elevada intensidad, se realizó la lectura de densidad óptica a 570 nm, donde el MTT alcanza el máximo de absorbancia, con una longitud de onda de referencia de 630 nm, en un lector de placas Biotek Synergy HT.

Tras realizar la lectura de densidad óptica, a los valores de absorbancia obtenidos se le restaron los valores medidos para el blanco (medio sin células), y se relativizaron con respecto a los valores leídos para el control negativo, que en este caso es el medio de cultivo libre de suero sin el aditivo, obteniéndose la viabilidad celular relativa (% VR) con respecto al control, a partir de la siguiente fórmula:

$$\% VR = \frac{DO_S - DO_B}{DO_C} \times 100$$

donde DO<sub>S</sub>, DO<sub>B</sub> y DO<sub>C</sub> son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco y el control, respectivamente.

A continuación, se construyó una curva dosis-respuesta de la viabilidad celular relativa con el objetivo de calcular la IC<sub>50</sub> que nos confiere información de la concentración a la que se produce la muerte del 50 % de las células presentes en el control negativo, es decir, cuantifica la toxicidad del dextrano oxidado y del naproxeno.

#### 4.2.2 Citotoxicidad mediante ensayo indirecto

A continuación, se empleó el ensayo de MTT con el objetivo de estudiar el efecto de los posibles productos que el biomaterial pueda liberar cuando está en contacto con el medio de cultivo fresco (productos de degradación, etc.) sobre las células en cultivo.

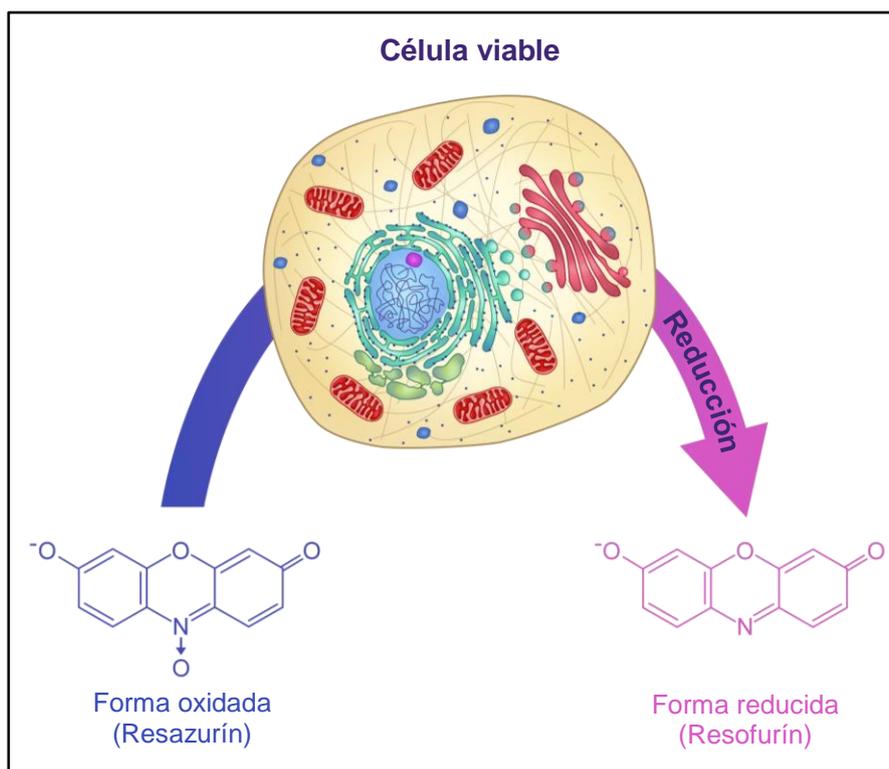
Los reactivos utilizados son los descritos en el apartado 4.2.1 usando discos TMX como control negativo.

Para llevar a cabo este ensayo se prepararon los materiales a estudiar en condiciones estériles (H, H-Nap y H-Dexa) y los discos del control negativo (TMX) se sumergieron en 5 mL de medio fresco y estéril y se mantuvieron en agitación a 37 °C durante distintos intervalos de tiempo. Tras 1, 2, 7, 14 y 21 días se retiró este medio, que denominamos “lixiviado” y se repuso con medio fresco. Una vez obtenidos los lixiviados a los diferentes tiempos, se procedió a realizar la siembra de las células (condrocitos y osteoblastos) ( $d = 11 \cdot 10^4$  células/mL) en una placa de 96 pocillos en medio de cultivo completo. Una de las columnas se dejó libre y se utilizó como blanco. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 h, y posteriormente el medio de cultivo se reemplazó por los lixiviados durante otras 24 h en las mismas condiciones.

Tras retirar los lixiviados de los pocillos, se añadieron 100 µL por pocillo de una dilución al 10 % en medio fresco de MTT. Tras incubar a 37 °C al 5 % de CO<sub>2</sub> durante 3 o 4 h, se retiró el MTT y se añadieron 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán. Posteriormente se procedió a la lectura de la absorbancia a 570 nm y al cálculo de la viabilidad celular relativa de la manera descrita en el apartado 4.2.1.

#### 4.3 Proliferación celular utilizando el ensayo *Alamar Blue*

El reactivo *Alamar Blue* (AB) es un indicador redox que cambia de color en respuesta a la reducción química del medio de cultivo que tiene lugar como consecuencia del crecimiento y proliferación de las células, tal y como se muestra en la **Figura 15**. Este reactivo puede ser retirado y reemplazado con medio fresco sin afectar a la supervivencia de las células que constituyen el cultivo, lo que permite monitorizar temporalmente la proliferación celular directamente sobre la superficie de las formulaciones estudiadas (126).



**Figura 15.** La reducción del reactivo *Alamar Blue*, desde su estado oxidado (resazurín) a su estado reducido (resofurín) conlleva un cambio en su color, informando de la viabilidad celular.

#### 4.3.1 Ensayo de Adhesión Celular

Mediante este ensayo se analizó y cuantificó la proliferación celular de osteoblastos y condrocitos sembrados sobre la superficie del control negativo TMX y los hidrogeles (H, H-Nap y H-Dexa) a los 2, 7 y 14 días.

En primer lugar se realizó la siembra de las células sobre los geles a una concentración de  $14 \cdot 10^4$  células/mL en medio de cultivo completo fresco y en un placa de 24 pocillos (1 mL de suspensión de células por pocillo) incubándose a 37 °C durante 24 h. Transcurridos los intervalos de tiempo establecidos se retiró el medio de los pocillos y se añadió 1 mL de una disolución al 10 % de AB (Serotec, BUF012A) en medio completo, manteniéndolo en contacto con los cultivos durante 4 h. Posteriormente se retiró el AB y se trasvasó el contenido de cada pocillo a una placa de 96 pocillos, reponiendo medio completo fresco. Por último, se realizó una lectura de la fluorescencia (570/630 em/ex) por cada tiempo ensayado mediante un espectrofotómetro Biotek Synergy HT. A los valores de fluorescencia obtenidos se les restaron los valores medidos para el blanco para obtener la proliferación celular.

Este protocolo se realizó a 2, 7 y 14 días, lo que permitió obtener información acerca de la adhesión celular y, por tanto, la proliferación celular sobre la superficie del control

TMX y sobre la superficie de los correspondientes hidrogeles.

## 5. Experimentación *in vivo* de las formulaciones inyectables

En esta fase se evaluó la biocompatibilidad y la capacidad de regeneración de los hidrogeles de ácido hialurónico en un modelo experimental de osteoartritis inducida por colagenasa en el animal de experimentación.

La evaluación de la biocompatibilidad *in vivo* de los hidrogeles de AH se realizó según la Norma ISO (10993) teniendo en cuenta los efectos patológicos locales que puedan ocasionar en los tejidos vivos, tanto a nivel macroscópico como microscópico.

### 5.1 El animal de experimentación

El animal de experimentación seleccionado fue el conejo blanco de la raza Nueva Zelanda. Los criterios establecidos para su selección fueron, entre otros, su bajo coste y fácil provisión, su alto nivel inmunitario, su elevado metabolismo óseo, su docilidad y su estructura esquelética adecuada además de la similitud anatómica de la articulación de la rodilla respecto a la del ser humano. Además, a diferencia de la gruesa piel de sus cuerpos, las orejas presentan una piel más fina y un pelo más corto, pudiendo localizarse fácilmente en esta zona vasos sanguíneos superficiales, lo que facilita la obtención de muestras de sangre y la administración de medicación. Sin embargo, una de las principales desventajas de estos animales es su elevada sensibilidad a los anestésicos generales presentando reacciones muy variables, por lo que en nuestro estudio se empleó un protocolo anestésico adaptado a esta raza.

Los ensayos de experimentación *in vivo* se realizaron en el Animalario del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca (USAL). Se utilizaron un total de 8 conejos adultos jóvenes machos de peso medio de 3,86 kg, y una edad de 10 meses al comienzo del estudio. Fueron solicitados al centro de cría con al menos 15 días de antelación para garantizar el cumplimiento del periodo de aclimatación antes de someterlos a procedimiento alguno.

Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con las directrices nacionales y se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación española (RD 53/2013) y las normas internacionales sobre el bienestar animal definidas en la Directiva Europea (2010/63/EU). Además, los protocolos quirúrgicos fueron aprobados por el Comité Ético de la USAL.

Durante el estudio, los animales permanecieron estabulados en el animalario en condiciones de aislamiento, en jaulas individuales y bajo control de las variables ambientales: temperatura comprendida entre 15 °C y 21 °C, una humedad relativa de aire del  $55 \pm 10$  % e iluminación con fotoperiodo de 12 h/12 h de luz/oscuridad. Fueron alimentados con una dieta completa de mantenimiento para conejo y durante el período de adaptación y postoperatorio, se les permitió comer y beber *ad libitum*.

### 5.2 Modelo experimental de osteoartrosis

Con el objetivo de estudiar el comportamiento *in vivo* de los hidrogeles inyectables diseñados en la primera fase, se realizó un patrón artificial de osteoartrosis en las rodillas de conejos de la raza Nueva Zelanda. A continuación, se detalla la formación del modelo de OA y los distintos grupos de trabajo.

#### 5.2.1 Creación de la lesión de osteoartrosis

El objetivo de esta fase fue la puesta a punto de un modelo experimental de osteoartrosis en rodilla de conejo inducida por la infiltración intraarticular de colagenasa tipo II (de *Clostridium histolyticum* tipo II, enzima activa 425 U/mg, Sigma-Aldrich) a una concentración de 4 mg/mL disuelta en una solución tamponada PBS, pH 7,4 y estéril. Inicialmente se realizaron 2 infiltraciones de 0,3 mL de colagenasa el día "0" y el día "3". Tras 3 semanas de estudio, se realizó la eutanasia a un animal, con el objetivo de valorar macroscópicamente el estado del cartílago articular. En el resto de los animales se realizó una tercera y última infiltración de colagenasa a la tercera semana, con el fin de obtener una OA bien establecida e instaurada. Todas las infiltraciones se llevaron a cabo mediante el uso de aguja de calibre 21G y se realizaron a nivel de la interlínea fémoro-tibial medial.

#### 5.2.2 Formulaciones y grupos de estudio

Se llevó a cabo el estudio *in vivo* en un total de 8 conejos (16 rodillas) creándose los siguientes grupos de trabajo.

- **Grupo I:** grupo control mediante la infiltración de PBS en rodillas sanas, sin osteoartrosis. Este grupo de trabajo está formado por un total de 6 rodillas.
- **Grupo II:** formación de OA mediante 2 infiltraciones de colagenasa obteniéndose un patrón inicial de osteoartrosis. Este grupo está formado por 1 rodilla.

- **Grupo III:** creación de OA mediante 3 infiltraciones de colagenasa obteniéndose un patrón establecido de osteoartrosis. Este grupo se encuentra formado por 1 rodilla.
- **Grupo IV:** grupo con OA creada tras la administración de 3 infiltraciones de colagenasa al que se infiltra PBS como tratamiento, es decir, en este grupo se dejó evolucionar de manera natural la osteoartrosis con el objetivo de valorar la capacidad reparativa del cartílago en el caso de que la tuviera. Este grupo está formado por 2 rodillas.
- **Grupo V:** OA creada mediante 3 infiltraciones de colagenasa tratada con H-Nap. Se encuentra formado por 2 rodillas.
- **Grupo VI:** OA formada tras 3 infiltraciones de colagenasa y tratada con H-Dexa. Grupo formado por 2 rodillas.

Tras la infiltración de 2 dosis de colagenasa, hubo que sacrificar un animal debido a que no presentaba movilidad de las patas traseras, y aunque no presentaba dolor, no fue posible mantenerlo en el estudio.

En la **Tabla 3** se muestran los distintos grupos de trabajo, así como el número de rodillas tratadas en cada uno de ellos.

**Tabla 3.** Grupos de trabajo ensayados *in vivo* en función de la formación de osteoartrosis y del tratamiento dado en cada caso. (PBS: tampón fosfato salino, H-Nap: hidrogel con naproxeno, H-Dexa: hidrogel con dexametasona).

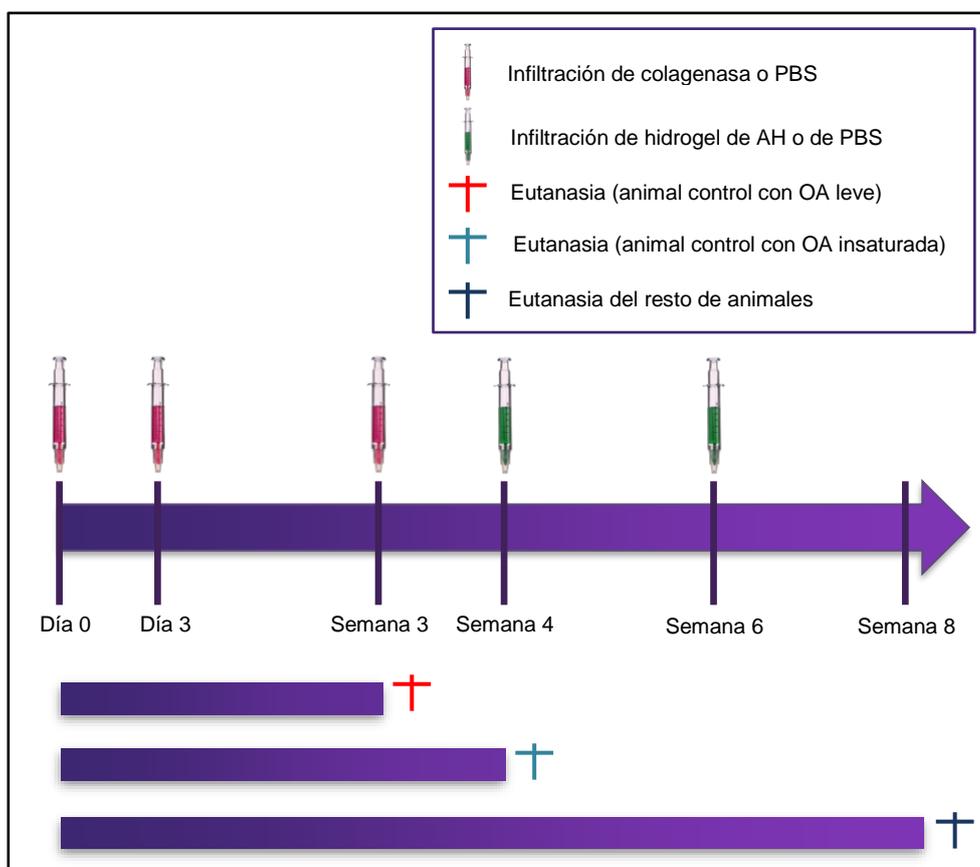
	Nº INFILTRACIONES de COLAGENASA	TRATAMIENTO			Nº de RODILLAS
		PBS	H-Nap	H- Dexa	
I	0	Sí	-	-	6
II	2	-	-	-	1
III	3	-	-	-	1
IV	3	Sí	-	-	2
V	3	-	Sí	-	2
VI	3	-	-	Sí	2

### Tiempos de inyección

El día en el que se realizó la primera infiltración de colagenasa o de PBS se consideró como “día 0”, procedimiento que se repitió el “día 3”. A las 3 semanas, se realizó la eutanasia de un animal (grupo II) para valorar, macroscópicamente, el nivel de osteoartrosis. Con el fin de obtener un patrón claro de OA, se realizó una tercera

infiltración de PBS o de colagenasa a la tercera semana en el resto de los grupos a estudio (grupos III al VI). Posteriormente, a las 4 semanas del “día 0” se procedió a realizar la eutanasia de un animal para valorar el grado de OA obtenido tras 3 infiltraciones con colagenasa, y se procedió a realizar la infiltración con PBS o el tratamiento en estudio en el resto de los animales. Dicho esquema de infiltración se repitió a las 6 semanas, realizándose la eutanasia del resto de los animales a las 8 semanas del “día 0”.

En la **Figura 16** se muestra la línea del tiempo del procedimiento desde el “día 0” hasta la semana 8.



**Figura 16.** Línea del tiempo mostrando el periodo en el que se realizan las distintas infiltraciones y la eutanasia de los animales.

### 5.3 Procedimiento quirúrgico

Las infiltraciones se realizaron con el animal sedado y anestesiado según los protocolos normalizados de trabajo del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca. En primer lugar, se realizó la pre-anestesia con midazolam vía intramuscular con una dosis de 1 – 2 mg/kg a una concentración de 5 mg/mL, procediéndose posteriormente a la inducción anestésica con isoflurano (vía inhalatoria)

a una concentración de 100 % y una dosis de 3,5 mg/kg. Dada la rapidez de la infiltración, la inducción anestésica fue suficiente para realizar el procedimiento, excepto en un animal que fue necesario anestésiar con ketamina y medetomidina por vía intramuscular, con una dosis de 25 mg/kg y a una concentración de 100 mg/mL.

A continuación, se realizó el rasurado de las rodillas con maquinilla eléctrica, y posteriormente se aplicó clorhexidina alcohólica de uso externo para la desinfección.

La infiltración intraarticular se realizó mediante una jeringa de 1 mL con aguja de calibre 21G entre la interlínea fémoro-tibial medial de la rodilla, con las siguientes dosis:

- 0,3 mL de colagenasa (para la formación de OA) o de PBS (grupo control).
- 0,6 mL de tratamiento en función del grupo de estudio (PBS, H-Nap o H-Dexa).

Antes de realizar la infiltración de hidrogel fue necesario calentar el mismo con un secador hasta observar el deslizamiento del hidrogel por el eppendorf. A continuación, se procedió a la mezcla con el naproxeno o la dexametasona mediante el uso de una micropipeta, esperando 25 min antes de realizar la infiltración.

Durante el postoperatorio inmediato todos los animales estuvieron con manta eléctrica para prevenir la hipotermia y bajo control y observación del dolor en tratamiento con tramadol por vía subcutánea a dosis de 2,5 mg/kg cada 12 h y una concentración de 50 mg/mL, y se administró profilaxis antibiótica con enrofloxacino 5 mg cada 12 h vía subcutánea.

### **5.4 Eutanasia y recogida de las muestras**

Todos los conejos fueron sacrificados con una dosis de pentobarbital sódico (120 mg/kg) administrada por venopunción en la vena marginal de la oreja. Una vez confirmada la muerte del animal, con ayuda de un bisturí con hoja número 15, se procedió a la disección de la rodilla y liberación de los tejidos blandos periarticulares, realizándose una artrotomía para-rotuliana medial para exponer la articulación. Posteriormente, con ayuda de una sierra metálica, se realizó una osteotomía femoral a nivel metafisario distal, con sección de los ligamentos laterales y los ligamentos cruzados para liberar el extremo distal del fémur.

Las piezas óseas obtenidas fueron fotografiadas y fijadas en paraformaldehído al 4 % debidamente identificadas con el código del animal y lateralidad, y fueron enviadas al

Departamento de Anatomía e Histología Humana de la Universidad de Salamanca para su procesamiento.

### 5.5 Análisis macroscópico de las muestras

Se realizó un análisis visual del grado de osteoartrosis obtenido tras la infiltración con colagenasa así como de la reparación de las lesiones osteocondrales a nivel macroscópico siguiendo la Escala de Yosioka (127) que evalúa el estado de la superficie articular a nivel morfológico, tal y como se muestra en la **Tabla 4**. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Sony, modelo DSCW800B.

**Tabla 4.** Escala de Yosioka de la osteoartrosis: evaluación macroscópica del cartílago articular.

GRADO	DESCRIPCIÓN
1	Superficie articular intacta
2	Mínima fibrilación
3	Fibrilación evidente
4	Erosión con exposición de hueso subcondral

### 5.6 Procesamiento biológico de las muestras

Para el procesamiento de las muestras óseas estas fueron descalcificadas con el reactivo DC3 durante 48 h. A continuación, fueron procesadas y re-talladas para ser incluidas en parafina y realizar los cortes de 10 micras correspondientes.

El protocolo de inclusión en parafina comienza eliminando los restos de descalcificador mediante un aclarado en agua. A continuación, las muestras se pasan por una batería de alcoholes de concentración creciente (desde 70 a 100°) durante 5 min en cada uno de ellos y posteriormente se mantienen en contacto con tolueno. Por último, se incluyen en parafina durante 12 h en una estufa a 62 °C (temperatura a la cual se produce la fusión de la parafina).

Una vez que las muestras fueron incluidas en parafina, se realizaron las tinciones de hematoxilina/eosina (para la tinción de los componentes celulares), Safranina-O/verde rápido (para la tinción de los componentes de la matriz extracelular) y se llevó a cabo el estudio inmunohistoquímico con el objetivo de detectar colágeno tipo II.

El protocolo de tinción de la Hematoxilina/Eosina (H/E) consiste en pasar las muestras por 4 xiloles durante 5 min y a continuación por una batería de alcoholes a concentración decreciente. Posteriormente se lavan y se tiñen con Hematoxilina de

Carazzi durante 5 min, y tras otro lavado, se tiñen con Eosina G 1 % durante 15 min. Por último, se realiza un paso por Carboxilol al 10 % durante 5 min tras el cual se colocan las preparaciones en un cubreobjetos y se dejan secar.

El protocolo de tinción de Safranina-O/verde rápido (SO/V) es muy similar al anterior, difiriendo en el uso de Safranina-O al 1,5 % durante 1 h, y tras el lavado, se emplea verde rápido al 0,02 % durante 30 segundos.

Para llevar a cabo el estudio inmunohistoquímico frente a colágeno tipo II los cortes histológicos se sometieron a un protocolo que incluyó la incubación con anticuerpo monoclonal frente a colágeno tipo II (*mouse* mAb II.4C11, Calbiochem) y revelado con el kit Vectastain siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Una vez desparafinados, los cortes histológicos fueron sometidos a una incubación con calor sumergidos en tampón de citrato 10 mM durante 1 min para la recuperación antigénica. A continuación, las secciones se lavaron con PBS durante 5 min y fueron expuestas a la acción de peróxido de hidrógeno al 30 % durante 30 min con el objetivo de bloquear la acción de la peroxidasa endógena. Tras el lavado con PBS y la incubación con suero bloqueante, las muestras se marcaron con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal frente a colágeno tipo II) mediante incubación a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente se añadieron, secuencialmente y previo lavado con PBS, el anticuerpo secundario biotinilado, el complejo estreptavidina/HRP y el cromógeno diaminobenzidina estando expuestas las muestras durante 30 min en cada uno de ellos. A continuación, los núcleos fueron contrastados con Hematoxilina. Por último, los cortes se lavaron con agua, se deshidrataron con soluciones ascendentes de alcohol (90 y 100°) y se aclararon con xilol. Finalmente, las preparaciones histológicas se montaron con medio de montaje DPX. La presencia de colágeno tipo II se detectó por la presencia de depósitos de coloración marrón mediante observación directa con el microscopio óptico. El resto de estructuras se observan de color azul debido al contraste nuclear utilizado con Hematoxilina.

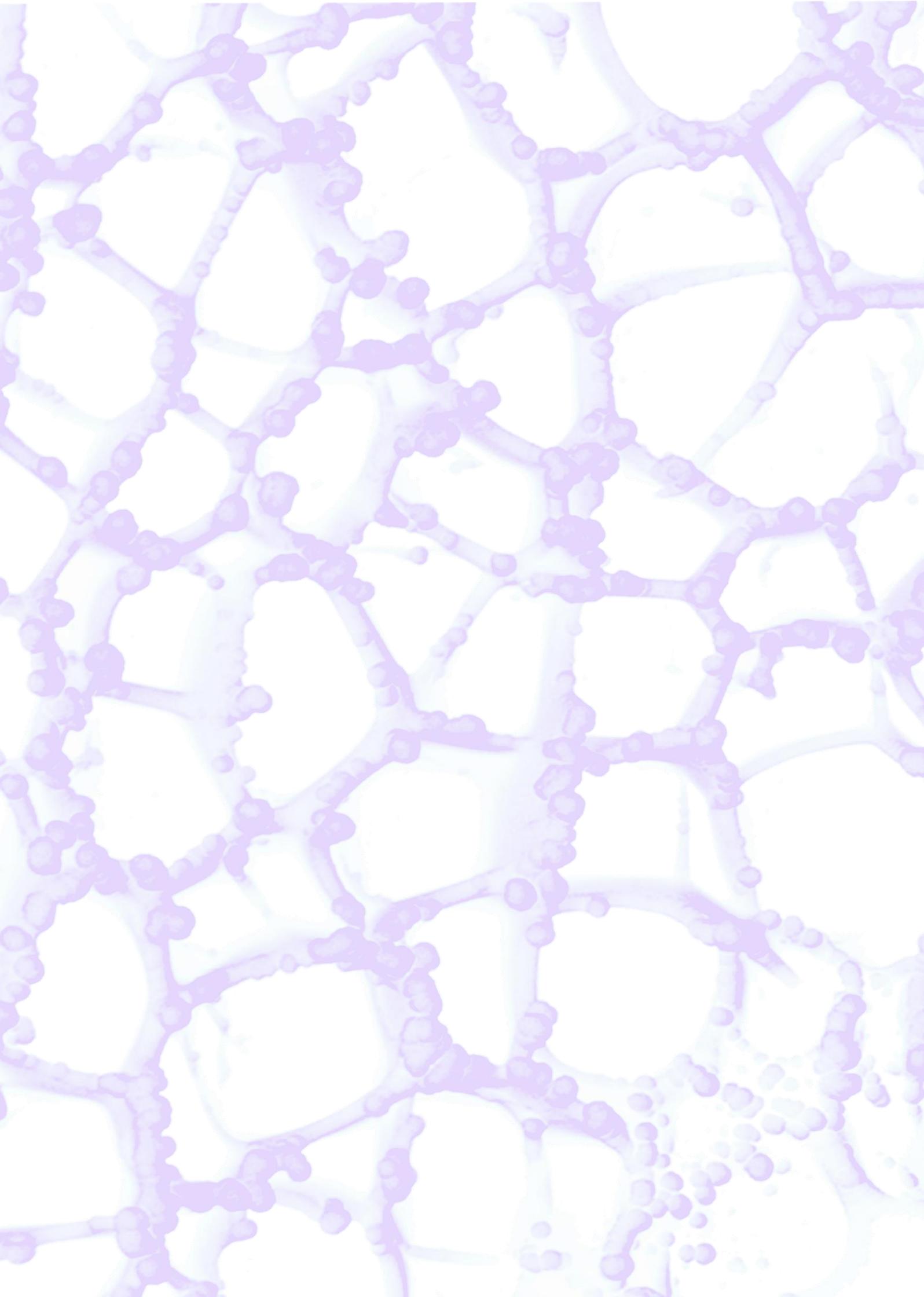
La observación de las muestras se realizó con microscopio óptico de campo claro (Nikon Eclipse 90i) y la captura de imágenes se llevó a cabo mediante una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon digital Sight DS-smc).

## 5.7 Valoración microscópica

En cada grupo experimental se realizó una valoración descriptiva de los cortes histológicos de las lesiones en base a los siguientes parámetros:

- Valoración de la superficie articular:
  - Morfología de la estructura superficial articular.
  - Presencia de tejido conectivo o cartilaginoso (tipo fibroso o hialino), y tipo de MEC.
  - Nivel de celularidad y existencia de condronas hiperplásicas, así como la disposición de los condrocitos.
  - Detección de colágeno tipo II.
- Valoración del hueso subcondral:
  - Presencia y disposición de la *tidemark*, la placa de hueso subcondral y el hueso esponjoso subarticular.
  - La vascularización del hueso subcondral.







# Capítulo 5

## Resultados



Los resultados obtenidos se exponen en función de las diferentes etapas del estudio: el desarrollo de las formulaciones inyectables, el comportamiento de estas formulaciones *in vitro* y la respuesta celular a las mismas y, por último, el comportamiento *in vivo* de los hidrogeles.

## 1. Preparación y caracterización del agente entrecruzante

La oxidación de los dextranos se llevó a cabo utilizando  $\text{NaIO}_4$  como agente oxidante en condiciones suaves. Los dextranos obtenidos se caracterizaron determinando su grado de oxidación y su peso molecular.

Una vez finalizada la reacción de oxidación se purificaron los dextranos oxidados por diálisis para eliminar posibles restos de  $\text{NaIO}_4$  que no hubieran reaccionado. A continuación, para comprobar si la **diálisis** afectaba al peso molecular o al grado de oxidación, se determinaron ambos parámetros para los dextranos de partida (PharmaCosmos) antes y después de ser dializados durante 5 días en agua. La **Tabla 5** muestra los resultados obtenidos en este estudio, donde no se observa una variación significativa del grado de oxidación o del peso molecular por efecto de la diálisis. No obstante, los tres dextranos aumentan muy ligeramente su PM después de la diálisis debido a la liberación de las cadenas de bajo peso molecular que tiene lugar durante el proceso.

**Tabla 5.** Determinación del grado de oxidación (% ox.) y peso molecular (PM) de los dextranos antes y después de dializar. DEX20: dextrano de PM 20 kDa. DEX40: dextrano de PM 40 kDa. DEX70: dextrano de PM 70 kDa. Adh, aldehídos; m, muestra.

	DEX20		DEX40		DEX70	
	% ox. (mol adh/mol m)	PM (kDa)	% ox. (mol adh/mol m)	PM (kDa)	% ox. (mol adh/mol m)	PM (kDa)
De PharmaCosmos	10	23	8	39	7	62
Dializado durante 5 días	9	25	7	40	9	63

A continuación, se llevaron a cabo dos reacciones variando la concentración del agente oxidante. La **Tabla 6** muestra el efecto de la **variación del Ratio  $\text{NaIO}_4$ /Dextrano** en el grado de oxidación del dextrano de distintos pesos moleculares manteniendo constante el medio de reacción. En la primera fila, se incluyen los grados de oxidación de los dextranos sin modificar, es decir, antes de hacerlos reaccionar con  $\text{NaIO}_4$ . Se observa que es posible conseguir diferentes grados de oxidación variando la

relación de  $\text{NaIO}_4$ /Dextrano, de manera que al aumentar la proporción de  $\text{NaIO}_4$  aumenta el porcentaje de oxidación del dextrano. Además, estas reacciones son reproducibles a escala pequeña e independientemente del peso molecular del dextrano empleado para reacciones realizadas a una escala de 250 mg de dextrano. Con respecto al escalado de la reacción, posteriormente se realizó una reacción con 3 gr de DEX70 y una ratio de  $\text{NaIO}_4$ /Dextrano (mol/mol) de 0,30, consiguiéndose grados de oxidación comparables a los obtenidos a pequeña escala.

**Tabla 6.** Variación del grado de oxidación (% ox.) de dextranos de distintos pesos moleculares en función de la ratio  $\text{NaIO}_4$ /Dextrano.

	Medio de reacción	Ratio $\text{NaIO}_4$ /Dextrano (mol/mol)	% ox. (mol adh/mol m)		
			DEX20	DEX40	DEX70
De PharmaCosmos	-	-	10	8	7
Dextranos oxidados	Agua	0,15	25	20	20
	Agua	0,30	37	41	41

Los dextranos oxidados también se caracterizaron en base a su peso molecular determinado por GPC. En la **Tabla 7** se representan los resultados obtenidos de los pesos moleculares de los dextranos en función del grado de oxidación, donde se observa que se produce un descenso del peso molecular de las cadenas de dextrano al aumentar el grado de oxidación, que fue mucho más acusado en el dextrano de mayor peso molecular, DEX70. En la primera fila de la **Tabla 7** se muestran los pesos moleculares de los dextranos sin modificar, es decir, antes del proceso de oxidación.

**Tabla 7.** Variación de peso molecular (PM) de dextranos en función de la ratio  $\text{NaIO}_4$ /Dextrano.

	Medio de reacción	Ratio $\text{NaIO}_4$ /Dextrano (mol/mol)	PM (kDa)		
			DEX20	DEX40	DEX70
De PharmaCosmos	-	-	23	39	62
Dextranos oxidados	Agua	0,15	23	35	49
	Agua	0,30	22	33	40

## 2. Desarrollo de las formulaciones inyectables

La elección del mejor sistema se llevó a cabo a partir de los resultados obtenidos en los estudios del tiempo de inyección, la toxicidad del medio de reacción y en relación con la posible influencia del peso molecular del ácido hialurónico en el tiempo de gelificación de la formulación.

## 2.1 Estudio del tiempo de inyección

Con el objetivo de evaluar el tiempo de inyección de las formulaciones, se midió el tiempo de gelificación de la gelatina en función del peso molecular y el grado de oxidación del dextrano oxidado. Se mantuvieron constantes el medio de reacción, la proporción de DEX-ox/Gel y la concentración de gelatina en la muestra final.

Los resultados obtenidos en la evaluación del tiempo de gelificación de las formulaciones inyectables se muestran en la **Tabla 8**, observándose que se produce una disminución del tiempo de gelificación en las siguientes situaciones:

- Aumento del grado de oxidación del dextrano.
- Aumento del peso molecular del dextrano.

Según estos resultados, es necesario tener elevados grados de oxidación y altos pesos moleculares para conseguir cortos tiempos de gelificación. Es por tanto importante que las cadenas de dextrano se hidrolicen lo menos posible durante la reacción de oxidación, para que mantengan elevados pesos moleculares.

**Tabla 8.** Tiempos de gelificación de gelatina con dextranos de diferentes grados de oxidación (% ox.) y pesos moleculares, en ausencia de ácido hialurónico.

Medio de reacción	Ratio DEX-ox/Gel	Gelatina en mezcla final (mg/mL)	% ox. DEX-ox	Tiempo de gelificación a 37 °C (min)		
				DEX20-ox	DEX40-ox	DEX70-ox
PB 0,1 M	1/1	50	20	-	60	45
PB 0,1 M	1/1	50	40	30	20	15

A continuación, con el objetivo de valorar el efecto del AH en el tiempo de gelificación se realizó el estudio en presencia de AH de bajo peso molecular (200 kDa). Se varió la relación entre DEX70-ox(40%)/Gel, Gelatina/Ácido Hialurónico (Ratio Gel/AH), la concentración de gelatina y AH en la mezcla final y el medio de reacción (en el que se redujo 10 veces la concentración del tampón fosfato de pH = 7,4 de 0,1 M a 0,01 M). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 9**.

Se observa que, en presencia de ácido hialurónico, las reacciones de gelificación tienen lugar también en pocos minutos, observándose los siguientes efectos:

- **Variación de la relación DEX70-ox/Gel:** a mayores ratios, menor tiempo de gelificación.

- **Variación de la relación Gel/AH manteniendo constante la concentración final de AH (filas 1, 2 y 3):** a menores relaciones Gel/AH (menor concentración de gelatina en la mezcla final), mayor es el tiempo de gelificación.
- **Variación de la concentración de gelatina en la mezcla final manteniendo constante la relación Gel/AH (filas 3 y 4):** a mayores concentraciones de gelatina, menores tiempos de gelificación.
- **Variación de la relación Gel/AH manteniendo concentraciones de gelatina en la mezcla final similares (filas 2 y 4):** la relación Gel/AH parece no tener un efecto significativo en el tiempo de gelificación. Parece que influye más la pequeña diferencia de concentración de gelatina (ligeramente menor en la fila 4 que en la 2 (37,5 frente a 40 mg/mL)) que resulta en un tiempo de gelificación ligeramente mayor (35 min para la fila 4 frente a 30 min en la fila 2).

**Tabla 9.** Variación de los tiempos de gelificación de la gelatina con DEX70-ox(40%) en presencia de ácido hialurónico de peso molecular 200 kDa.

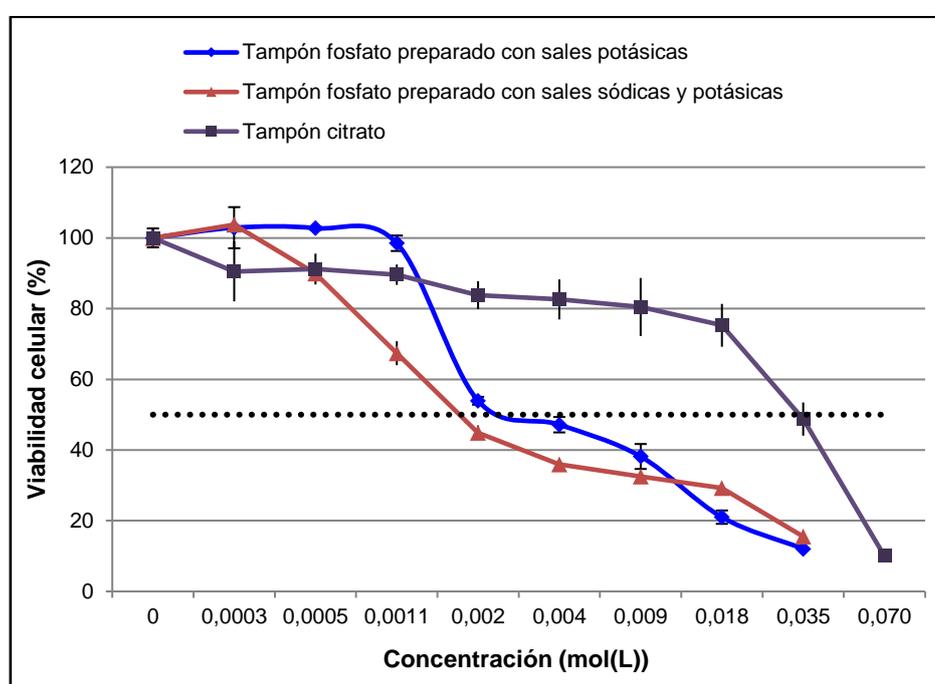
	Medio de reacción	Ratio Gel/AH	Gelatina en mezcla final (mg/mL)	AH en mezcla final (mg/mL)	Tiempo de Gelificación a 37 °C (min)		
					Ratio DEX70-ox(40%)/Gel		
					1/1	0,75/1	0,5/1
1	PB 0,1M	53/47	50	45	20	30	> 60
2	PB 0,1M	47/53	40	45	30	60	> 60
3	PB 0,1M	40/60	30	45	> 60	> 60	> 60
4	PB 0,1M	40/60	37,5	56	35	50	> 60

Por tanto, para obtener un **tiempo de gelificación óptimo** son necesarios los siguientes parámetros:

- Peso molecular del Dextrano: 70 kDa (DEX70).
- Grado de oxidación del dextrano: 40 % (DEX70-ox(40%)).
- Relación Gel/DEX70-ox(40%): 1/1.
- Concentración de gelatina en la mezcla final: 50 mg/mL.
- Medio de reacción a pH = 7,4: Tampón fosfato 0,1M.

## 2.2 Medio de reacción

Con el objetivo de determinar el medio de reacción más idóneo, se realizaron ensayos de citotoxicidad de los distintos tampones (tampón fosfato con sales potásicas, tampón fosfato con sales sódicas y potásicas, y tampón citrato) tras la incubación de fibroblastos durante 24 h a 37 °C. Seguidamente se determinó la viabilidad celular y se calculó la IC<sub>50</sub>. Los resultados de este ensayo se representan en la **Figura 17**, donde se observa que los dos tampones fosfato presentan viabilidades celulares aceptables (entre 100 y 70 %) en concentraciones menores o iguales a 0,025 M. El tampón citrato presenta buena viabilidad celular (cercana al 80 %) a concentraciones de 0,018 M o menores.



**Figura 17.** Viabilidad celular de fibroblastos a diferentes concentraciones de los tres tampones de pH = 7,4 ensayados. Se representa la media y la desviación estándar de los datos.

Posteriormente, se valoró el tiempo de gelificación de las formulaciones (en ausencia de AH) en función de los distintos medios de reacción en condiciones no citotóxicas, ya que la concentración del tampón se eligió en función de los resultados de viabilidad celular obtenidos en la **Figura 17**. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 10**.

Se observó un aumento del tiempo de gelificación en el tampón citrato (50 min). Sin embargo, la gelificación en tampón fosfato 0,025 M tuvo lugar en menos de media hora, tanto para el preparado a partir de sales potásicas como el preparado a partir de sales sódicas y potásicas. Por tanto, se consideró que el medio más adecuado para el

desarrollo de las formulaciones era el tampón fosfato 0,025 M preparado a partir de sales sódicas y potásicas ya que contiene mayor variedad de iones, y aunque los iones sodio y potasio estén presentes en bajas concentraciones comparado con el PBS 0,01 M, se consiguen tiempos de gelificación adecuados, presentando además una viabilidad celular cercana al 70 %.

**Tabla 10.** Tiempos de gelificación de los diferentes tampones de pH = 7,4 (tampón fosfato con sales potásicas, tampón fosfato con sales sódicas y potásicas, y tampón citrato).

Tampón pH 7,4	Concentración (M)	Tiempo de Gelificación a 37 °C (min)
Fosfato (sales potásicas)	0,025	25
Fosfato (sales sódicas y potásicas)	0,025	23
Citrato	0,015	50

### 2.3 Peso molecular del ácido hialurónico

Se evaluó la influencia del peso molecular del AH en el tiempo de gelificación de las formulaciones inyectables.

La **Tabla 11** muestra la composición y los tiempos de gelificación obtenidos en presencia de AH de distintos pesos moleculares, manteniendo constante la proporción de gelatina presente en la mezcla final.

Las tres formulaciones preparadas presentaron tiempos de gelificación similares entre sí, probablemente porque se ajustaron las concentraciones de cada AH para mantener viscosidades parecidas, de tal manera que al aumentar el peso molecular del AH empleado se redujo la proporción del mismo en la formulación (47 %, 29 % y 23 % para AH de bajo, medio y alto peso molecular respectivamente). El tiempo de gelificación aumentó unos 12 min comparado con formulaciones preparadas en ausencia de AH en las mismas condiciones. Probablemente en presencia de AH la gelificación es más lenta debido a la mayor viscosidad del medio.

**Tabla 11.** Tiempos de gelificación de las formulaciones con AH de diferentes pesos moleculares manteniendo constante la viscosidad.

Medio de reacción	PM AH (kDa)	Ratio Gel/AH	Gelatina en mezcla final (mg/mL)	AH en mezcla final (mg/mL)	% de AH en la mezcla	Tiempo de gelificación a 37 °C (min)
PB 0,025 M	200	53/47	50	45	47	35
PB 0,025 M	800-1000	71/29	50	20	29	35
PB 0,025 M	> 1000	77/23	50	15	23	35

Ya que el ácido hialurónico presente en la rodilla es de muy alto peso molecular (6000-10.000 kDa) (128) es razonable incluir AH de medio o alto peso molecular en la formulación. Se eligió por tanto el AH de peso molecular medio (800 – 1000 kDa), para poder incorporar una mayor cantidad del mismo sin comprometer demasiado el aumento de la viscosidad.

A continuación, se realizó un ensayo de inyectabilidad de cada una de las formulaciones en el que no se observó obstrucción de la aguja de calibre 21G en ningún caso.

Con el objetivo de aumentar la proporción final de AH de peso molecular medio en la formulación, se estudió cómo podía afectar en el tiempo de gelificación el aumento de la viscosidad que esto conlleva. Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la **Tabla 12**, observándose que al aumentar la proporción de AH de peso molecular medio de 29 a 35 % se produce un ligero aumento del tiempo de gelificación que se puede atribuir al aumento de la viscosidad del medio.

Por tanto, se seleccionó la proporción de 29 % de AH para la composición de las formulaciones inyectables finales.

**Tabla 12.** Tiempos de gelificación de las formulaciones con AH de peso molecular medio (800 – 1000 kDa) variando la proporción final de AH.

Medio de reacción	Ratio Gel/AH	Gelatina en mezcla final (mg/mL)	AH en mezcla final (mg/mL)	% de AH en la mezcla	Tiempo de gelificación (min)
PB 0,025 M	71/29	50	20	29	40
PB 0,025 M	65/35	50	26	35	45

## 2.4 Incorporación de anti-inflamatorios

Tras la incorporación de naproxeno y dexametasona a las formulaciones, se estudiaron los tiempos de gelificación de las mismas, manteniendo constante la relación Gel/AH y empleando AH de peso molecular medio obteniéndose los resultados mostrados en la **Tabla 13**.

La incorporación de los fármacos aumenta en todos los casos el tiempo de gelificación hasta aproximadamente 1 h. Esto podría ser debido a ligeras variaciones del pH y/o a la presencia de los anti-inflamatorios en el medio de reacción, que actuarían ralentizando la reacción de entrecruzamiento. Sin embargo, una hora puede considerarse un tiempo de gelificación aceptable para las formulaciones inyectables,

llevando a cabo la mezcla de los dos componentes con la necesaria antelación y procediendo a su inyección en el momento en que la reacción de entrecruzamiento esté suficientemente avanzada como para asegurar la permanencia del hidrogel y su estabilidad en el lugar de la lesión osteocondral.

**Tabla 13.** Tiempos de gelificación de las formulaciones con AH de peso molecular medio en presencia de anti-inflamatorios. Nap: naproxeno. Dexa: dexametasona.

Medio de reacción	Peso molecular AH (kDa)	Ratio Gel/AH	Anti-inflamatorio	Dosis (mg/mL)	Tiempo de gelificación a 37 °C (min)
PB 0,025 M	800-1000	71/29	-	-	35
			Nap	6	> 60
			Dexa	6	55

## 2.5 Composición final de las formulaciones inyectables

Las formulaciones inyectables diseñadas en este estudio presentan una estructura de red semi-IPN y permiten la incorporación de fármacos anti-inflamatorios, lo que mejora la biodisponibilidad del fármaco a nivel intraarticular y aumenta su efecto analgésico y anti-inflamatorio local, disminuyendo además sus efectos adversos a nivel sistémico.

Dichas formulaciones inyectables se preparan con la siguiente composición:

- Ratio Gel/DEX70-ox(40%): 1/1.
- Ratio Gel/AH: 71/29.
- Concentración de gelatina en la mezcla final: 50 mg/mL.
- Concentración de AH en la mezcla final: 20 mg/mL.
- Tampón pH = 7,4: PB 0,025 M (sales sódicas y potásicas).
- AH de peso molecular medio: 800 – 1000 kDa.

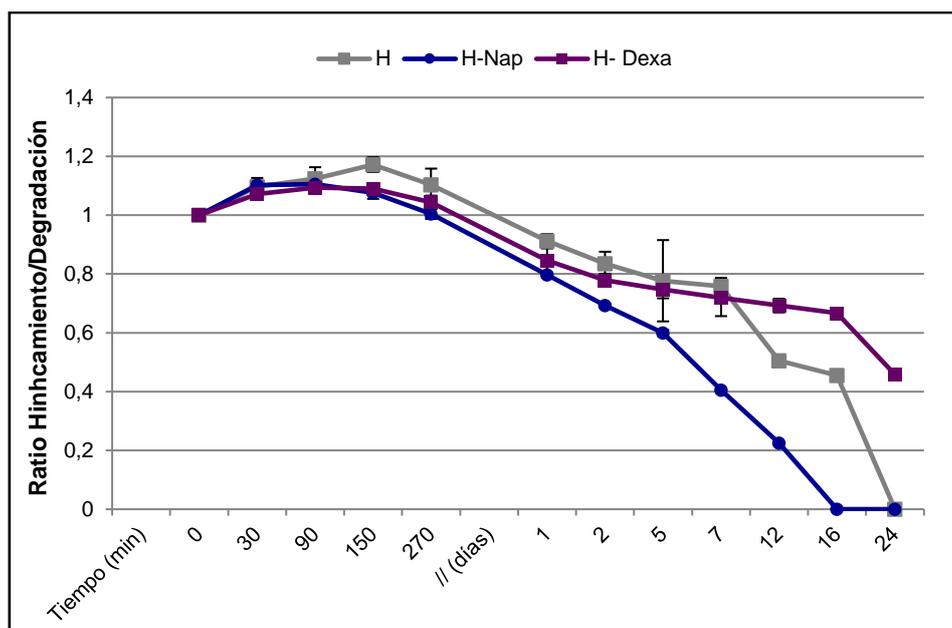
Las formulaciones finales para los distintos grupos de trabajo se muestran en la **Tabla 14.**

**Tabla 14.** Composición de las formulaciones finales inyectables incorporando naproxeno (Nap) o dexametasona (Dexa).

GRUPO	COMPONENTE A				COMPONENTE B		
	Gelatina (mg)	Nap (mg)	Dexa (mg)	Tampón (mL)	AH (mg)	DEX70-ox(40%) (mg)	Tampón (mL)
H	50	-	-	0,5	20	50	0,5
H-Nap	50	6	-	0,5	20	50	0,5
H-Dexa	50	-	6	0,5	20	50	0,5

### 3. Comportamiento *in vitro* de los hidrogeles: hinchamiento y degradación

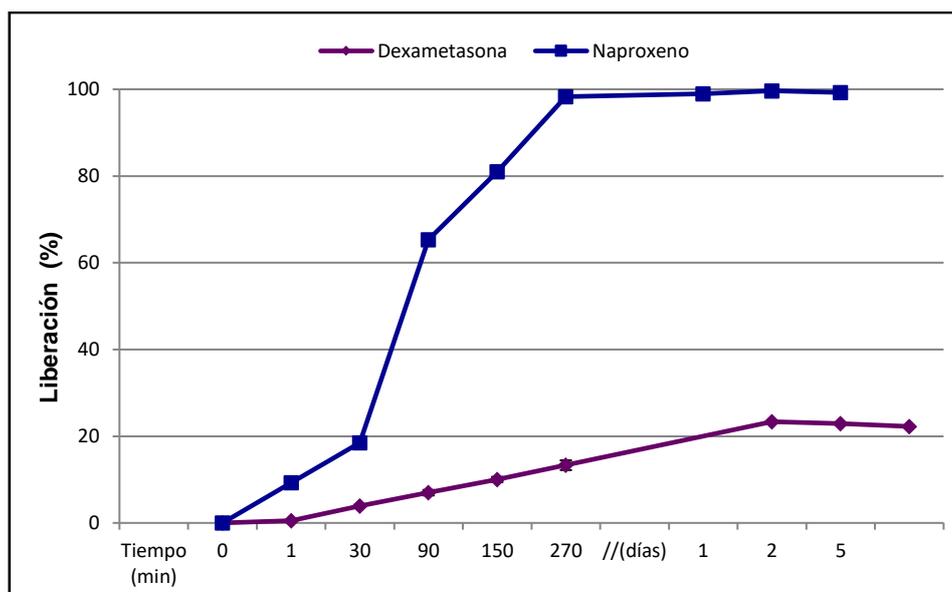
Se evaluó el comportamiento *in vitro* de los hidrogeles sumergiéndolos en solución tampón de pH 7,4 a 37 °C para simular el medio fisiológico. Los resultados se muestran en la **Figura 18**. Se puede observar que en las primeras 4 h se produce una ganancia en peso del hidrogel como consecuencia de la absorción de agua del medio dando lugar a valores máximos de hinchamiento de 1,1 para los hidrogeles con anti-inflamatorios y de 1,2 para el hidrogel sin cargar. Pasado este periodo de tiempo se observó una pérdida de peso como consecuencia de la degradación del propio hidrogel y liberación del fármaco. La pérdida fue más acusada para el hidrogel sin cargar y para el hidrogel cargado con naproxeno (que se degradan a los 14 días del estudio) en comparación a la obtenida con el hidrogel que contenía dexametasona (que se mantiene hasta prácticamente 30 días).



**Figura 18.** Variación de la ratio de hinchamiento/degradación con el tiempo de inmersión de los hidrogeles H, H-Nap y H-Dexa en tampón a pH = 7,4 y 37 °C de temperatura. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de n = 3.

#### 4. Perfiles de liberación *in vitro*

Los perfiles de liberación de los anti-inflamatorios de los correspondientes hidrogeles en un medio tamponado a pH = 7,4 y a 37 °C se muestran en las **Figuras 19 y 20**. Se puede observar que el naproxeno se libera de forma rápida alcanzando la liberación del 100 % del fármaco cargado en un periodo inferior a 24 h. Sin embargo, la liberación de la dexametasona se produce de forma más controlada, obteniéndose una liberación del 22 % del medicamento cargado en un periodo de 1 día, para después estabilizarse en el tiempo. De los resultados obtenidos en este apartado y en el apartado 3, se puede afirmar que la liberación del fármaco y la degradación del hidrogel son dos parámetros íntimamente relacionados, ya que en el caso del hidrogel con naproxeno, la degradación del hidrogel se produce de forma más rápida y por tanto, la liberación del fármaco tiene lugar en un periodo de tiempo de 24 h, mientras que en el caso del hidrogel con dexametasona, el hidrogel es más estable y la degradación del mismo es más lenta, lo que origina que la liberación del medicamento se produzca de una manera más controlada.



**Figura 19.** Liberación de naproxeno correspondiente al hidrogel H-Nap y liberación de dexametasona correspondiente al hidrogel H-Dexa en tampón fosfato (pH = 7,4) y a 37 °C de temperatura. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de  $n = 3$ .

## 5. Respuesta celular *in vitro*

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se determinaron tal como indica la Norma UNE-EN ISO 10993-5 (129).

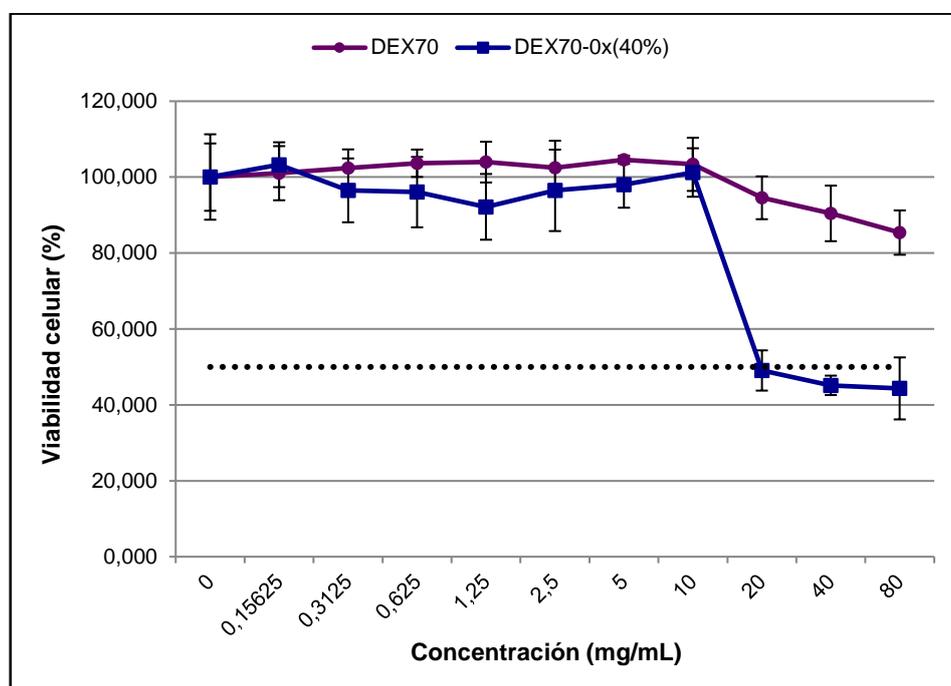
### 5.1 Resultados del ensayo de citotoxicidad: IC<sub>50</sub>

Con el objetivo de evaluar la citotoxicidad del agente entrecruzante y de los anti-inflamatorios empleados en las formulaciones inyectables se realizó el ensayo de citotoxicidad mediante el uso del reactivo MTT que permite valorar la viabilidad celular y calcular la IC<sub>50</sub>.

#### 5.1.1 Toxicidad del agente entrecruzante

Los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular realizados en fibroblastos para evaluar la citotoxicidad del dextrano oxidado se observan en la **Figura 20**. Los datos se comparan con los obtenidos del dextrano de partida, sin oxidar. Se puede observar que el DEX70 presenta una viabilidad celular superior al 80 % incluso a concentraciones de 80 mg/mL. Sin embargo, DEX70-ox(40%) no presenta valores de viabilidad superiores al 80 % hasta que se encuentra a concentraciones iguales o inferiores a 10 mg/mL. Esta diferencia de citotoxicidad es debida a la presencia de

grupos aldehído en el dextrano oxidado. A concentraciones iguales o mayores a 20 mg/mL de dextrano oxidado, la viabilidad celular se acerca al 50 % presentando, por tanto, una IC<sub>50</sub> de 20 mg/mL.

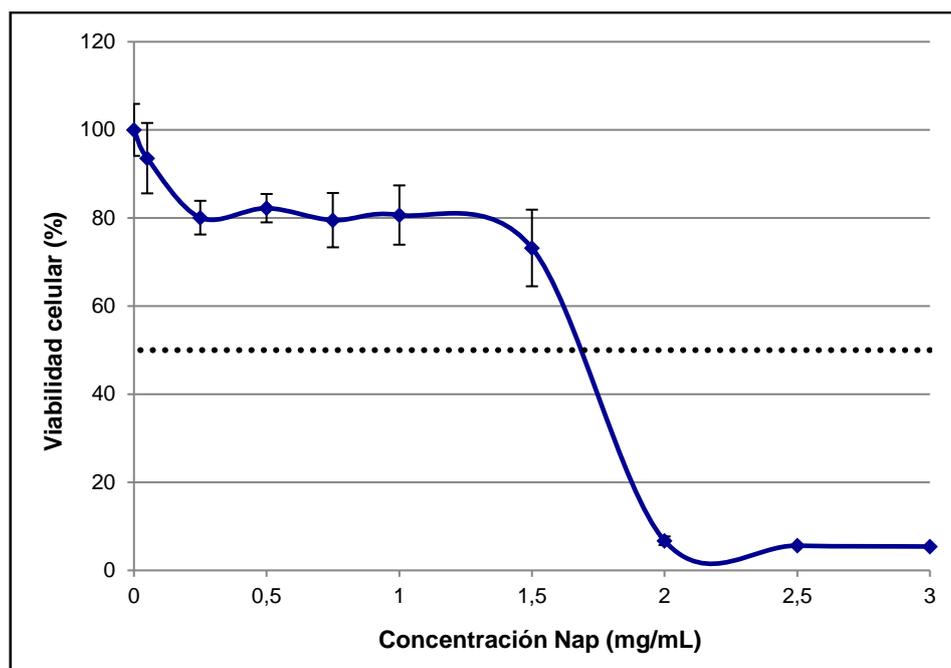


**Figura 20.** Viabilidad celular de fibroblastos en función de la concentración del DEX70 y DEX70-ox(40%). Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de n = 12.

Para la preparación de las formulaciones se partió de concentraciones de DEX70-ox(40%) de un máximo de 50 mg/mL. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la concentración residual de grupos aldehído después de la reacción de entrecruzamiento con la gelatina disminuye notablemente. Por tanto, es de esperar un compromiso de la biocompatibilidad en los hidrogeles inyectables una vez preparada la red semi-interpenetrada. Es importante mencionar que para el ensayo de MTT, las células se mantienen en contacto con los dextranos de partida y oxidados en condiciones estáticas, por tanto, se puede considerar como el peor escenario posible en comparación con la situación *in vivo* donde hay una continua renovación del medio.

### 5.1.2 Toxicidad de los anti-inflamatorios

La evaluación de la citotoxicidad en condrocitos en presencia de naproxeno a distintas concentraciones se muestra en la **Figura 21**. Se observa que a concentraciones de 1 mg/mL de naproxeno o menores la viabilidad de los condrocitos se mantiene en un 80 %, y a mayores concentraciones la viabilidad desciende rápidamente.



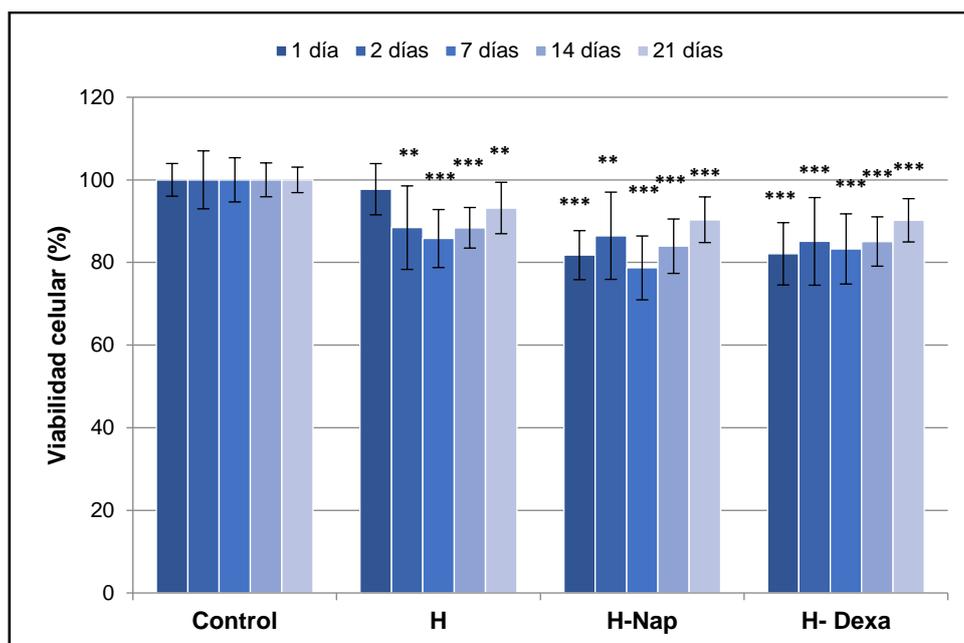
**Figura 21.** Viabilidad celular de condrocitos en presencia de distintas concentraciones de naproxeno. (Nap: naproxeno). Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de  $n = 12$ .

A partir de la gráfica se determinó el valor de  $IC_{50}$  con un intervalo de confianza al 95 %, obteniéndose un resultado de 1,62 mg/mL para el naproxeno en condrocitos.

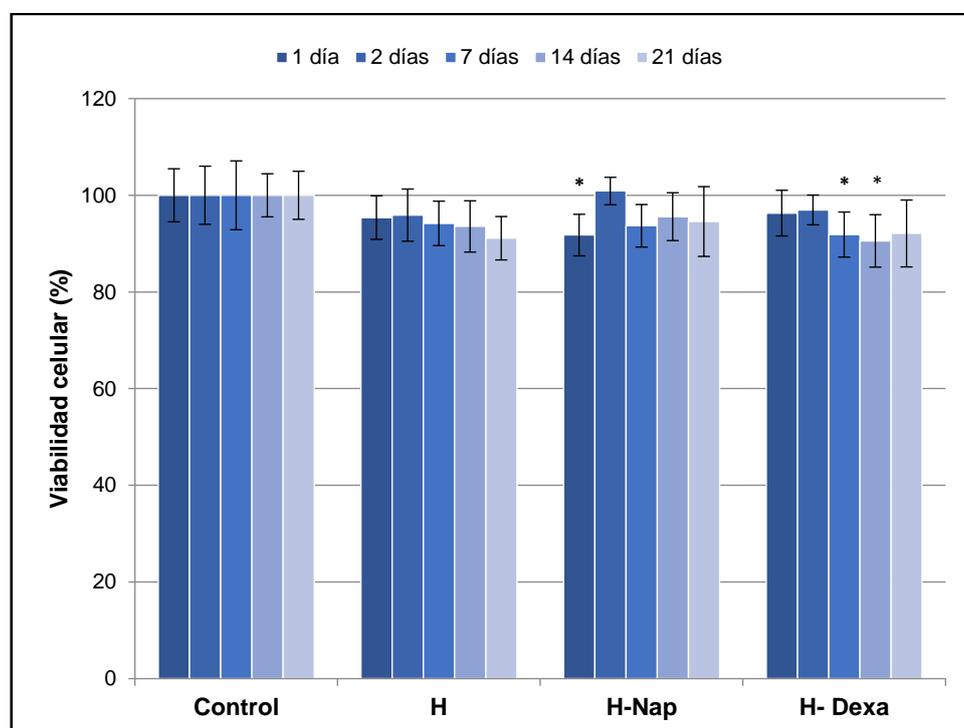
No se pudo realizar el estudio directo de citotoxicidad para la dexametasona aplicando las mismas condiciones que para el naproxeno dado que es muy insoluble y sólo se puede disolver en productos orgánicos que presentan una alta toxicidad celular.

## 5.2 Resultados de la citotoxicidad de los hidrogeles mediante ensayo indirecto

Se empleó el ensayo MTT para estudiar el posible efecto de los lixiviados de los hidrogeles a distintos tiempos en condrocitos y osteoblastos. Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras 22 y 23** respectivamente. Como se puede observar en ambas figuras, los geles no son tóxicos para los condrocitos ni osteoblastos. Se produjo un discreto descenso de la viabilidad celular en el estudio de condrocitos en presencia de los lixiviados de los hidrogeles cargados con fármacos siendo ligeramente mayor en presencia de los de H-Nap tomados a 7 días, pero, en cualquier caso, la viabilidad se recuperó con el tiempo, como se refleja en los resultados obtenidos a 14 y 21 días. Además, cabe destacar que ningún hidrogel se disolvió en el medio de cultivo libre de suero durante los 21 días de toma de lixiviados.



**Figura 22.** Viabilidad celular tras el ensayo MTT para los hidrogeles sin y con fármaco en condrocitos. H: hidrogel sin fármaco, H-Nap: hidrogel con naproxeno, H-Dexa: hidrogel con dexametasona. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de  $n = 16$ . Los datos se han comparado con el control mediante el test ANOVA utilizando la ecuación de Tukey (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

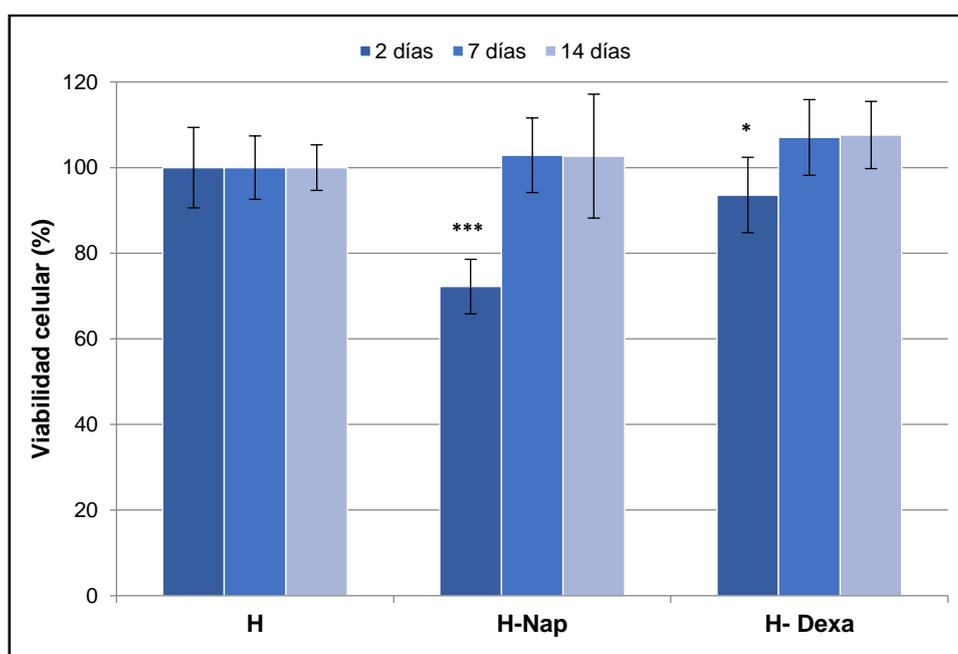


**Figura 23.** Viabilidad celular tras el ensayo MTT para los hidrogeles sin y con fármaco en osteoblastos. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de  $n = 12$ . Los datos se han comparado con el control mediante el test ANOVA utilizando la ecuación de Tukey (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

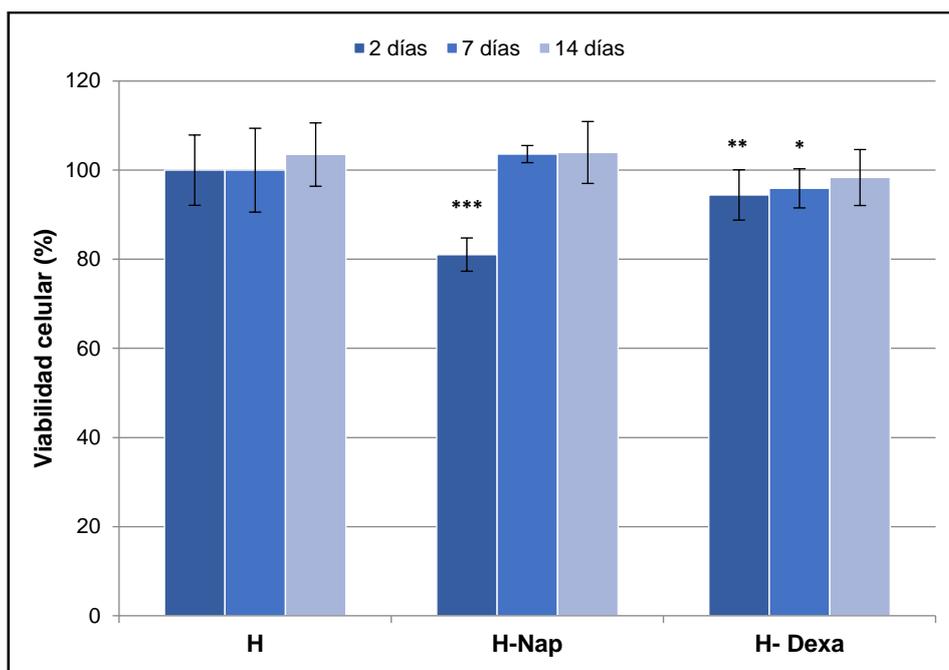
### 5.3 Resultados del estudio de proliferación celular mediante el ensayo de *Alamar Blue*

Se determinó la proliferación y adhesión celular (tanto de condrocitos como osteoblastos) en presencia del hidrogel cargado o no con fármaco mediante el uso de AB en un período máximo de 14 días. No se pudo realizar a 21 días dado que se producía un levantamiento celular debido a que las células colonizaban las muestras llegando a confluencia. Los resultados se muestran en las **Figuras 24 y 25**.

En ambos tipos celulares se observó cómo el hidrogel favorece la adhesión y la proliferación celular manteniéndose en todo el tiempo de estudio en un 100 % de viabilidad celular. Aunque la viabilidad celular en presencia de dexametasona se mantiene cercana al 100 % durante todos los tiempos, se observó que la presencia de naproxeno originaba un descenso de la proliferación celular en las primeras 48 h para después aumentar y estabilizarse en una viabilidad del 100 % hasta el final del estudio.



**Figura 24.** Resultados del ensayo *Alamar Blue* para hidrogeles con y sin fármaco en condrocitos. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de  $n = 32$ . Los datos se han comparado con el control mediante el test ANOVA utilizando la ecuación de Tukey (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Figura 25.** Resultados del ensayo *Alamar Blue* para hidrogeles con y sin fármaco en osteoblastos. Los datos representan el valor medio y su desviación estándar para un conjunto de  $n = 32$ . Los datos se han comparado con el control mediante el test ANOVA utilizando la ecuación de Tukey (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 6. Comportamiento *in vivo* de los hidrogeles

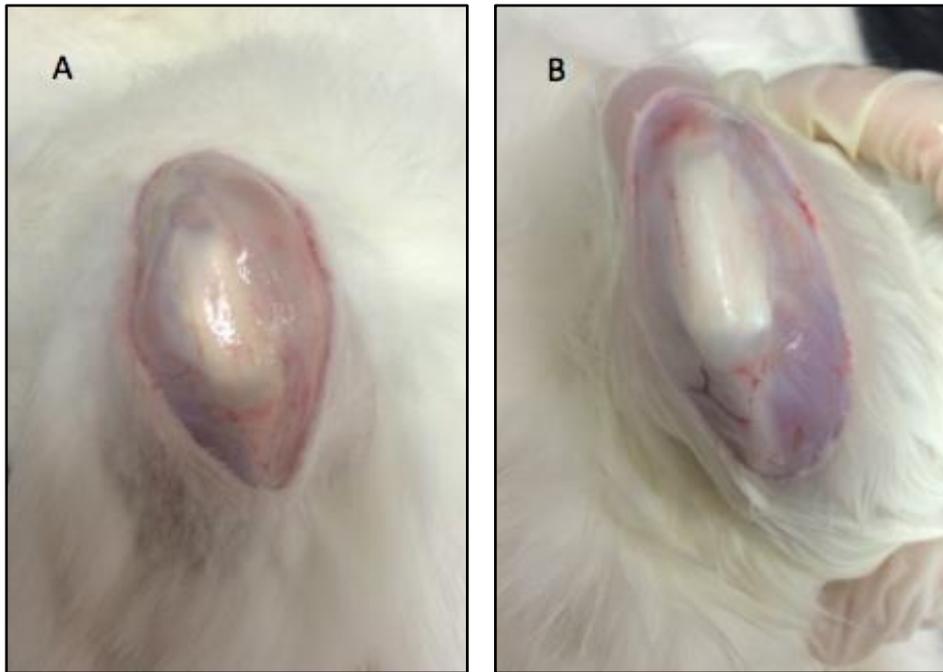
A continuación, se detallan los resultados obtenidos en la creación del modelo de osteoartrosis utilizado en nuestro estudio, y del efecto y comportamiento de los hidrogeles en dicho modelo.

### 6.1 Estudio macroscópico

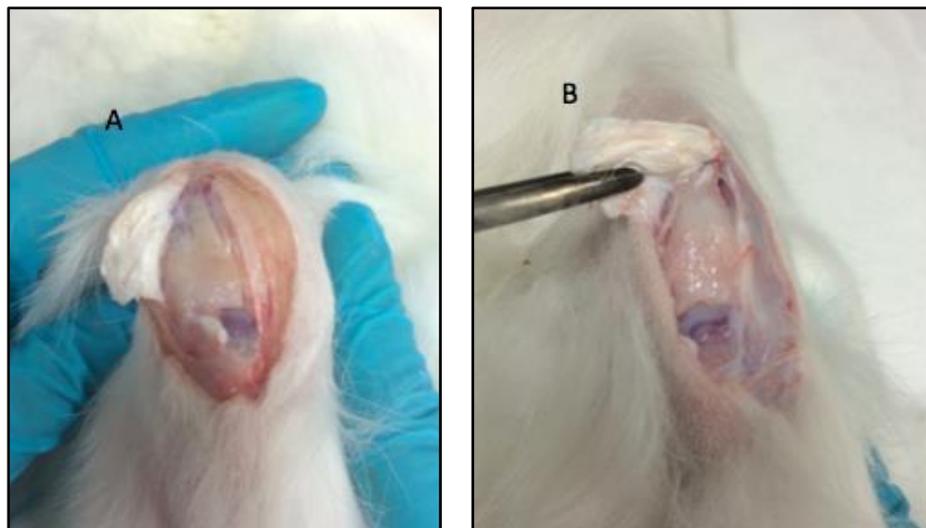
En el estudio macroscópico se valoró el estado externo de las rodillas tras la infiltración, así como el estado del cartílago articular siguiendo la Escala de Yosioka.

#### Resultados de la infiltración de colagenasa: formación del modelo de osteoartrosis (Grupos II y III)

En relación con el estudio macroscópico, las rodillas del grupo II infiltradas con dos dosis de colagenasa, presentaban mayor tumefacción articular, hematoma, así como una cápsula articular y membrana sinovial inflamada y rojiza (hiperémica), mientras que los animales del grupo I (infiltrados con PBS) presentaban un aspecto de la articulación normal, como se puede observar en las **Figuras 26 y 27**.

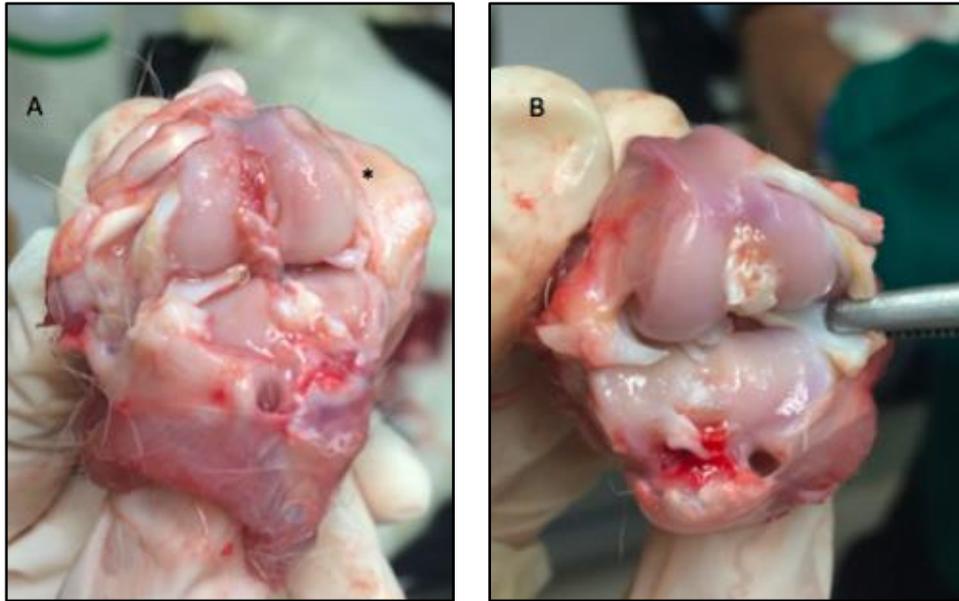


**Figura 26.** (A) Aspecto macroscópico de la cápsula articular del grupo II tras 2 infiltraciones de colagenasa. (B) Aspecto macroscópico de la cápsula articular del grupo I tras infiltración con PBS.



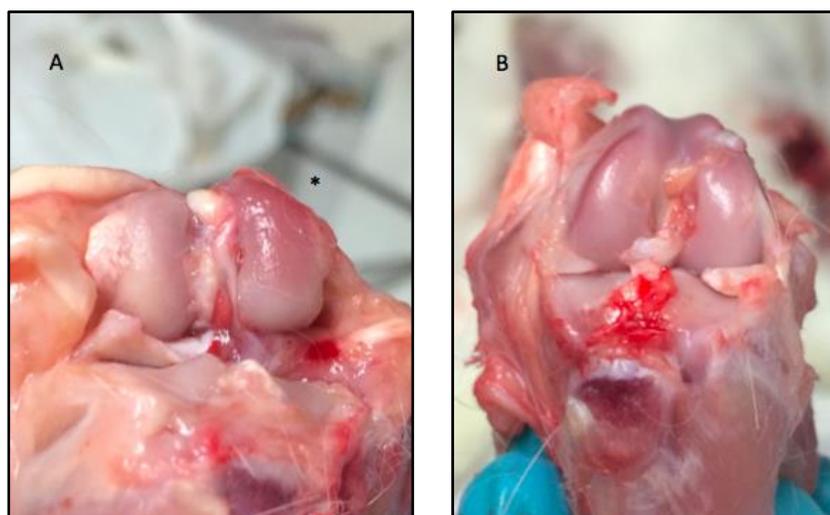
**Figura 27.** (A) Membrana sinovial hipertrófica en el grupo II. (B) Membrana sinovial de características normales en el grupo I.

Atendiendo a la escala de Yosioka en el estudio macroscópico del cartílago articular, las rodillas del grupo II presentaban hemartros y mínima fibrilación articular en el cóndilo femoral interno (Grado 2 de Yosioka). En el grupo control I, el aspecto externo era normal, sin observarse afectación macroscópica del cartílago articular. En la **Figura 28** se pueden observar ambas rodillas.



**Figura 28.** (A) Rodilla del grupo II: se observa fibrilación en el cóndilo femoral interno, presentando un aspecto más eritematoso (\*). (B) Rodilla del grupo I: aspecto macroscópico normal.

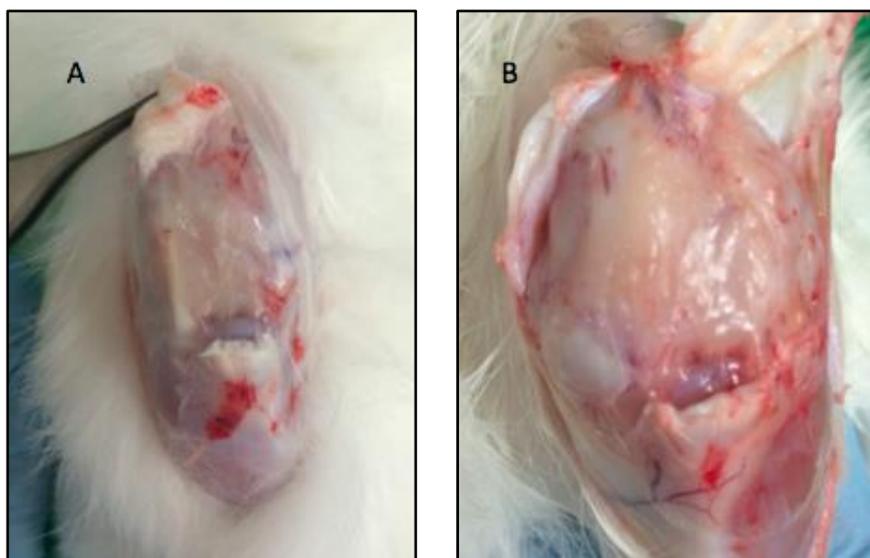
Con el objetivo de confirmar la creación de OA en las rodillas, se realizó una tercera infiltración con colagenasa y se re-evaluó macroscópicamente a la semana, siendo este el grupo III. En este caso también se observó tumefacción capsular, menor proporción de hemartros (en comparación con el grupo II) y lesiones condrales, pero sin llegar a producir exposición ósea en el cóndilo femoral medial, con pérdida del brillo característico del cartílago hialino y una superficie rugosa al tacto (lesión grado 3 de Yosioka), como se puede observar en la **Figura 29**.



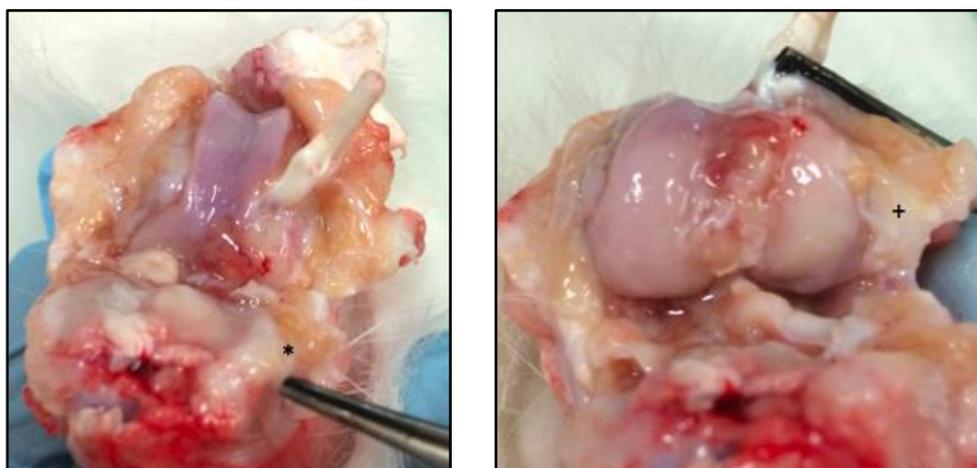
**Figura 29.** (A) Rodilla del grupo III (con 3 infiltraciones de colagenasa): lesión en cóndilo femoral interno (\*) grado 3 de Yosioka. (B) Rodilla del grupo I de aspecto normal.

### Resultados del Grupo IV: OA con 3 infiltraciones de colagenasa e infiltración de PBS como tratamiento

En este caso, se evaluaron los resultados obtenidos tras la formación de osteoartrosis y dejada evolucionar en el tiempo, es decir, sin tratamiento. Se observó mayor hipertrofia de la cápsula articular, con tejidos blandos fibróticos y de mayor consistencia, así como osteofitos en meseta tibial, es decir, se observó mayor afectación macroscópica que en los grupos II y III. Además, el cóndilo femoral externo presentaba un aspecto más irregular, rugoso al tacto y más pétreo, sin clara exposición de hueso subcondral (grado 3 de Yosioka), como se puede observar en las **Figuras 30 y 31**.



**Figura 30.** (A) Rodilla sana (grupo I), con aspecto de la membrana sinovial normal. (B) Rodilla del grupo IV, con progresión de osteoartrosis sin tratamiento con membrana sinovial más congestiva e inflamada y engrosada.



**Figura 31.** Grupo IV: osteofitos en meseta tibial (\*) y lesión condral grado 3 de Yosioka en cóndilo femoral (+).

### Resultados del Grupo V: OA tratada con hidrogel de AH con naproxeno (H-Nap)

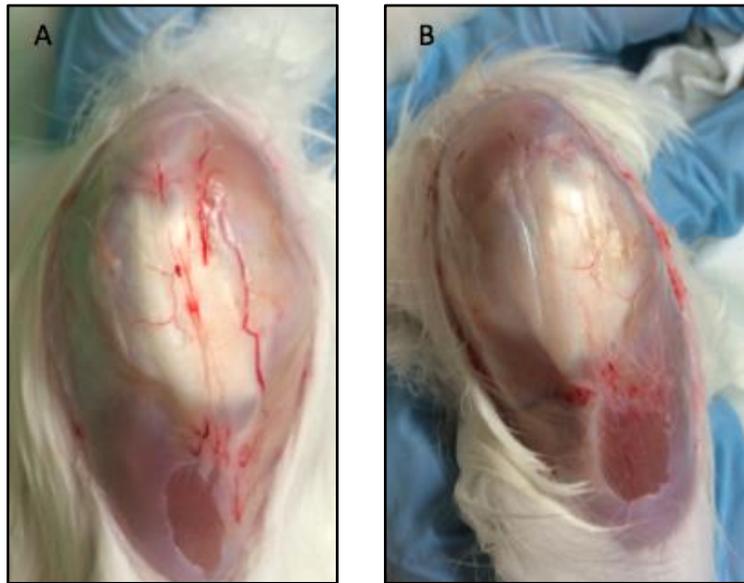
En este grupo, las rodillas presentaron hipertrofia capsular, con menor proporción de hemartros y menor grado de fibrosis en los tejidos blandos en comparación con el grupo IV. Además, se observaron lesiones condrales femorales sin exposición de hueso subcondral, con mínima fibrilación (grado 2 de Yosioka) e irregularidades en meseta tibial, sin llegar a presentar los osteofitos que se observaban en el grupo de IV (**Figura 32**).



**Figura 32.** Grupo V: (A) Lesión grado 2 de Yosioka en cóndilo femoral. (B) Pequeñas irregularidades en meseta tibial en menor proporción que el grupo IV.

### Resultados del Grupo VI: OA tratada con hidrogel de AH con dexametasona (H-Dexa)

Las rodillas del grupo VI presentaron mayor fibrosis de los tejidos blandos en comparación con las del grupo V, pero, sin embargo, no se observó una clara lesión condral en la articulación (**Figura 33**).



**Figura 33.** (A) Rodilla del grupo V con menor componente inflamatorio. (B) Rodilla del grupo VI con cambio de coloración de las partes blandas.

## 6.2 Estudio microscópico

Los resultados obtenidos en el estudio microscópico llevado a cabo mediante el empleo de las tinciones de hematoxilina/eosina y Safranina-O/verde rápido se exponen a continuación. También se muestran los resultados en la detección inmunohistoquímica de colágeno tipo II.

### Grupo I: tras la infiltración de PBS (grupo control)

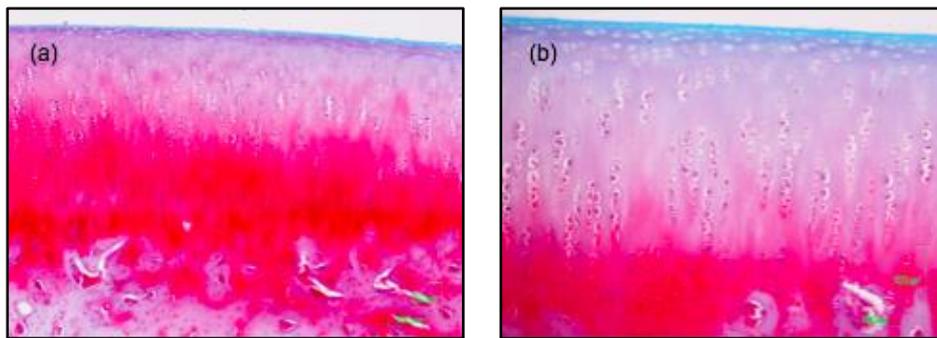
Este grupo se considera como grupo control con el objetivo de valorar la morfología normal del cartílago articular. Al grupo I únicamente se realizó infiltración con PBS para así determinar si la inyección de una sustancia, aunque fuera inocua, pudiera producir alteraciones en la cavidad articular.

En la **figura 34** se observan distintos cortes del cartílago tras su tinción con hematoxilina/eosina. Se observa como hay continuidad entre el hueso subcondral y el cartílago calcificado (**Figura 34 (a)** y **34 (b)**) sin presentar anomalías ni fisuras y con una vascularización normal. La superficie articular se muestra continua y lisa. Los condrocitos presentan una disposición normal, formando columnas (**Figura 34 (b)** y **34 (c)**). El cartílago conserva su organización en capas y una MEC normal.



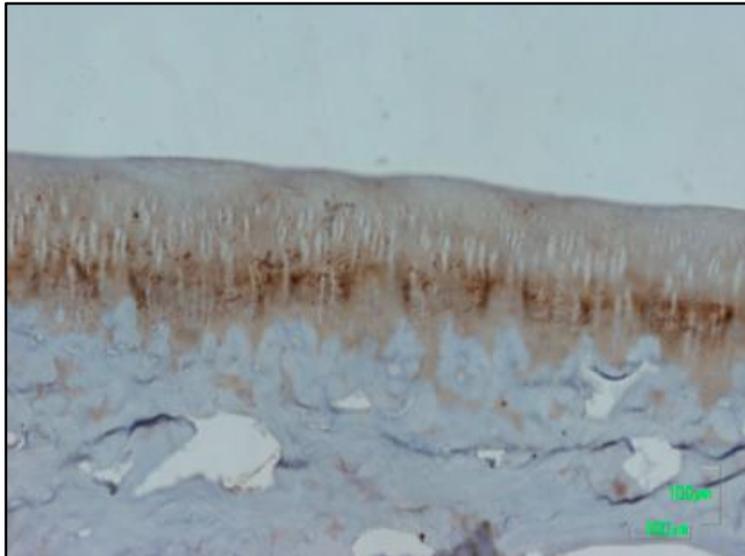
**Figura 34.** Imágenes microscópicas de diferentes cortes del grupo I, cartílago articular normal con tinción de hematoxilina/eosina. **(a)** Imagen a 4x en donde se observa hueso subcondral y cartílago. **(b)** Imagen a 10x. **(c)** Imagen a 20x donde se observan condrocitos en columnas rodeados de MEC.

En relación a las imágenes correspondientes a la tinción con Safranina-O/verde rápido, en la **Figura 35** se aprecia una tinción homogénea de la MEC en todas la capas del cartílago, signo de la presencia de proteoglicanos que constituyen de forma natural el cartílago y un cartílago articular de grosor y celularidad normal.



**Figura 35.** Imágenes microscópicas del grupo I mediante la tinción de SO/V. **(a)** Imagen de MEC homogénea y normal. **(b)** Se observa un cartílago articular de grosor normal.

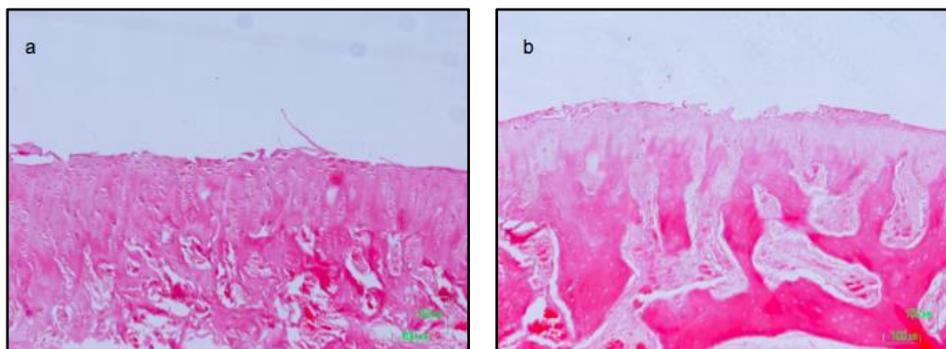
En el estudio inmunohistoquímico de detección de colágeno tipo II, en la **Figura 36** se aprecia una señal homogénea en la matriz interterritorial en toda el área del cartílago articular, indicando la presencia inalterada del colágeno tipo II. Incluso se observa una tendencia de expresión y coloración en forma de columnas, siguiendo la disposición normal de los condrocitos y revelando la organización de las fibras de forma paralela a la disposición celular.



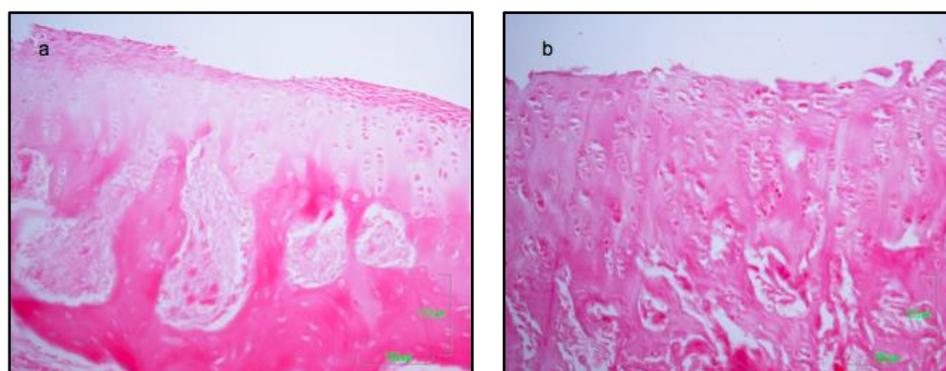
**Figura 36.** Imagen microscópica del grupo I donde se observa el marcaje inmunológico frente al colágeno tipo II de forma homogénea y en la totalidad del cartílago articular (10x).

#### **Grupo II: formación del modelo de osteoartrosis tras la infiltración de dos dosis de colagenasa**

En este grupo de trabajo se valora la posibilidad de generar OA mediante una doble inyección de colagenasa. A partir del estudio microscópico de las imágenes histológicas se aprecia una ligera alteración del cartílago articular. Sin embargo, la zona afectada está muy focalizada, apreciando alteración en una zona reducida de la superficie articular. Mediante la tinción de H/E se aprecia una leve alteración en la zona más superficial del cartílago, encontrando pequeñas hendiduras y muy ligera pérdida de la continuidad del grosor normal del cartílago (**Figura 37 (a)** y **37 (b)**). En relación a la celularidad los condrocitos conservan su disposición vertical, formando columnas. No obstante, en algunas zonas aparecen pequeños grupos de condronas hiperplásicas, signo de alteraciones debidas a la administración de la colagenasa (**Figura 38 (a)** y **38 (b)**). Por otro lado, se denota cierta erosión de la zona más superficial del cartílago, aunque no hay fisuras ni desprendimientos de fragmentos de cartílago. La continuidad con el cartílago adyacente se mantiene conservada. Por tanto, se puede considerar el grupo II como un modelo de OA incipiente no establecida.



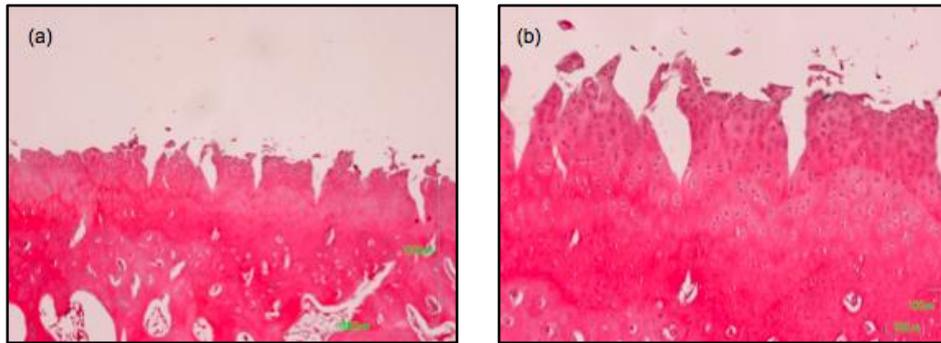
**Figura 37.** Imágenes microscópicas de diferentes cortes del cartílago articular del grupo II con tinción de hematoxilina/eosina. (a) Imagen a 10x donde se muestra la zona levemente lesionada con una ligera alteración en la capa superficial del cartílago articular. (b) Imagen a 20x donde se observa un leve erosionado de la superficie articular alterada.



**Figura 38.** Imágenes microscópicas del grupo II con tinción de hematoxilina/eosina. (a) Imagen a 20x donde se aprecia la casi plena conservación de la disposición de los condrocitos en columnas. (b) Imagen a 20x donde se observa el predominio de la distribución en columnas de los condrocitos, distinguiéndose también alguna condrona hiperplásica. La zona más superficial se encuentra levemente erosionada.

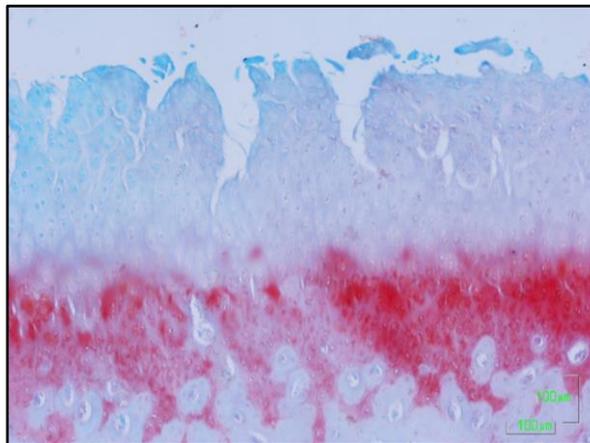
### **Grupo III: formación del modelo de osteoartrosis tras la infiltración de tres dosis de colagenasa**

Este grupo se considera como control de una rodilla con osteoartrosis química creada mediante la aplicación de 3 inyecciones de colagenasa. A la vista de los resultados se puede afirmar que efectivamente, se ha establecido una osteoartrosis en las rodillas de los conejos debido a la evidente degeneración del cartílago. En la **Figura 39 (a)** y **39 (b)** se observa una superficie articular alterada, mostrando severas fisuras, de profundidad considerable, junto con fragmentos de cartílago desprendidos y con pérdida de las células de la superficie articular. También se aprecia una alteración de la estructura del cartílago, afectando a la distribución celular de las diferentes capas produciéndose una hiperreactividad celular e hiperplasia debido a la presencia de un mayor número de células en comparación con el cartílago normal.



**Figura 39.** Imágenes microscópicas correspondientes al grupo III de osteoartrosis inducida con colagenasa con tinción de H/E. **(a)** Imagen a 4x donde se pone de manifiesto la irregularidad del cartílago articular, presentando numerosas y profundas fisuras, acompañado de fragmentos de cartílago desprendido. **(b)** Imagen a 10x donde se observa un aumento tanto en el número como en el tamaño celular.

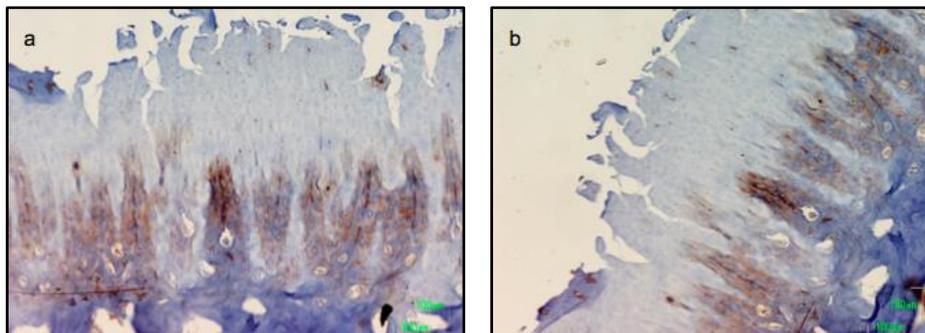
En relación a las imágenes correspondientes a la tinción de Safranina-O/verde rápido en la **Figura 40** se aprecia la ausencia de tinción de la MEC en las capas superficiales del cartílago, signo de déficit de proteoglicanos. Además, se observan profundas fisuras en el cartílago que alcanzan la capa calcificada donde sí se observa tinción de safranina, poniéndose de manifiesto que existe una degeneración del cartílago. La alteración de la composición de proteoglicanos de la MEC hace que el cartílago presente unas propiedades mecánicas diferentes respecto al cartílago hialino normal.



**Figura 40.** Imagen microscópica del grupo III que refleja fisuras profundas en el cartílago que casi alcanzan la capa calcificada. Esta capa presenta tinción de safranina a diferencia de las capas más superficiales del cartílago (SO/V, 10x).

En la detección de colágeno tipo II mediante estudio inmunohistoquímico, en la **Figura 41** se observa escasa coloración marrón encontrándose únicamente en las zonas más profundas del cartílago en transición con el hueso subcondral y por tanto se

evidencia una ausencia de colágeno tipo II en las capas intermedia y superficial del cartílago articular. El resto de la superficie articular se encuentra fisurada, con fragmentos articulares desprendidos y con ausencia de coloración, indicando la alteración de la composición de la matriz.



**Figura 41.** Imagen microscópica del grupo III donde se observa el marcaje inmunológico frente al colágeno tipo II exclusivamente en la zona de transición entre la capa profunda del cartílago articular y el hueso subcondral. **(a)** Imagen 10x donde se observa coloración marrón en la capa profunda en transición con el hueso subcondral y ausencia de colágeno tipo II en las capas superficiales. **(b)** Imagen 10x donde se muestra la superficie articular fisurada y sin detectar colágeno tipo II.

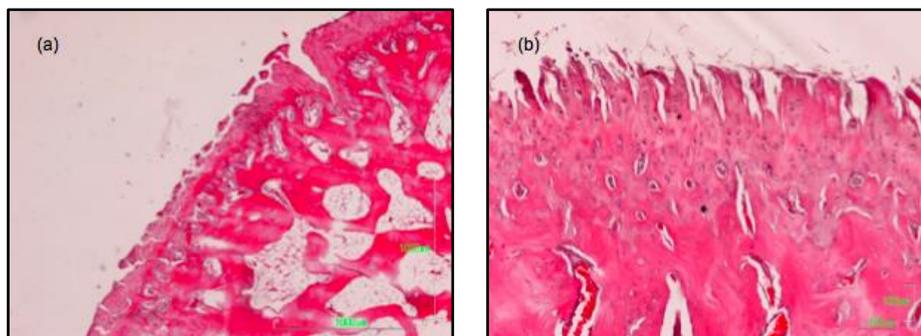
### **Grupo IV: OA con infiltración de PBS como tratamiento**

El grupo IV se considera como control de la evolución de la OA sin tratamiento, solamente con inyección intraarticular de PBS. Por los resultados observados se puede afirmar que se ha producido una evolución hacia una osteoartrosis más severa, debido a la notable degeneración del cartílago. En la **figura 42** se pone de manifiesto una irregularidad de la superficie articular evidente, mostrando numerosas fisuras y grandes erosiones, casi en la totalidad de la superficie. La profundidad de las fisuras es tal que atraviesan las capas del cartílago llegando a la altura de la *tidemark*. Se detecta un acusado estrechamiento del grosor del cartílago articular, siendo casi inexistente, con la presencia de numerosos fragmentos de cartílago desprendidos. Por ende, se ha producido la pérdida de las células de la superficie articular y se observa una ausencia de la distribución en capas del cartílago, sin preservarse por tanto su estructura original.

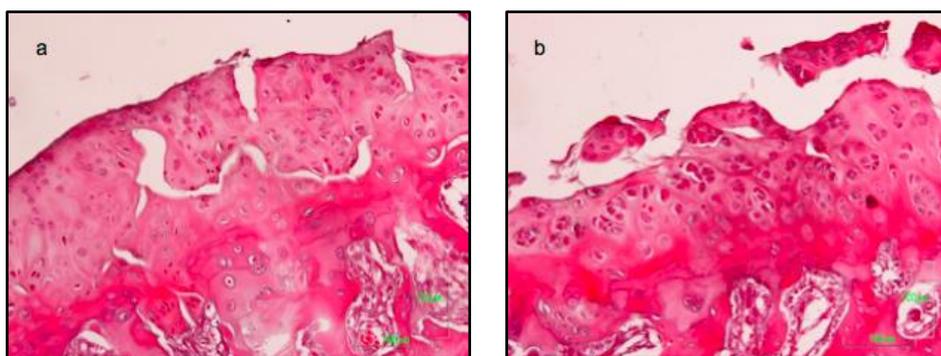
En relación a la celularidad, en la **Figura 42** se observa que los condrocitos están alterados morfológicamente y desorganizados, presentando un citoplasma hipereosinófilo e hipertrofia celular y encontrándose en grandes lagunas formando condronas hiperplásicas. Esta reacción tisular es un signo de intento de reparación de la lesión.

En la **Figura 43** se observa una ligera alteración del hueso subcondral, siendo evidente un límite irregular entre el cartílago calcificado y el hueso subcondral. Por ello, las marcas de *tidemark* también se muestran irregulares, mostrando un desdoblamiento en los frentes de calcificación. Además, se ha producido un aumento de la vascularización que penetra en el cartílago, fenómeno que en estados normales no ocurre y que es debido a un proceso de reacción tisular frente a la OA.

En comparación con el grupo anterior, de inducción de OA sin evolución (grupo III), el desarrollo de la OA es evidente. La degeneración del cartílago a lo largo del tiempo de estudio es notable. Se aprecia un mayor desprendimiento de fragmentos de cartílago además de que se encuentra adelgazado y con severas fisuras, observándose la alteración tanto a nivel celular como a nivel de la MEC.

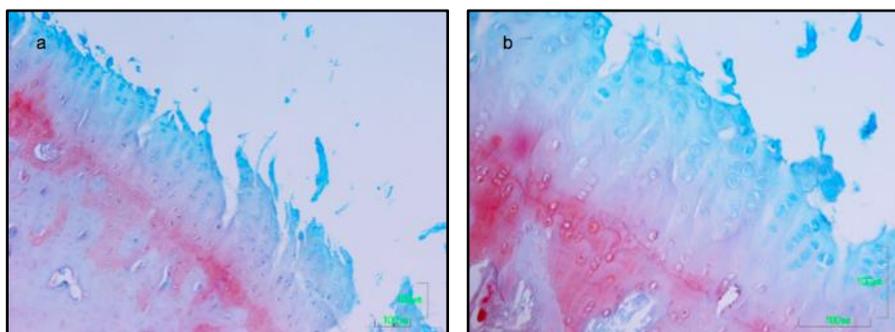


**Figura 42.** Imágenes microscópicas del grupo IV con tinción de H/E de la superficie articular que muestra degeneración del cartílago. (a) Imagen 4x donde se observa un cartílago articular muy adelgazado y altamente fragmentado. (b) Imagen 10x donde se muestran múltiples fisuras y un componente celular escaso.



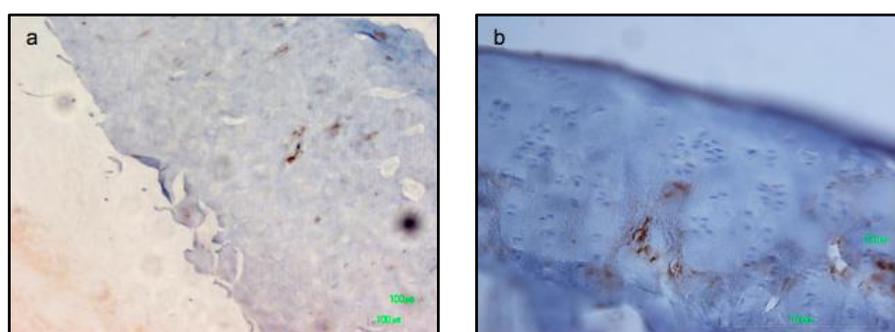
**Figura 43.** Imágenes microscópicas del grupo IV mediante tinción de H/E. (a) Imagen 20x donde se muestra un desprendimiento en bloque de parte del cartílago con una distribución celular heterogénea. Se observa penetración de la capa calcificada en el hueso subcondral. (b) Imagen 20x con gran alteración celular y condronas hiperplásicas. La transición con el hueso subcondral presenta alteraciones, es irregular y tiene una mayor vascularización.

En el grupo IV también se observa una importante disminución de la tinción de la matriz extracelular con SO/V en las capas superficiales del cartílago, indicando una alteración en su composición. Sin embargo, se aprecia una tenue coloración de safranina en las capas más profundas del cartílago articular, como se puede observar en la **Figura 44 (a)** y **44 (b)**. Este comportamiento es el esperado debido a la degeneración del cartílago provocada por la osteoartritis desarrollada.



**Figura 44.** Imágenes microscópicas del grupo IV con tinción SO/V. **(a)** Imagen 10x que muestra ausencia de coloración en las capas superficiales debido a la ausencia de proteoglicanos en la MEC. **(b)** Imagen 20x donde se observa que la coloración con safranina está presente únicamente en la capa más profunda del cartílago articular.

En relación con el marcaje inmunohistoquímico de colágeno tipo II, en la **Figura 45** se observa una ausencia casi completa de tinción, encontrándose únicamente pequeñas áreas aisladas inmunoreactivas frente al colágeno tipo II.

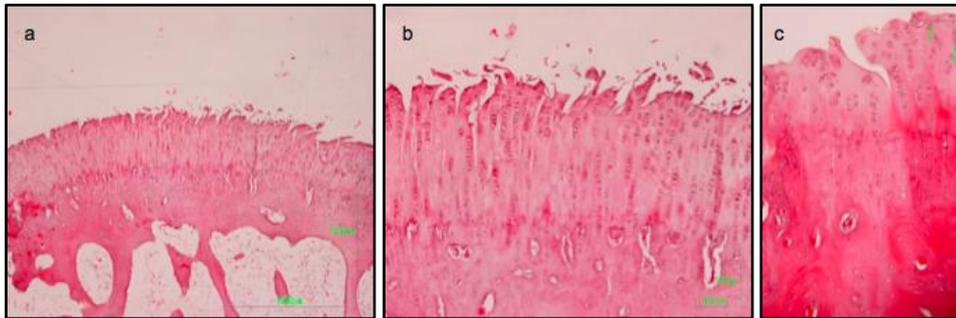


**Figura 45.** Imagen microscópica del grupo IV donde se observa ausencia casi completa de marcaje inmunológico frente al colágeno tipo II, mostrándose zonas puntuales inmunomarcadas. **(a)** Imagen 10x. **(b)** Imagen 40x.

### Resultados del Grupo V: OA tratada con H-Nap

En el grupo V donde la OA se trató con H-Nap, aunque se observa una alteración del cartílago, su afectación no es tal como en el caso de la OA sin tratamiento (grupo IV), es decir, no se ha producido una progresión de la misma. Se puede apreciar una relativa respuesta de reparación del cartílago. Como prueba de ello se distingue un

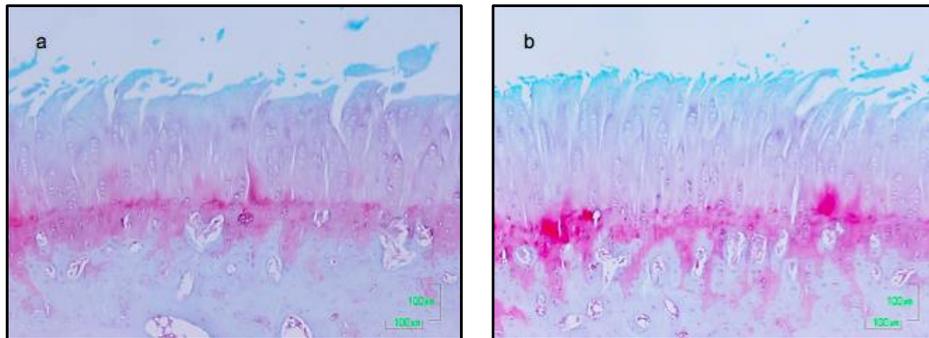
cartílago articular con un grosor comparable al fisiológico, con fisuras mucho menos pronunciadas y siendo más superficiales, y menor fragmentación de la superficie articular en comparación con el grupo IV (**Figura 46 (a)**). En relación a la MEC, esta presenta una tinción más homogénea con una estructura más conservada, indicando una composición normal y sin alteraciones (**Figura 46 (a)** y **46 (b)**). La disposición de los condrocitos también se encuentra normalizada, formando columnas y en grupos isogénicos, signo de división celular y reparación tisular. Aunque se aprecian condronas hiperplásicas se encuentran en menor proporción que en el caso de OA sin tratamiento, y nunca localizadas en la superficie articular (**Figura 46 (b)** y **46 (c)**). El hecho de que aparezcan en capas más profundas del cartílago es índice de proliferación celular y señal de reparación. Además, la vascularización del hueso subcondral es normal y focalizada, no presenta alteraciones ni en el número de vasos ni en su localización como se puede observar en la **Figura 46 (a)** y **46 (b)**.



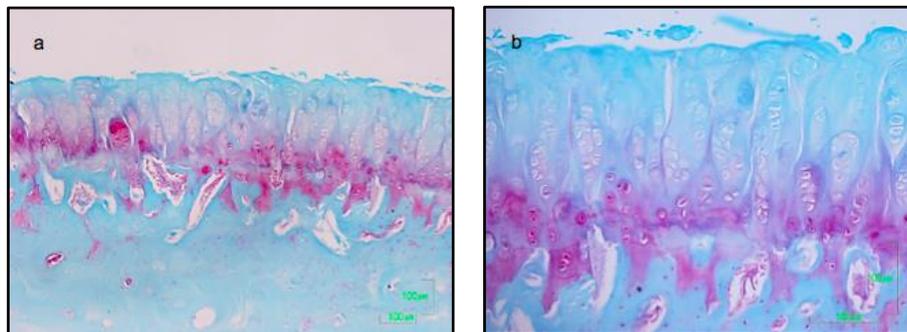
**Figura 46.** Imágenes microscópicas del grupo V con tinción de H/E. **(a)** Imagen 4x donde se observan leves fisuras y algún pequeño fragmento aislado de cartílago desprendido. El límite con el hueso subcondral está conservado. **(b)** Imagen 10x donde se muestran fisuras superficiales y una distribución de los condrocitos en columnas. **(c)** Imagen 20x del cartílago articular con condrocitos dispuestos tanto en columnas como agrupados formando pequeñas agrupaciones de condronas hiperplásicas.

En relación a las imágenes con la tinción de Safranina-O/verde rápido podemos afirmar que la composición de la MEC se encuentra bastante conservada, ya que muestra coloración homogénea en casi la totalidad de las capas del cartílago articular, revelando la presencia de proteoglicanos. Únicamente se aprecia ausencia de coloración en la capa más superficial, al igual que ocurre en los casos de cartílago articular normal, no patológico (**Figuras 47** y **48**). En aquellos casos donde se aprecia un cartílago articular más reactivo, es decir con una actividad de síntesis y reparación más notable, la coloración de las capas es menos evidente, adquiriendo una coloración normal las capas más profundas del cartílago (**Figura 48 (b)**). Además, se aprecia cómo tanto alrededor como en el interior, las formaciones de condronas hiperplásicas

adquieren cierta coloración roja, signo de síntesis de componentes fisiológicos de la MEC (**Figura 48 (a)**).

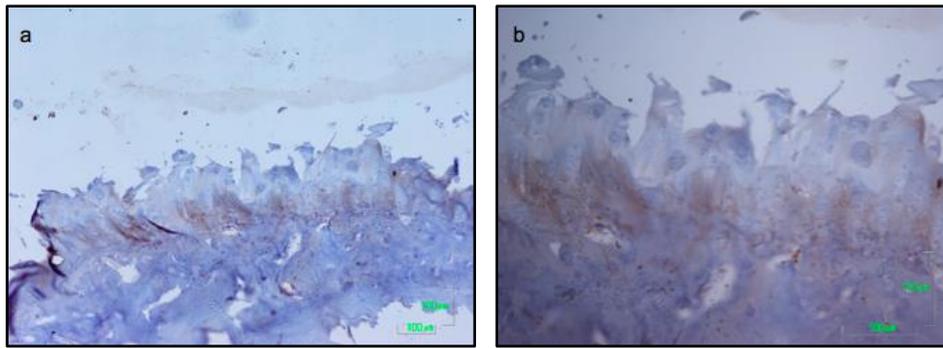


**Figura 47.** Imágenes microscópicas del grupo V con tinción SO/V. **(a)** Imagen 10x donde se observa una MEC con una composición muy conservada. **(b)** Imagen 10x donde se pone de manifiesto una coloración homogénea y con patrones característicos de una MEC normal.



**Figura 48.** Imágenes microscópicas del grupo V con tinción SO/V. **(a)** Imagen 10x donde se observan numerosas condronas hiperplásicas y tinción de la MEC tanto en las capas más profundas como dentro de las condronas, indicando la presencia de proteoglicanos. **(b)** Imagen 20x donde se muestra disminución de la tinción de la MEC en las zonas más superficiales, sin embargo la presencia de coloración es más notable en la capa profunda.

Los resultados de la tinción inmunohistoquímica del grupo V reflejan un marcaje tenue siendo predominante la señal en la capa profunda del cartílago en transición con el hueso subcondral. Sin embargo, el marcaje inmunológico frente al colágeno tipo II es débil alrededor de las condronas hiperplásicas, es decir, la presencia de colágeno II en la matriz interterritorial es relativamente escasa (**Figura 49 (a)** y **49 (b)**).

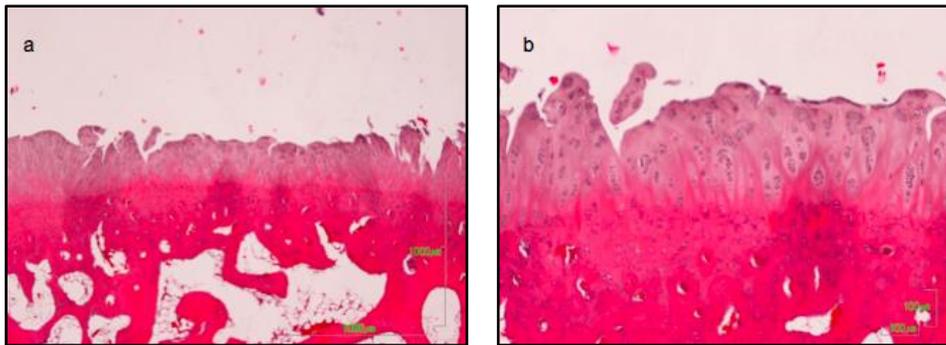


**Figura 49.** Imagen microscópica del grupo V de inmunohistoquímica frente a colágeno tipo II donde se observa inmunoreactividad en la capa profunda en transición con el hueso subcondral y una señal inmunológica muy débil en la matriz interterritorial. (a) Imagen 10x. (b) Imagen 20x.

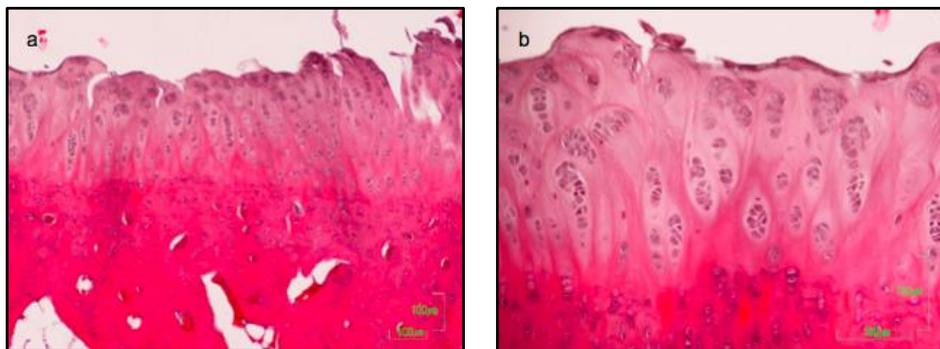
### Grupo VI: OA tratada con H-Dexa

El análisis histológico de la respuesta al grupo VI indica que se ha producido una conservación relativa del cartílago, es decir, la evolución de la OA es mucho menor. El cartílago articular se muestra relativamente preservado, mostrando un grosor levemente reducido en comparación con el fisiológico, con escasas fisuras de poca o media profundidad (**Figuras 50 y 51**). Son escasos los fragmentos de cartílago desprendidos de la superficie, pero en estos casos se observa celularidad en su interior (**Figura 50 (a)**). Los condrocitos se muestran desorganizados, hiperplásicos y formando condronas hiperplásicas (en mayor proporción que en el grupo V) principalmente en la capa más superficial del cartílago (**Figura 51**). Este tipo de respuesta celular está asociada a una reparación tisular, pero se podría decir que, en comparación con el grupo de tratamiento con naproxeno (grupo V), la respuesta reparativa es menor, ya que la maduración de la disposición de los condrocitos se encuentra disminuida. La preservación de la estructura y conservación de las diferentes capas del cartílago es escasa, aunque el grosor del cartílago es mayor en comparación al grupo de la OA sin tratamiento (grupo IV) (**Figura 50**). En el grupo VI se aprecia cierta tendencia a la reparación tisular pero aún existe lesión.

La vascularización del hueso subcondral es normal y focalizada, no presenta alteraciones ni en el número de vasos ni en su localización, como se puede observar en las **Figuras 50 y 51**.

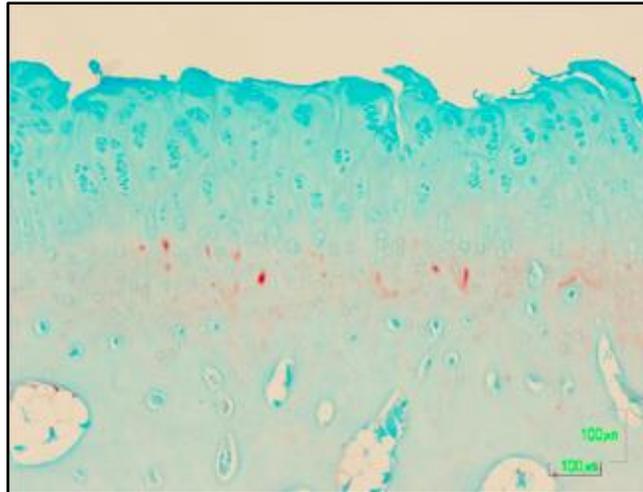


**Figura 50.** Imágenes microscópicas del grupo VI mediante tinción de H/E. **(a)** Imagen 4x de la superficie articular con notables irregularidades, fisuras y ligera disminución del grosor del cartílago. **(b)** Imagen 10x donde se observa una distribución alterada de los condrocitos formando condronas hiperplásicas. También se observan fragmentos desprendidos del cartílago con celularidad en su interior.



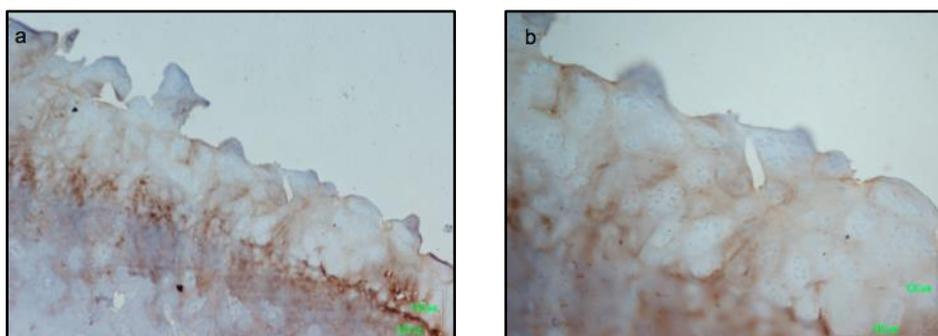
**Figura 51.** Imágenes microscópicas del grupo VI con tinción de H/E. **(a)** Imagen 10x que muestra la presencia de condronas hiperplásicas en la capa más superficial del cartílago. **(b)** Imagen 20x donde se observa la organización de los condrocitos en condronas hiperplásicas distribuidas por todas las capas del cartílago.

En el grupo VI, se pudo observar una importante disminución de la tinción de SO/V de la matriz extracelular en las capas superficiales del cartílago, indicando la ausencia de proteoglicanos. Sin embargo, se apreció coloración de safranina en la capa más profunda, la capa calcificada (**Figura 52**).



**Figura 52.** Imagen microscópica del grupo VI con tinción SO/V donde se aprecia ausencia de coloración en las capas más superficiales del cartílago debido a la alteración de la composición de la MEC. La capa más profunda, en transición con el hueso subcondral, es la que muestra presencia de proteoglicanos.

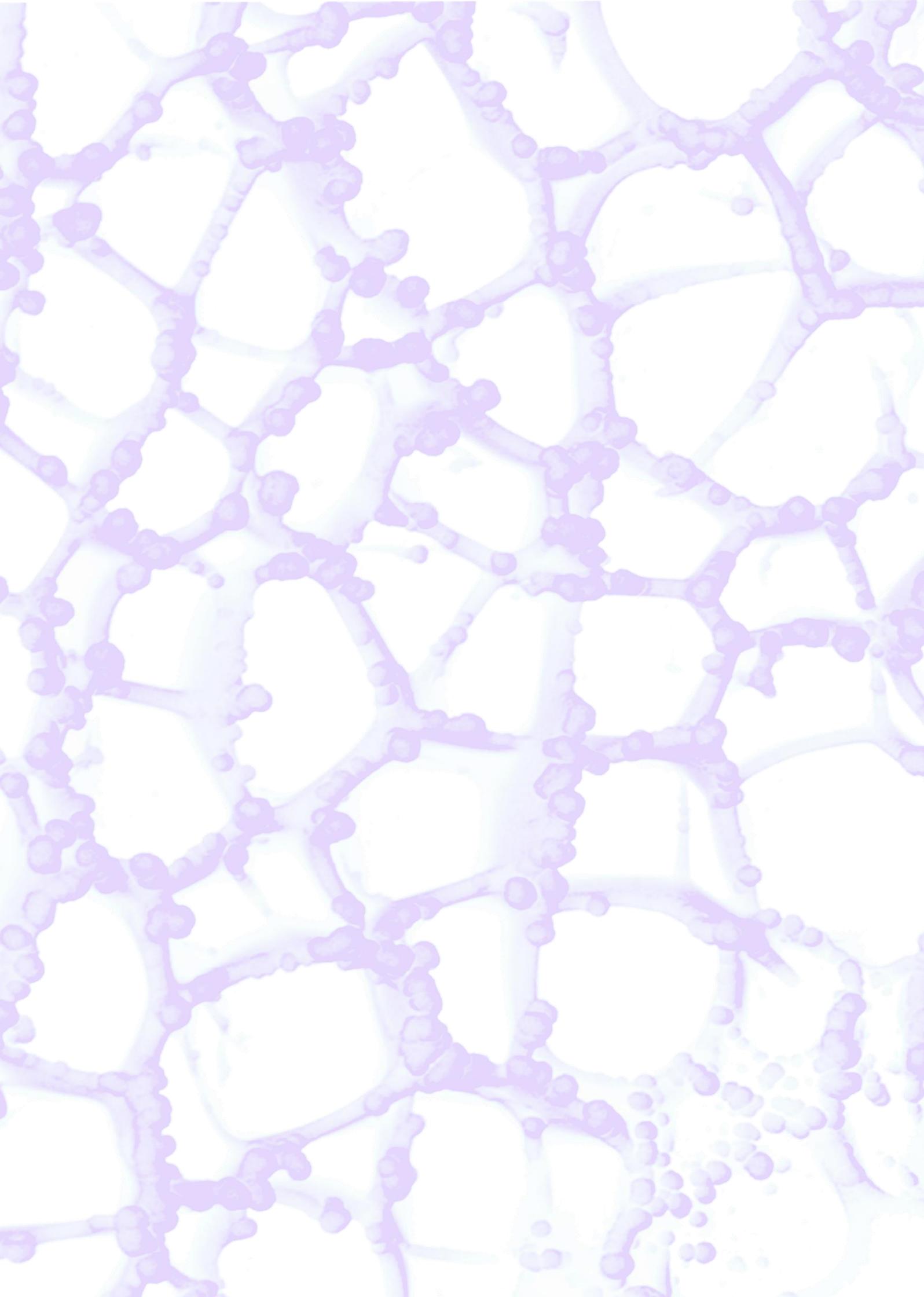
En el estudio inmunohistoquímico del colágeno tipo II en el grupo VI se observó una coloración gradual, siendo más fuerte en la zona cercana al hueso subcondral y más débil alrededor de las condronas hiperplásicas, dejando como reflejo el depósito de colágeno tipo II alrededor de ellas, en la zona interterritorial (**Figura 53**). Estos hallazgos parecen indicar que la matriz cartilaginosa se está recuperando ya que los condrocitos, conformados en condronas, están rodeados de matriz con presencia de colágeno tipo II. En este grupo la señal en la matriz interterritorial es más intensa en comparación con el otro grupo V tratado con H-Nap.



**Figura 53.** Imagen microscópica del grupo VI de inmunohistoquímica frente a colágeno tipo II donde se observa el marcaje más intenso en la capa profunda en transición con el hueso subcondral y un marcaje más débil en la matriz interterritorial alrededor de las condronas hiperplásicas. (a) Imagen 10x. (b) Imagen 20x.









# Capítulo 6

## Discusión



El tratamiento efectivo de las enfermedades articulares degenerativas como la osteoartrosis constituye uno de los principales desafíos del siglo XXI, ya que es una importante fuente de discapacidad debido al dolor y a la pérdida de función de la extremidad, ocasionando una dependencia física y una disminución en la calidad de vida de nuestros pacientes. Con el envejecimiento de la población y el aumento de la obesidad, la osteoartrosis representa un problema importante de salud pública además de afectar a la economía mundial (36, 130, 131).

La OA se considera una enfermedad crónica heterogénea que puede afectar a todos los tejidos de la articulación sinovial. El tratamiento de estas lesiones se ve dificultado si consideramos el cartílago articular, el líquido y la membrana sinovial junto con el hueso subcondral como una unidad funcional (132), a la que además se añaden otros factores como son el intercambio de oxígeno y nutrientes y la liberación de hormonas y factores de crecimiento (12).

En la actualidad, las terapias de elección son principalmente el tratamiento farmacológico del dolor y la cirugía protésica de reemplazo articular en fases avanzadas de la enfermedad. Las terapias médicas disponibles, incluidos los analgésicos tradicionales y los anti-inflamatorios no esteroideos para la OA, pueden aliviar los síntomas al disminuir el dolor y mejorar la movilidad temporalmente, pero son ineficaces en cuanto a modificar o ralentizar la progresión de la enfermedad, además, su uso crónico ha estado limitado por sus efectos secundarios (133). Con el objetivo de buscar alternativas de tratamiento, se desarrollaron las infiltraciones intraarticulares, como son las de anestésicos locales, corticosteroides o viscosuplementación (con ácido hialurónico), que consiguen mejorar la función y la calidad de vida, y posiblemente limitar la progresión de la enfermedad (130, 131). Uno de los principales problemas con el que nos encontramos al inyectar intraarticularmente dichos fármacos es que pueden eliminarse rápidamente del líquido sinovial y de la cavidad articular, disminuyendo así el posible efecto condroprotector y analgésico del fármaco administrado (134).

El propósito de esta tesis ha sido desarrollar un hidrogel inyectable de ácido hialurónico con estructura de red semi-interpenetrada y con actividad farmacológica, portador de anti-inflamatorios que se liberen localmente en el lugar de la lesión con el objetivo de frenar la progresión de la osteoartrosis, evitando así la cirugía última de rescate, la sustitución total de la articulación, dado que actualmente este tipo de formulaciones no se encuentran en la práctica clínica.

## 1. Formación de los hidrogeles

Como se ha comentado previamente, la regeneración del cartílago articular hialino es un reto en la actualidad. Una de las herramientas de las que disponemos para dicha regeneración es la ingeniería tisular.

La IT es una estrategia multidisciplinaria que implica el uso de biomateriales que actúan como un andamio para la encapsulación y adhesión de células apropiadas, que, junto con factores fisicoquímicos, faciliten la reconstrucción tisular. Los biomateriales de tipo **hidrogel** son ampliamente empleados en las aplicaciones médicas, ya que sus propiedades son fácilmente modificables para conseguir propiedades mecánicas similares al tejido biológico de interés, proporcionando señales biofísicas y bioquímicas que estimulen la supervivencia, proliferación, diferenciación y la migración celular (135, 136). Además, permiten una encapsulación celular uniforme, son fáciles de manejar y pueden ser inyectables lo que permite una reparación mínimamente invasiva de los tejidos cartilagosos (137, 138). Otros aspectos importantes de los hidrogeles empleados en la regeneración del tejido cartilaginoso son la gelificación *in situ*, y la capacidad de integrarse de forma segura en el tejido. Dicha gelificación *in situ* se puede lograr a través de la fotopolimerización, formación de bases de Schiff, o modificando la temperatura (139). Atendiendo a la naturaleza de los polímeros que los constituyen, los hidrogeles pueden ser de origen natural como polisacáridos y proteínas, o sintético o poliacrilatos y derivados.

La matriz extracelular del cartílago se puede considerar como una **red semi-interpenetrada** de fibras de colágeno entrelazadas con moléculas de alto peso molecular basadas en polisacáridos y GAG (122). Este hecho ha ocasionado un interés creciente en la formación de redes poliméricas semi-IPN ya que se tratan de biomateriales innovadores muy útiles para la administración de fármacos además de servir como andamios para cultivos celulares (140). Según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) la definición de semi-IPN es: "Un polímero que comprende una o más redes y uno o más polímeros lineales o ramificados caracterizados por la penetración entre ellos a escala molecular de al menos una de las redes por al menos algunas de las macromoléculas lineales o ramificadas, es decir, no están covalentemente unidas entre sí". Además, hace mención a la diferencia que existe entre las semi-IPN y las IPN: "Las redes de polímeros semi-interpenetradas se distinguen de las redes de polímeros interpenetradas porque los polímeros lineales o ramificados constituyentes pueden, en principio, ser separados de la(s) red(es) de

polímero constituyente(s) sin romper enlaces químicos; son mezclas de polímeros" (141).

Una de las preguntas claves que ha surgido es por qué los hidrogeles semi-IPN se utilizan con tanto éxito en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. La principal razón es que la combinación de las propiedades favorables de cada polímero que constituye la red semi-IPN conduce a nuevos sistemas con propiedades mejoradas y que son bastante distantes de las propiedades de los polímeros de forma individual, además de poder producirse sinergia entre las propiedades de los distintos polímeros (101, 142). Por otro lado, también se pueden modificar las características del material producido en función de las necesidades de cada producto. Otras ventajas del uso de las redes semi-IPN para el diseño de hidrogeles son las siguientes (98):

- Presentan una alta compatibilidad celular y en algunos casos pueden presentar estructuras receptoras a estímulos.
- Estimulan la bioadhesión.
- Pueden controlar la velocidad de liberación de un fármaco.

Los polisacáridos son muy adecuados para la formación de dichas redes semi-IPN con aplicación en Biomedicina ya que se trata de una clase de macromoléculas que normalmente son abundantes debido a que, en la mayoría de los casos, se pueden obtener a partir de fuentes renovables. Además, existe una gran variedad de polisacáridos que presentan diferente composición y propiedades, lo que permite realizar modificaciones químicas adaptadas en su estructura (143), es decir, los grupos funcionales presentes a lo largo de la cadena principal pueden ser modificados químicamente para dotar de nuevas propiedades a los sistemas. Uno de los polisacáridos más empleados en el desarrollo de semi-IPN en aplicaciones biomédicas e ingeniería de tejidos ha sido y es el ácido hialurónico (144).

El **ácido hialurónico** exógeno es una sustancia que se produce a partir de la fermentación bacteriana *in vitro*. Existen tres tipos de AH disponibles en la actualidad: el AH de PM bajo (< 800 kDa), el AH de PM medio (800 – 1000 kDa) y el AH de alto PM reticulado químicamente (> 1000 kDa). Se ha observado que el AH de bajo peso molecular tiene una vida media de 10 – 13 h (debido a un rápido aclaramiento), mientras que el de alto peso molecular puede durar hasta 9 días, por lo que este último, a través de mecanismos anti-inflamatorios, tiene mayor efecto analgésico y condroprotector (145-148). Es por esto que en la formación de los hidrogeles de este estudio se empleó

AH de peso molecular medio (800-1000 kDa) para poder incorporar mayor cantidad de AH sin comprometer demasiado el aumento de la viscosidad y el tiempo de gelificación de la formulación.

Son múltiples las funciones atribuidas al ácido hialurónico intraarticular: actúa como un lubricante y amortiguador elástico durante los movimientos de la articulación, disminuyendo el estrés y la fricción del cartílago articular. Además, el AH funciona, a través de mecanismos anti-inflamatorios como analgésico y condroprotector. Dicha actividad analgésica se produce mediante un mecanismo directo (a través de la inhibición directa de los nociceptores y la disminución de la síntesis de bradiquinina y sustancia P) e indirecto (debido a las propiedades anti-inflamatorias de AH) dentro de las articulaciones (130, 149). Todas estas características hacen que el AH sea útil para la formación de nuevos biomateriales aplicables en ingeniería tisular y regeneración del cartílago articular (150).

Se ha observado cómo en la articulación con osteoartrosis disminuye la concentración de AH, así como su peso molecular. Sin embargo, es necesaria una viscoelasticidad del líquido sinovial alta para llevar a cabo las funciones de lubricación, absorción de impactos y el soporte de cargas y así evitar un desgaste del cartílago articular (131, 151, 152). Es por esto que se piensa que la inyección intraarticular de AH puede restaurar las propiedades viscoelásticas normales del líquido sinovial mejorando en un primer momento el efecto de lubricación, y en una segunda etapa disminuyendo la destrucción del cartílago articular (153). Debido a las características descritas, el empleo de AH en la fabricación de biomateriales está muy extendido.

Hay que tener en cuenta que el objetivo del presente trabajo es conseguir un biomaterial que requiera una preparación relativamente sencilla, con una composición química bien definida y de uso clínico fácil y asequible. Muchos materiales sintéticos cumplen estos criterios, pero la mayoría provocan una respuesta inflamatoria en el huésped, carecen de una interacción biológica con las células del entorno y son eliminados por mecanismos de degradación no biológicos. Es por eso que cada vez se emplean más los biomateriales naturales basados en biopolímeros modificados químicamente, que son reconocidos por los sistemas biológicos y presentan una biodegradación por vías intrínsecas (154, 155).

Por otra parte, el cartílago articular contiene colágeno, una proteína de la matriz extracelular muy importante. Por este motivo, el colágeno es un buen candidato (o sus derivados como la gelatina) para el desarrollo de hidrogeles naturales, ya que proporciona señales biológicas para la adhesión y proliferación celular (137).

La **gelatina** se obtiene hidrolizando parcialmente el colágeno y presenta algunas ventajas respecto al mismo, ya que es soluble en agua a pH neutro, no es antigénica y es más económica (156, 157). Se trata de un material biocompatible y biodegradable empleado en ingeniería tisular, ya que promueve la adhesión celular y la liberación de pequeñas moléculas que se pueden añadir al hidrogel (158, 159). Además, la gelatina se degrada por acción de las metaloproteinasas de la MEC, lo que hace muy atractivo su uso en los hidrogeles implantados *in vivo* ya que es imprescindible la degradación del componente para la formación y disposición del nuevo tejido de reparación (138).

Dependiendo del método en el que se pre-trata el colágeno se pueden producir dos tipos distintos de gelatina (160):

- **El proceso alcalino** actúa sobre los grupos amida de asparagina y glutamina y los hidroliza formando grupos carboxilo, convirtiéndolos en residuos de aspartato y glutamato.
- **El pre-tratamiento ácido** actúa muy poco en los grupos amida de ambas sustancias.

Debido al distinto tipo de pre-tratamiento las gelatinas difieren en su naturaleza eléctrica. La gelatina procesada con un pre-tratamiento alcalino posee mayor proporción de grupos carboxilo, es decir, tiene una carga negativa y disminuye su punto isoeléctrico en comparación con la gelatina con procesamiento ácido que posee un IEP similar al colágeno. La diferencia de cargas entre ambas gelatinas permite su uso en combinación con distintas proteínas ya sean de naturaleza ácida o básica (161). En este trabajo se empleó una gelatina A (ácida) con un punto isoeléctrico entre 7,0 y 9,0, por lo que se mantuvo el pH del medio de reacción a 7,4 con el fin de que la gelatina reaccionase con el agente entrecruzante (el dextrano oxidado) y formara una red semi-IPN en presencia de AH.

Así pues, en este estudio se propone la obtención de hidrogeles formados por dos componentes principales: el ácido hialurónico y la gelatina, mediante el uso de formulaciones inyectables capaces de gelificar *in situ* formando una red semi-interpenetrada. Como se ha comentado previamente, el hidrogel de AH resulta una herramienta útil en las aplicaciones biológicas, pero dada su naturaleza no adhesiva puede presentar ciertas dificultades en aplicaciones que requieran una proliferación celular. La adición de gelatina a la matriz de hidrogel de AH puede mejorar estas propiedades (138) ya que se ha observado que los hidrogeles compuestos con AH y gelatina presentan mayor adhesión y proliferación celular que los formados por AH

exclusivamente (162, 163). Además, el uso de hidrogeles compuestos puede reproducir mejor las propiedades de la MEC, es por eso que en este estudio se combina el AH con la gelatina, con el objetivo de formar las redes semi-IPN que sean capaces de soportar la adhesión y proliferación celular.

Debido a la naturaleza sol-gel de la gelatina, fue necesario entrecruzarla químicamente para formar la red de hidrogel a 37 °C eligiéndose el **dextrano oxidado** como agente entrecruzante. El dextrano es un polisacárido natural hidrofílico y biocompatible que es análogo al glucosaminoglucano presente en la MEC. Su alto peso molecular le confiere unas propiedades mecánicas muy buenas para su uso en la ingeniería tisular. El dextrano usualmente se usa en combinación con otros biomateriales para proporcionar un rol bifuncional que estimule la regeneración del tejido cartilaginoso (137, 164).

El entrecruzamiento químico de los polisacáridos es el método más directo para obtener redes estables de hidrogel por medio de enlaces covalentes entre las cadenas macromoleculares. El entrecruzamiento con grupos aldehído, mediante los cuales se forman las bases de Schiff, ha sido una de las opciones más empleadas, siendo el glutaraldehído el agente más ampliamente utilizado para este fin (165). Sin embargo, debido a la notable citotoxicidad de este compuesto, en los últimos años se han empleado polialdehídos de alto peso molecular obtenidos por reacción de oxidación parcial de carbohidratos, como el almidón (166) y el dextrano (167, 168) que han mostrado buenos resultados a la hora de formar hidrogeles gelificables *in situ* (168) e hidrogeles de redes IPN (167).

Son varios los métodos descritos en la bibliografía para la oxidación y caracterización del dextrano. Uno de los métodos de preparación más empleados es el descrito por Maia y col. (169) quienes oxidan dextrano con periodato sódico durante un tiempo de 4 h (condiciones similares a las que se han utilizado en este estudio). Además, estos autores observaron que la oxidación con periodato en soluciones no tamponadas conducía a una liberación de ácido fórmico y a una disminución del pH, contribuyendo, muy posiblemente, a la reducción del peso molecular del dextrano oxidado, fenómeno que también se ha comprobado en este trabajo, y que fue más acusado al aumentar el PM del dextrano de partida. En cuanto a la caracterización del grado de oxidación, igualmente se han seguido diferentes protocolos. Así, Weng y col. caracterizaron el dextrano oxidado mediante el método de carbazato de t-butilo (t-BC), que es uno de los más empleados (168, 170), al igual que Maia y col, quienes además emplearon la resonancia magnética nuclear (169). Sin embargo, en la presente tesis, se empleó el

método descrito por Zhao y col. (123) basado en la utilización de hidrocloreto de hidroxilamina. Se eligió este método debido a su facilidad de uso y a su buena resolución en carbohidratos oxidados que están basados en unidades de anhidroglucosa.

Una gran ventaja de los hidrogeles de gelatina y ácido hialurónico con estructura semi-IPN es su capacidad para actuar como vehículos de moléculas bioactivas o fármacos que ayuden a mantener la viabilidad celular, así como las propiedades biomecánicas del tejido (171, 172). En nuestro estudio, se incorpora dexametasona o naproxeno al hidrogel de ácido hialurónico inyectable, con el objetivo de disminuir la inflamación de los tejidos enfermos y estimular la regeneración tisular.

En la práctica clínica habitual, existen 5 tipos de corticosteroides inyectables intraarticulares autorizados por la Federación de Alimentos y Medicamentos (FDA), entre ellos se encuentra la dexametasona (130). Este fármaco presenta un efecto antiinflamatorio e inmunosupresor mediante un mecanismo de acción complejo. Interrumpe la cascada inflamatoria e inmunitaria en varios niveles, reduciendo así la permeabilidad vascular y por ende, la acumulación de células inflamatorias ocasionando además un aumento de la viscosidad relativa articular al aumentar la concentración de AH (130, 173, 174). Existe controversia en relación al posible efecto tóxico de los corticoides sobre el cartílago articular siendo dicha toxicidad dosis y tiempo dependiente, es decir, a menor concentración y menor tiempo de exposición a la dexametasona, menor toxicidad celular (175). Se ha descrito el efecto protector sobre el cartílago articular en modelos animales experimentales de OA (152, 176), observándose que se trata de un reactivo clave para inducir la condrogénesis de MSC *in vitro* (171, 177, 178). También se ha observado que la dexametasona provoca una disminución del daño en el cartílago articular, en comparación con otros corticosteroides, como la triamcinolona o la metilprednisolona que originan una disminución en la proporción de proteínas en la MEC disminuyendo así la elasticidad (176, 179). Estos beneficios de la dexametasona han promovido su uso en el tratamiento de OA a pesar de sus complicaciones (180, 181), siendo la principal indicación aquellos pacientes con OA que presenten brotes inflamatorios y dolor agudo donde se observa una mejoría clínica pero en un corto período de tiempo (130, 182, 183).

En el caso de los AINEs (como el naproxeno), estos fármacos actúan inhibiendo la producción de los metabolitos del ácido araquidónico como las prostaglandinas y tromboxanos, que son mediadores inflamatorios producidos localmente donde se origina la lesión celular. Además, el naproxeno también es capaz de alterar los

nociceptores periféricos y disminuir la concentración local de los metabolitos del ácido araquidónico, presentando, por tanto, efecto anti-inflamatorio y analgésico (184, 185).

El uso del naproxeno está muy extendido, debido a que presenta efecto anti-inflamatorio y analgésico administrándose principalmente por vía oral, lo que ocasiona efectos secundarios a nivel sistémico. En cambio, su administración local permite alcanzar altas concentraciones en el punto de origen del proceso inflamatorio, produciendo una disminución más efectiva de la inflamación y disminuyendo los efectos secundarios. Son varios los estudios que demuestran la eficacia de los AINEs administrados intraarticularmente en la rodilla de pacientes postquirúrgicos para control del dolor (186, 187), sin embargo, el efecto que pueden tener sobre los tejidos articulares es un tema muy discutido, sobre todo en un patrón de osteoartrosis (188).

Aunque existen varios estudios en la bibliografía que valoran el efecto local de los AINEs en los tejidos blandos articulares, los resultados son muy variados. Se ha observado un aumento de la inflamación tisular tras el uso de AINE intraarticular y un aumento de glicerol, que es un marcador de daño celular, lo que sugiere un efecto tóxico sobre los tejidos (189, 190). Sin embargo, en otros estudios no se han observado alteraciones tisulares tras la administración intraarticular de ketorolaco en rodillas sanas de conejo y de rata (191, 192). Así pues, son datos contradictorios los que se observan en la bibliografía respecto al uso intraarticular de AINEs. Además, son muy pocos los estudios realizados en seres humanos, y aunque se observa mejoría del dolor en pacientes con osteoartrosis de rodilla (193-195) o dolor postquirúrgico (196-198) no existen estudios de toxicidad para el cartílago articular por lo que la infiltración intraarticular de AINEs en la práctica clínica habitual está muy limitada.

En este trabajo se propone el uso de hidrogeles inyectables con estructura de red semi-IPN y capaces de gelificar *in situ* una vez infiltrados, como vehículos de fármacos anti-inflamatorios con el objetivo de regular la liberación del producto y así aumentar la biodisponibilidad del mismo en la articulación mejorando su efecto a nivel local y disminuyendo sus efectos tóxicos sistémicos.

## 2. Hinchamiento y degradación de los hidrogeles

Los hidrogeles contienen entre un 20 – 90 % de su peso en agua, si bien, pueden presentar valores superiores. La capacidad de hinchamiento de los hidrogeles es una indicación del grado de hidrofilia y está influenciada por el tamaño del poro del hidrogel (199). Esta característica influye en el comportamiento celular (200).

Frecuentemente, los hidrogeles se diseñan para degradarse dentro del cuerpo después de su implantación a una velocidad similar a la tasa de formación del nuevo tejido. La degradación del hidrogel en condiciones fisiológicas es una herramienta útil que permite controlar el remplazo del andamio por nueva MEC de forma que rellene u ocupe las porciones degradadas del hidrogel. La degradación de los hidrogeles se puede inducir mediante el uso de enzimas o productos químicos, entre otros (138, 200).

En la presente tesis, cuando los hidrogeles se sumergen en fluido fisiológico simulado se observa que en las primeras 4 h se produce una ganancia en peso del hidrogel como consecuencia de la absorción de agua del medio y posteriormente, se produce una pérdida de peso como consecuencia de la degradación del propio hidrogel y por consiguiente liberación del fármaco. La pérdida de peso como consecuencia de la degradación fue más acusada para el hidrogel sin cargar y para el hidrogel cargado con naproxeno (que se degradaron a los 14 días del estudio) en comparación a la obtenida con el hidrogel que contenía dexametasona (que se mantuvo hasta prácticamente 30 días sumergido en el fluido fisiológico simulado). De forma general, se puede decir que los hidrogeles tanto sin cargar como cargados con fármacos anti-inflamatorios resultan más estables, periodos de tiempo comprendidos entre 2 y 4 semanas de estudio dependiendo del tipo de fármaco cargado, que sistemas homólogos publicados en la bibliografía. Por ejemplo, en el estudio de Kurisawa y col., sobre la degradación de hidrogeles de gelatina y dextrano con una estructura de red IPN, se produce una degradación del hidrogel aproximadamente en las primeras 24 h (201). Y con relación a hidrogeles cargados con corticoide, Fan y col., observan una degradación de un hidrogel de AH y furano con dexametasona en un periodo de estudio de 21 días (202). Por tanto, atendiendo a la estabilidad del sistema hidrogel/fármaco observada en este trabajo, se puede afirmar que los hidrogeles cargados con dexametasona (H-Dexa) son más estables y alentadores a la hora de su aplicación en la regeneración de defectos de cartílago que precisen tiempos mínimos de un mes para ser reparados satisfactoriamente. No obstante, la degradación de los hidrogeles cargados con dexametasona preparados en este trabajo, debería estudiarse a tiempos superiores a 1 mes ya que a ese periodo de tiempo todavía los sistemas muestran una buena estabilidad dimensional y previsiblemente van a resultar estables en tiempos superiores.

### **3. Liberación *in vitro* de los anti-inflamatorios**

La ingeniería de tejidos y la liberación controlada de principios activos son dos disciplinas que se encuentran íntimamente relacionadas. Por este motivo, resulta

fundamental el análisis de las cinéticas de liberación de los principios activos con el fin de valorar la capacidad de control del soporte/vehículo en su liberación al medio fisiológico. Con esta finalidad, en este trabajo se han analizado las cinéticas de liberación de los dos fármacos anti-inflamatorios de sus respectivos hidrogeles (H-Nap y H-Dexa).

En el perfil de liberación del naproxeno se observa una liberación rápida inicial, alcanzando la liberación del 100 % del fármaco cargado dentro de las primeras 24 h. Estos resultados se correlacionan con los publicados en el trabajo de Peng y col., autores que estudian la liberación de naproxeno de hidrogeles de quitosano con nanotubos de carbono, en la que observan una liberación de más del 50 % del fármaco en los primeros 30 min y concluyen que es difícil controlar la liberación de naproxeno mediante esos sistemas (203).

En el caso de los hidrogeles H-Dexa la liberación de la dexametasona se produce de forma controlada, obteniéndose una liberación del 22 % del medicamento cargado en un periodo de 1 día, para después estabilizarse en el tiempo. El perfil de liberación se asemeja al obtenido en el estudio de Fan y col., donde el 26 % de la dexametasona cargada en un hidrogel de AH se libera en 24 h, y después se estabiliza en forma de meseta (202).

De los resultados de liberación en general se puede concluir que la liberación del fármaco y la degradación del hidrogel son dos factores íntimamente relacionados, ya que en el caso de la dexametasona, la degradación del hidrogel es más lenta perdurando el mismo hasta 30 días de estudio y produciéndose la liberación de este fármaco de una manera controlada, mientras que en el caso del naproxeno la degradación del hidrogel se aproxima a la del mismo sin cargar y el medicamento es liberado en 24 h. Esta correlación entre medicamento y estructura del hidrogel podría ser debida a la existencia de diferentes interacciones entre el fármaco y los polisacáridos integrantes de la red semi-IPN, sin descartar otros factores como la naturaleza hidrofóbica/hidrofílica del fármaco y el tamaño molecular del mismo, factores que deberían ser analizados en mayor profundidad en estudios posteriores. Además, en caso de ser necesario, sería posible mejorar el control de la liberación del medicamento mediante su incorporación a la red semi-IPN encapsulado en micro-, o nanopartículas y por otra parte, también resultaría posible modular la degradación del hidrogel dependiendo del tipo de fármaco incorporado, mediante la optimización de diferentes parámetros físico-químicos de la red semi-IPN.

#### 4. Comportamiento celular *in vitro* de los hidrogeles

Los ensayos de citotoxicidad son capaces de detectar los efectos adversos de una sustancia en relación con la supervivencia celular, proliferación y función celular (204).

La respuesta biológica de los hidrogeles inyectables se evaluó en primer lugar *in vitro* siguiendo las recomendaciones de la Norma UNE-EN ISO 10993-5, con el objetivo de valorar la proliferación celular en una estirpe celular propia del tejido de aplicación de las formulaciones y así prever su comportamiento *in vivo* con las células propias del cartílago hialino.

El uso de los ensayos MTT y AB para evaluar la citotoxicidad y viabilidad celular en los hidrogeles está muy extendido debido a que son métodos sencillos (200, 205), y utilizan compuestos no tóxicos para las células, lo que hace que sean de los más empleados para determinar la citotoxicidad celular (206, 207).

Mediante el empleo de MTT se realizó un estudio directo de **citotoxicidad del dextrano oxidado** (DEX70-ox(40%)) en células genéricas durante 24 h, observándose una viabilidad celular del 50 % a concentración de 20 mg/mL (es decir,  $IC_{50} = 20$  mg/mL). Estos datos obtenidos concuerdan con los obtenidos en la literatura, donde se observa una baja citotoxicidad del dextrano oxidado en comparación con otros químicos como el glutaraldeído, lo que hace que sea muy útil como agente entrecruzante (168, 208-210). La concentración de DEX70-ox(40%) empleado en las formulaciones fue de 50 mg/mL. Teniendo en cuenta que debe entrecruzarse con la gelatina es de esperar que la concentración residual de grupos aldehído después de la reacción de entrecruzamiento se reduzca notablemente, lo que se ha comprobado en el estudio de la citotoxicidad de los hidrogeles como se detalla más adelante en esta discusión.

En el estudio directo de **citotoxicidad directo de los anti-inflamatorios**, este se realizó con distintas concentraciones de naproxeno en contacto con condrocitos observándose una viabilidad celular del 80 % a concentraciones de 1 mg/mL, disminuyendo rápidamente a mayores concentraciones, obteniéndose un valor de  $IC_{50}$  del naproxeno a una concentración de 1,62 mg/mL. Sin embargo, el cálculo de la  $IC_{50}$  no se pudo realizar en presencia de dexametasona aplicando las condiciones empleadas en la citotoxicidad del naproxeno dado que es muy insoluble en agua, siendo necesario modificar químicamente su estructura para realizar este estudio.

El ensayo MTT también se empleó para valorar la citotoxicidad de los diferentes hidrogeles de AH, mediante estudio indirecto, de los **lixiviados** obtenidos de los

hidrogeles con y sin fármaco demostrándose que ninguno de ellos es tóxico ni frente a los condrocitos ni frente a osteoblastos. Se observa que los hidrogeles sin cargar no presentan toxicidad celular alguna dando valores de viabilidad celular entre 100 – 80 %, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Hozumi y col., en el estudio de citotoxicidad de hidrogeles de gelatina y ácido hialurónico (211). En los hidrogeles en presencia de fármaco (H-Nap y H-Dexa), se produce una discreta disminución de la viabilidad celular en presencia de naproxeno y con unas cifras discretamente mayores en el estudio de condrocitos (aunque siempre dando valores de viabilidad cercanos al 80 %), observándose una recuperación de la viabilidad con el paso de los días. El descenso inicial puede estar en relación con la concentración de fármaco liberado en las primeras 24 h como se ha comprobado en el estudio de liberación, pero en cualquier caso sin llegar a comprometer la viabilidad celular. En presencia de todos los lixiviados de H-Dexa, se observa elevada viabilidad celular tanto en condrocitos como en osteoblastos, resultados similares a los que obtiene Zhang y col. quienes valoran la citotoxicidad en condrocitos de hidrogeles con dexametasona en comparación con dexametasona aislada, observándose que dichos hidrogeles no son tóxicos y que además, la citotoxicidad disminuye considerablemente en comparación con el uso único de dexametasona (177).

En relación al **estudio de adhesión y proliferación celular** con AB de los hidrogeles de AH con o sin fármaco, este se realizó a 14 días de seguimiento. En ambas estirpes celulares se observa cómo el hidrogel con AH favorece la adhesión celular y mantiene una proliferación celular del 100 % en todo el tiempo del estudio, resultados similares a los obtenidos por Wu y col., donde defienden que los hidrogeles de AH, además de no ser citotóxicos estimulan la proliferación celular (212). Ante la presencia de dexametasona las células presentan una viabilidad cercana al 100 %. En cambio, en presencia de naproxeno se produce un discreto descenso de la proliferación en las primeras 48 h para después aumentar y estabilizarse en una viabilidad del 100 %, lo que se correlaciona con la mayor liberación de naproxeno en las primeras horas como se ha comentado previamente en el ensayo de citotoxicidad, que puede, de alguna manera en este caso, impedir o extorsionar la adhesión y la proliferación de las células en el hidrogel, pero sin llegar a comprometer la viabilidad celular inicial.

## 5. Respuesta *in vivo* de las formulaciones inyectable

### 5.1 Modelo experimental

Con el fin de estudiar la respuesta *in vivo* de los hidrogeles diseñados en la primera parte, estos fueron inyectados intraarticularmente en un modelo experimental de osteoartrosis realizado mediante la infiltración intraarticular de colagenasa en las rodillas de conejos adultos jóvenes de la raza Nueva Zelanda.

### 5.2 El animal de experimentación

El animal de experimentación elegido fue el conejo. Aunque hay que tener en cuenta que ningún modelo animal reproduce al 100 % la patología y la regeneración osteocondral del humano, el conejo es una alternativa aceptable para realizar las primeras fases de los estudios *in vivo*.

Las principales limitaciones con las que nos encontramos al usar el conejo como modelo experimental (y que hay que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos) son las siguientes:

- La articulación de la rodilla del conejo es bastante más pequeña que la humana, y además presenta un cartílago hialino mucho más fino y delgado, lo que limita el tamaño y profundidad de los defectos del cartílago articular que se puedan realizar (213, 214).
- La rodilla de los conejos se ve sometida a condiciones de carga articular que difieren de la rodilla del ser humano, ya que presentan un alto grado de flexión lo que hace que la rótula esté sometida a una carga parcial (213-215).
- En humanos, el compartimento medial de la rodilla es la que absorbe mayor proporción de cargas, de ahí que sea el compartimento más afectado en la osteoartrosis. Sin embargo en los conejos, es el compartimento femorotibial externo el que soporta mayor cantidad de cargas, sobre todo durante el salto (216).

A pesar de las limitaciones comentadas previamente se eligió el conejo como animal de experimentación debido a las siguientes características:

- Aunque el tamaño de la articulación es pequeño, las proporciones de la rodilla son suficientes como para poder realizar procedimientos quirúrgicos

disminuyendo el riesgo que puede aparecer al realizarlos en animales de menor tamaño (213).

- Es un modelo experimental muy estudiado en la literatura en la que se conocen muy bien los procesos de regeneración de lesiones osteocondrales en este animal, por lo que se pueden realizar comparaciones con nuestro estudio.
- Además, presenta bastante similitud con el ser humano en relación a la distribución de las capas del cartílago articular de la rodilla (217), observándose que los cambios histológicos que se producen en la rodilla del conejo sometida a proceso experimental de osteoartrosis, es muy similar a los cambios que se producen en la rodilla del ser humano (218).
- Presenta un fácil manejo, se puede estabular en jaulas en un espacio pequeño y presenta un costo relativamente bajo en cuanto a la compra como en el cuidado en comparación con otros animales de experimentación. Además se trata de un animal dócil, lo que facilita su manejo en la fase experimental (213).

### 5.3 Creación del modelo experimental de osteoartrosis

Son varios los métodos descritos en la bibliografía para la creación de OA. Entre ellos se encuentran aquellos que producen una lesión de los meniscos o ligamentos cruzados (153, 177, 219, 220) siendo procedimientos que conllevan un acto quirúrgico y por tanto mayor tiempo y mayor morbilidad para el animal de experimentación. Es por eso que se han desarrollado modelos de OA creados mediante la infiltración de sustancias intraarticulares tóxicas para el cartílago articular, como la papaína o la colagenasa. Para producir un modelo de OA mediante la inyección de papaína se necesitan grandes cantidades de dicha sustancia y además no está claro el procedimiento por el que se produce la osteoartrosis (221), en cambio son múltiples los estudios existentes en la bibliografía en los que, mediante la infiltración de colagenasa, se induce un patrón bien conocido de osteoartrosis, tratándose de un procedimiento mínimamente invasivo, fácilmente reproducible y menos doloroso para el animal de experimentación (222-224).

En este trabajo, se decidió realizar un modelo experimental de OA mediante la infiltración de colagenasa intraarticular, siguiendo las pautas de Kikuchi y col. (225). En este estudio los autores observaron un aumento de la concentración de colagenasa en el cartílago con OA en comparación con el cartílago normal, probablemente debido a la

presencia de factores inflamatorios. Esto sugiere que los factores químicos están relacionados con la progresión de la destrucción del cartílago articular, por lo que estudiaron la posibilidad de crear un modelo experimental de OA mediante un mecanismo enzimático tras la administración intraarticular de colagenasa. Estos autores realizaron un estudio con distintas concentraciones de colagenasa (0,5 mL, 1 mL y 2 mL) intraarticularmente, observándose que con la inyección de 0,5 mL de colagenasa en 2 dosis separadas 3 días entre ellas era suficiente para provocar signos incipientes de OA en 6 semanas de estudio. Observaron que la degeneración del cartílago se debía a la digestión directa del colágeno y a la reacción inflamatoria generada, observándose un patrón de OA similar al que se produce en el humano (225).

Son varios los estudios publicados que emplean este método, aunque varía la concentración de colagenasa infiltrada desde 0,1 mL hasta 1 mL (131, 226-228). En nuestro estudio empleamos una dosis de 0,3 mL de colagenasa, para evitar mayor toxicidad y efectos secundarios en el conejo, y realizamos 3 infiltraciones de colagenasa para asegurar la obtención de un patrón de OA.

#### **5.4 Análisis macroscópico de las muestras**

En el estudio macroscópico se pudo observar que las rodillas del grupo II, infiltradas con 2 dosis de colagenasa, presentaban tumefacción articular, hipertrofia de la cápsula articular, así como mínima fibrilación del cartílago articular con una lesión grado 2 según la clasificación de Yosioka. En cambio, tras la infiltración de 3 dosis de colagenasa se pudo observar mayor grado de tumefacción e hipertrofia de la membrana sinovial, hemartros y mayor afectación condral con una lesión grado 3 en la clasificación de Yosioka, sin llegar a exponer el hueso subcondral. En fases más avanzadas, es decir, el grupo de OA sin tratamiento (grupo IV de estudio) los cambios degenerativos fueron más severos, presentando mayor afectación del cartílago articular y observándose la presencia de osteofitos tibiales, así como mayor afectación de las partes blandas con mayor grado de fibrosis e hipertrofia capsular, resultados similares a los obtenidos por Kikuchi y col. en la formación de OA (225).

Aquellas rodillas con OA y tratadas con el H-Nap (grupo V de estudio) presentaban menor grado de hipertrofia capsular, fibrosis de partes blandas y hemartros que la OA evolucionada sin tratamiento, sin observarse osteofitos y con menor afectación del cartílago articular (grado 2 de Yosioka). En cambio, en el grupo VI (rodillas tratadas con H-Dexa) se observó mayor fibrosis de partes blandas pero menos afectación macroscópica del cartílago que en el grupo anterior.

## 5.5 Análisis microscópico de las muestras

Tras la disección y resección en bloque de las rodillas, estas se sumergieron en formol y posteriormente fueron decalcificadas y procesadas para la inclusión en parafina. Una vez realizados los cortes se decidió realizar una tinción de hematoxilina/eosina (para la valoración de la estructura del cartílago, así como la celularidad e integridad del *tidemark*) además de la tinción con Safranina-O/verde (para evaluar los componentes de la matriz extracelular y así determinar el grado de degeneración articular). El uso de estas tinciones se encuentra apoyado por numerosos estudios publicados con anterioridad (131, 225, 229). Además, se llevó a cabo el estudio inmunohistoquímico para la detección de colágeno tipo II con el objetivo de valorar la calidad de la matriz extracelular sintetizada por los condrocitos, lo que nos permite asignar características de cartílago hialino y distinguir la MEC del tejido fibroso de reparación sintetizado por los fibroblastos (230).

### 5.5.1 Patrón de osteoartrosis

En condiciones normales, los condrocitos presentan una disposición en columnas y capas, rodeados de MEC rica en proteoglicanos y por tanto con una tinción homogénea con SO/V. Además, el hueso subcondral está en continuidad con el cartílago calcificado y presenta una vascularización normal (5, 37) características que observamos en el **grupo I** de estudio donde solo se infiltró PBS. En relación con los resultados obtenidos de inmunotinción frente al colágeno tipo II, en el grupo I se observa su distribución de forma inalterada en toda la MEC del cartílago hialino.

Las rodillas del **grupo II**, infiltradas con 2 dosis de colagenasa, presentaron una ligera alteración del cartílago articular, mostrando pequeñas hendiduras en zonas muy localizadas de la superficie articular, y una leve disminución del grosor del cartílago pero sin observarse ningún fragmento desprendido. En relación con la celularidad, los condrocitos presentaban una morfología normal y una distribución en columnas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kikuchi y col. tras la infiltración de 2 dosis de 0,5 mL de colagenasa, aunque en su estudio, los autores también observaron una disminución en el número de condrocitos y una alteración en la composición de la MEC (225).

En el grupo de formación de OA con 3 infiltraciones de colagenasa (**grupo III**) se observaron fisuras en la superficie articular con pérdida de células de la capa más superficial, así como fragmentos de cartílago desprendidos. Además, se observó una

alteración de la distribución de las células presentando una hiperreactividad celular e hiperplasia. La MEC presentó ausencia de tinción de SO en la capa más superficial, lo que indica una pérdida de proteoglicanos a este nivel, en cambio se observa tinción en las capas más profundas (127, 225, 229). Esta pérdida de proteoglicanos en capas superficiales produce una alteración en las características mecánicas del cartílago articular (231, 232). Además, en el grupo III se observó una ausencia de marcaje inmunohistoquímico en la mayor parte de la MEC debido a la pérdida de colágeno tipo II, detectándose únicamente en la capa profunda en transición con el hueso subcondral, características que se observan en un patrón de osteoartrosis establecido (233-235).

En el **grupo IV** de OA evolucionada sin tratamiento se observó un patrón de OA severo con pérdida de condrocitos en la zona superficial y una desorganización de los mismos formando condronas hiperplásicas, adelgazamiento considerable del cartílago articular y con fisuras condrales de mayor profundidad alcanzando la *tidemark* y afectando el hueso subcondral. En la tinción de Safranina-O/verde rápido se observó una reducción importante de la coloración de la matriz, debido a la ausencia de proteoglicanos del cartílago. En relación a la detección inmunohistoquímica de colágeno tipo II se observó una ausencia prácticamente total del marcaje del cartílago articular evidenciando una evolución de la osteoartrosis. Estos resultados de OA tras la administración de colagenasa son similares a los publicados en la bibliografía por diferentes autores (131, 222, 225).

Ante los hallazgos microscópicos que hemos observado se puede concluir, que las distintas etapas de la OA presentan diferencias histológicas en la degeneración del cartílago articular.

- En las etapas iniciales se observa una superficie articular más irregular y con pequeñas hendiduras o fisuras en la capa superficial debido a la lesión producida en la red de colágeno, lo que altera la rigidez del tejido y modifica la respuesta a las cargas mecánicas (43, 236). Además se produce mayor proporción de células mononucleares, mayor formación de vasos y un aumento de la cantidad de colágeno tipo I, lo que refleja que el cartílago articular intenta crear un tejido de reparación, pero se trata de fibrocartílago disminuyendo así las características mecánicas del mismo (237-239).
- A medida que progresa la enfermedad, las irregularidades condrales se hacen más grandes y aparecen fisuras verticales, que llegan hasta capas más profundas, dejando expuesto el hueso subcondral en estadios finales (229). Además se ven condrocitos en apoptosis cerca de las zonas de fibrilación, lo

que hace que disminuya significativamente la celularidad en las capas más superficiales, produciéndose también alteraciones en la MEC (229). En fases más evolucionadas de osteoartrosis se produce un aumento de colágeno tipo X presentado un papel importante en el soporte estructural del cartílago articular y se relaciona con los condrocitos hipertróficos presentes en la fase de degeneración (12).

Por tanto, podemos decir que en la evolución de OA se produce primero un reblandecimiento del cartílago articular progresando a la fibrilación articular y por último fisuras de distinta profundidad (37) y en las que se producen las siguientes alteraciones histológicas (240):

- Neovascularización.
- Agrupamiento de condrocitos, e hipertrofia de los mismos.
- Fisuración de la matriz de colágeno y fibrilación del cartílago articular.
- Duplicación de *tidemark* en la unión del cartílago calcificado y no calcificado.
- Remodelación ósea.
- Necrosis celular.

### 5.5.2 Tratamiento de la osteoartrosis con los hidrogeles con estructura de red semi-IPN

En la literatura existe controversia en relación a la eficacia y seguridad de la infiltración intraarticular de AINE dada la posible toxicidad celular que pueda ocasionar. Además, en los distintos estudios que valoran la acción de un mismo fármaco se observan resultados contradictorios, como por ejemplo en el uso de ketorolaco intraarticular en un modelo experimental de osteoartrosis donde para unos investigadores es un fármaco seguro ya que no afecta el cartílago articular ni histológica ni mecánicamente (192) mientras que para otros produce cambios histopatológicos leves consistentes en la aparición de células inflamatorias de la membrana sinovial y leve hipertrofia de la misma, aunque defienden su uso como un fármaco seguro (241).

En relación con el uso de naproxeno mediante infiltración intraarticular como tratamiento para la osteoartrosis hay muy poco descrito en la bibliografía. En el estudio de Dief y col., se observa una mejoría del dolor tras la infiltración intraarticular de naproxeno respecto al grupo control, y desde el punto de vista histológico, se produce

una infiltración de células inflamatorias en el cartílago articular menos intensa que las no tratadas, aunque seguían manteniendo un cartílago articular adelgazado y con una superficie articular irregular (242).

En nuestro estudio, en el grupo tratado con H-Nap (**Grupo V**), se observa que no ha progresado la OA como en el grupo control y se aprecia una relativa respuesta de reparación del cartílago ya que, aunque se observan condronas hiperplásicas, estas se encuentran localizadas en las capas más profundas del cartílago, observándose zonas de proliferación de condrocitos formando racimos así como una hipertrofia celular, lo que indica un intento de reparación (229, 243-245). Además, el cartílago articular mantiene un grosor similar al fisiológico y no se produce afectación del hueso subcondral ni de *tidemark*. Esto se debe a que, en fases iniciales de la osteoartrosis, esta línea se encuentra respetada, afectándose en estadios más avanzados (134).

En este grupo de estudio también se observa un aumento de la proporción de proteoglicanos en la MEC que puede estar en relación con que el hidrogel de AH proporciona un andamiaje que estimula la biosíntesis de MEC por parte de los condrocitos (64). Se observa un aumento de la vascularización que penetra en el cartílago, fenómeno que en condiciones normales no ocurre, y que es una reacción tisular frente a la OA. Por otro lado, en el estudio inmunohistoquímico en el grupo V se observó un aumento en el marcaje de colágeno tipo II en comparación con los grupos anteriores, lo que refleja un intento de recuperación y reparación de la MEC del cartílago dañado.

La membrana sinovial es un tejido activo que genera factores inflamatorios que pueden afectar la integridad del cartílago articular cuando la articulación sufre una agresión (246). Como por ejemplo las citoquinas inflamatorias que aumentan la producción de metaloproteinasas de la matriz extracelular que degradan los proteoglicanos. Se ha observado que la presencia de dexametasona intraarticular puede restablecer el equilibrio en los mediadores inflamatorios, disminuyendo la activación de las metaloproteinasas y aumentando la proporción de proteoglicanos de la MEC, protegiendo así el cartílago articular (247).

También se ha descrito que la infiltración intraarticular con corticoides puede generar alteraciones en el cartílago articular, tanto aumentando las fisuras como disminuyendo la proporción de proteoglicanos (229). En cambio, nuestros resultados difieren de los de este artículo. En el grupo de estudio tratado con el H-Dexa (**Grupo VI**) observamos una conservación relativa del cartílago articular en comparación con el grupo de OA sin tratamiento. Se observa adelgazamiento muy leve de la superficie articular, y con

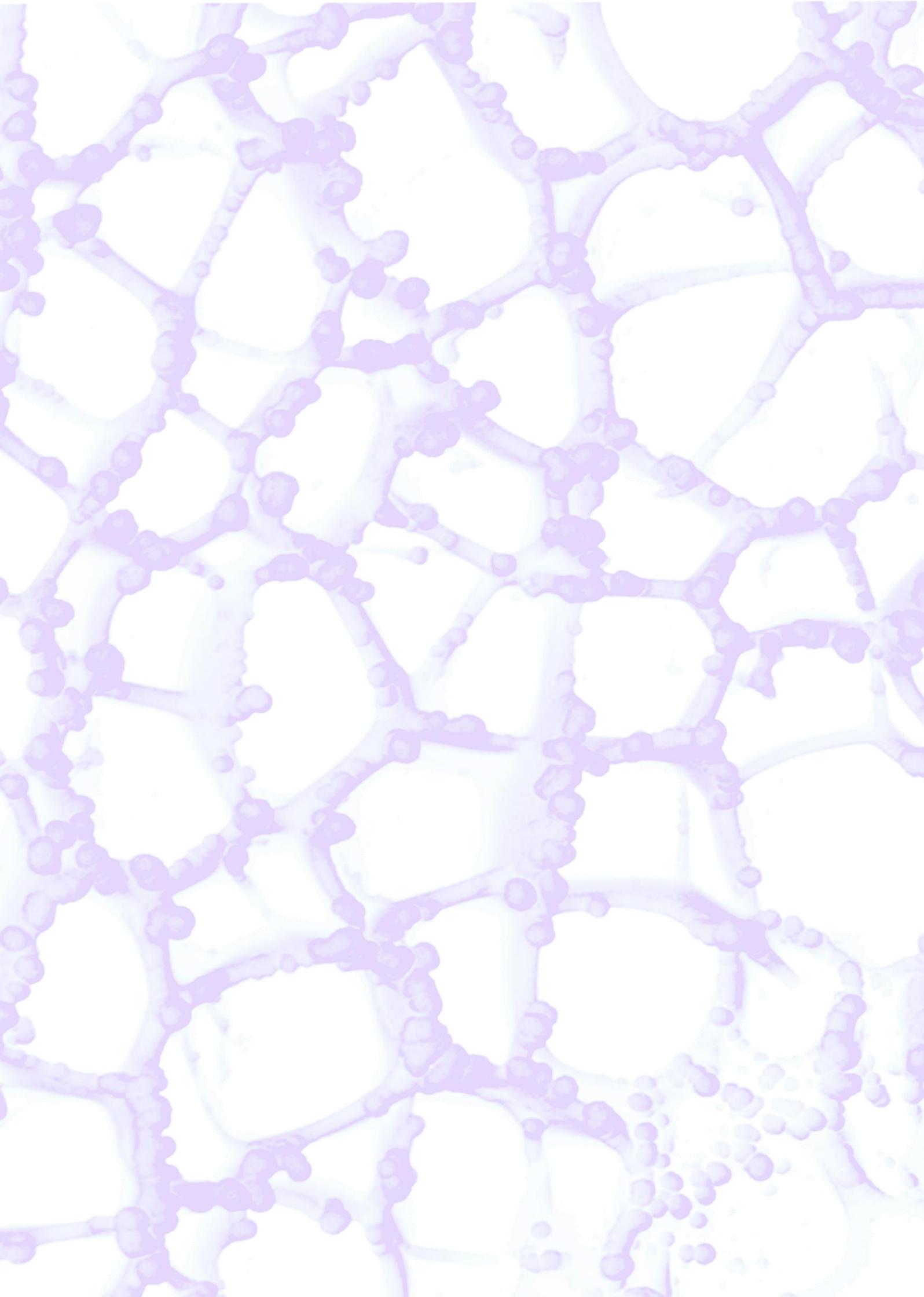
escasas fisuras de poca profundidad. Además, los condrocitos se muestran desorganizados formando condronas hiperplásicas pero en capas más superficiales, lo que podría relacionarse con una respuesta de reparación tisular, pero en menor proporción que en el grupo tratado con naproxeno, dado que la maduración en la disposición de los condrocitos es menor. Aunque se observa alterado el grosor del cartílago y la organización de las distintas capas del cartílago (pero menos que los grupos no tratados), la vascularización del hueso subcondral es normal sin presentar alteraciones ni en el número de vasos ni en su localización. Y, por último, en la tinción de la MEC con safranina se observa una disminución de la misma en las capas superficiales del cartílago lo que indica ausencia de proteoglicanos. Sin embargo, se aprecia coloración en la capa más profunda, la calcificada. Estos resultados son similares a los encontrados en un modelo experimental de OA en ratas tratadas con hidrogel inyectable de AH y dexametasona (177). En relación con el estudio inmunohistoquímico de colágeno tipo II, se aprecia un aumento en el marcaje en el territorio intercelular que delimita y rodea a la condronas, lo que parece indicar que en este grupo se produce una mayor respuesta reparadora del cartílago articular. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio de Zhang y col. (177), donde se observó una mayor proporción de colágeno tipo II en los animales tratados con hidrogeles portadores de dexametasona. Estos hallazgos pueden deberse a la capacidad de la dexametasona de disminuir la reacción inflamatoria y la producción de metaloproteinasas dando lugar a un aumento en la expresión de colágeno tipo II (177, 183, 248).

Aunque el desarrollo de estos hidrogeles ha sido un gran avance en la ingeniería tisular de tejido cartilaginosa, todavía existen límites que restringen la regeneración total del cartílago articular. Una de las limitaciones es la rápida degradación de los hidrogeles antes de que puedan ser reemplazados por la matriz extracelular, ya que se estima una semivida de degradación de unas 6 semanas *in vivo* de un hidrogel de red semi-interpenetrada e inyectable, comprometiendo la estabilidad mecánica del hidrogel y limitando la eficacia terapéutica a largo plazo (167, 249), por lo que los últimos estudios van orientados a mejorar los tiempos de degradación. Además, en los últimos años se han desarrollado andamios multicapa de colágeno (no inyectables) que imitan la composición en estratos del tejido osteocondral integrando tres capas con distintas propiedades: una capa profunda compuesta por colágeno tipo I e hidroxapatita que estimularía la reparación ósea, una capa intermedia rica en colágeno y AH, y una capa superficial formada por colágeno tipo I y II, AH y GAG que estimularía la reparación del cartílago articular, observándose buenos resultados iniciales en estudios *in vivo* (250).

El hidrogel de gelatina y ácido hialurónico es uno de los biomateriales más estudiados en la ingeniería tisular y en procesos regenerativos debido a su carácter bioactivo y biodegradabilidad en el cuerpo humano. Estas características junto con la posibilidad de aplicarse de forma mínimamente invasiva o inyectable, originan que estos sistemas sean muy interesantes en el campo de la regeneración tisular y la administración de fármacos de forma selectiva, más particularmente, en la regeneración de cartílago originada por osteoartrosis.







The background of the slide features a microscopic view of plant cells, likely from an onion skin, showing a network of cell walls. A semi-transparent purple overlay covers the bottom portion of the image, containing the chapter title. A faint, light-colored hexagonal grid pattern is visible within the purple overlay area.

# Capítulo 7

## Conclusiones

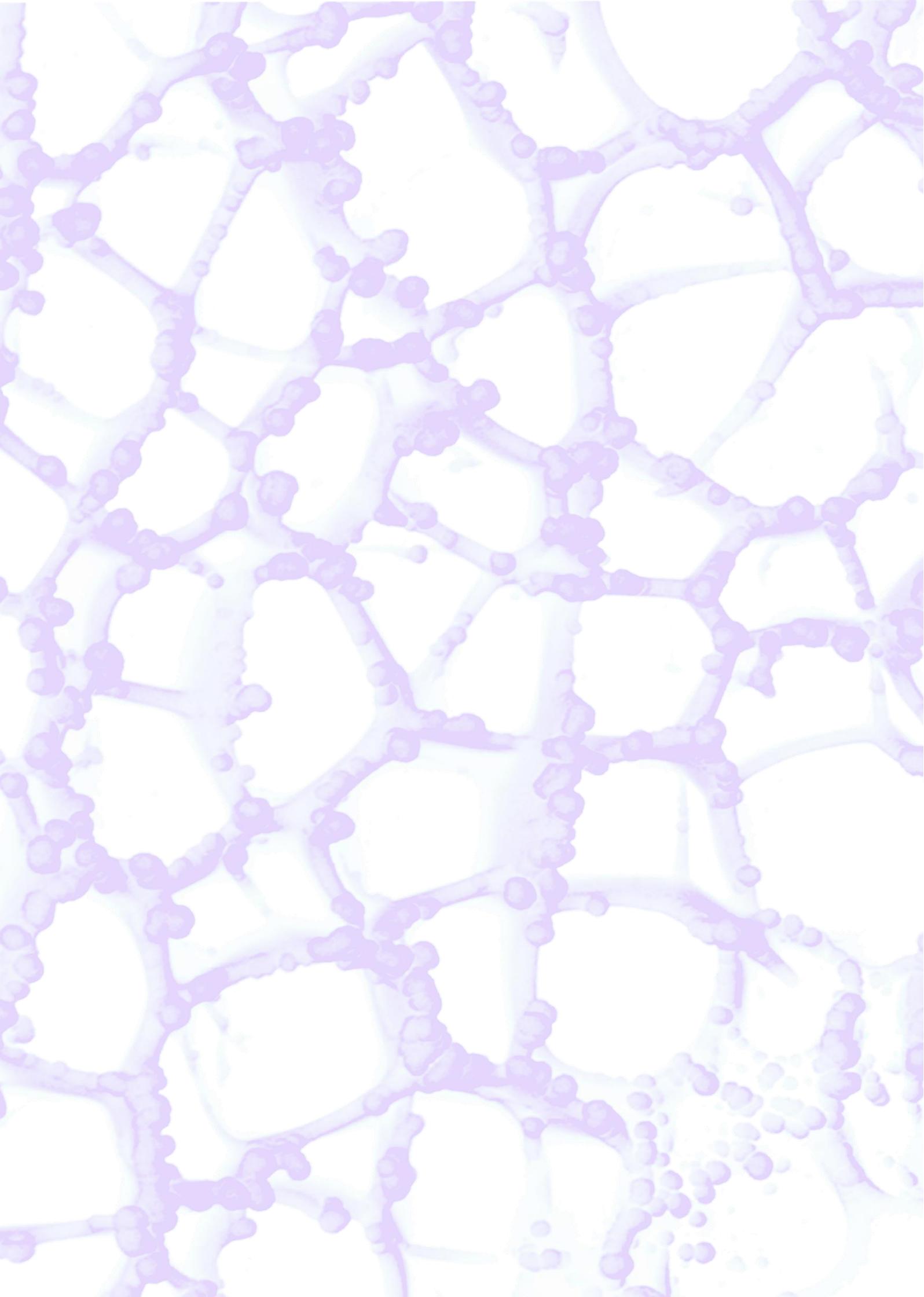


Los resultados obtenidos en la presente tesis llevan a las siguientes conclusiones:

1. Los hidrogeles inyectables portadores de fármacos anti-inflamatorios basados en gelatina y ácido hialurónico con estructura de red semi-IPN presentan propiedades adecuadas para ser considerados en la aplicación de tratamientos de osteoartrosis utilizando métodos mínimamente invasivos.
2. La liberación del fármaco y la degradación *in vitro* del hidrogel son dos factores que se encuentran íntimamente relacionados. Así, el hidrogel cargado con dexametasona es estable en 30 días de estudio produciéndose una liberación controlada del fármaco, mientras que el hidrogel cargado con naproxeno se degrada en un periodo de 2 semanas liberando el medicamento en las primeras horas.
3. Los hidrogeles inyectables desarrollados no son tóxicos frente a condrocitos ni osteoblastos y además estimulan la proliferación y adhesión celular en ambas estirpes celulares, según los resultados *in vitro*.
4. El modelo animal utilizado es reproducible y apropiado para estudiar el proceso de reparación del cartílago articular, así como el efecto de distintos fármacos administrados intraarticularmente.
5. La inyección intraarticular de hidrogel de AH con dexametasona evita la progresión de osteoartrosis inducida por colagenasa.
6. La inyección intraarticular de hidrogel de AH con naproxeno, además de evitar dicha progresión induce una respuesta reparativa en el cartílago articular. No obstante, este fármaco no es capaz de producir una regeneración del cartílago articular dañado.
7. La inyección intraarticular de los hidrogeles de ácido hialurónico desarrollados en la presente tesis, constituye una prometedora herramienta para la vehiculización de fármacos en el tratamiento de la osteoartrosis de rodilla.









# Capítulo 8

## Bibliografía



1. Decker RS, Koyama E, Pacifici M. Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(6):407-14.
2. Wei M, Liu Y. [Clinical effects of arthroscopic microfracture on osteochondral lesions of the talus]. *Zhongguo Gu Shang.* 2017;30(8):751-4.
3. Kornilov NN, Denisov AA. [A paradigm of early gonarthrosis: a review of the current diagnostic and treatment options (Part 1)]. *Ter Arkh.* 2017;89(12. Vyp. 2):238-43.
4. Bobinac D, Spanjol J, Zoricic S, Maric I. Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. *Bone.* 2003;32(3):284-90.
5. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008;87:77-95.
6. Ross MP, W., editor. Tejido cartilaginoso. *Histología: Ed. Médica Panamericana;* 2006.
7. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009;1(6):461-8.
8. Hunziker EB, Lippuner K, Shintani N. How best to preserve and reveal the structural intricacies of cartilaginous tissue. *Matrix Biol.* 2014;39:33-43.
9. Chevalier XRP. Cartílago articular normal: anatomía, fisiología, metabolismo y envejecimiento. *EMC, Aparato locomotor.* 2005;1(13):14-015.
10. Eyre DR, Wu JJ, Fernandes RJ, Pietka TA, Weis MA. Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(Pt 6):893-9.
11. Doan-Johnson S. Exploring the potencial of cartilage tissue engineering to restore joint damage. <http://www.orthopaedicsone.com>2011
12. Forriol Campos F. El cartílago articular: aspectos mecánicos y su repercusión en la reparación tisular. *Rev Ortop Traumatol.* 2002;5:380-90.
13. Corvol MT. The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2000;67(6):557-60.
14. Mayan MDC-F, P; Gago-Fuentes, R; Blanco, F.J. Articular Chondrocytes are physically connected through a cellular network that is responsible of the

- metabolic coupling between chondrocytes located in different layers of the tissue. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013;21:18-9.
15. Vega Alvarez JA. Biochemistry and biology of the articular cartilage. *Rev Ortop Traumatol*. 2002;5:391-400.
  16. Aigner T, Zhu Y, Chansky HH, Matsen FA, 3rd, Maloney WJ, Sandell LJ. Reexpression of type IIA procollagen by adult articular chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*. 1999;42(7):1443-50.
  17. Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech*. 1994;28(5):385-97.
  18. Vynios DH, Papageorgakopoulou N, Sazakli H, Tsiganos CP. The interactions of cartilage proteoglycans with collagens are determined by their structures. *Biochimie*. 2001;83(9):899-906.
  19. Bankoff A. Biomechanical Characteristics of the Bone. In: Goswami T, editor. *Human Musculoskeletal Biomechanics*2012.
  20. Neame PJ, Barry FP. The link proteins. *EXS*. 1994;70:53-72.
  21. Allison DD, Grande-Allen KJ. Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue Eng*. 2006;12(8):2131-40.
  22. Peppas NH, JZ.; Khademhosseini, A.; Langer, R. . Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Adv Mater*. 2006;18:1345-60.
  23. Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(4):1004-13.
  24. Lisignoli G, Grassi F, Zini N, Toneguzzi S, Piacentini A, Guidolin D, et al. Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan: evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1800-7.
  25. Mihara M, Higo S, Uchiyama Y, Tanabe K, Saito K. Different effects of high molecular weight sodium hyaluronate and NSAID on the progression of the cartilage degeneration in rabbit OA model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(5):543-9.

26. Diaz-Gallego L, Prieto JG, Coronel P, Gamazo LE, Gimeno M, Alvarez AI. Apoptosis and nitric oxide in an experimental model of osteoarthritis in rabbit after hyaluronic acid treatment. *J Orthop Res.* 2005;23(6):1370-6.
27. Guilak F, Mow VC. The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. *J Biomech.* 2000;33(12):1663-73.
28. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 6):889-97.
29. Chevalier X. [Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage]. *Presse Med.* 1998;27(2):75-80.
30. Pan J, Zhou X, Li W, Novotny JE, Doty SB, Wang L. In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *J Orthop Res.* 2009;27(10):1347-52.
31. Malinin T, Ouellette EA. Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000;8(6):483-91.
32. James CB, Uhl TL. A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. *J Athl Train.* 2001;36(4):413-9.
33. Weather PRB, H.G.; Daniels, V.G. *Functional Histology.* Livingstone C, editor 1987.
34. Haschek WR, C. Haschek and Rousseaux's *Handbook of Toxicologic Pathology* 2013.
35. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(1):E47-51.
36. Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med.* 2005;33(2):295-306.
37. Buckwalter JM, HJ. Articular cartilage, Part II: Degradation and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg (Am).* 1997;79A:608-12.

38. Frenkel SRDC, P.E. Degradation and repair of articular cartilage. *Frontiers in Bioscience*. 1999;4:671-85.
39. Madry H, Grun UW, Knutsen G. Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(40):669-77.
40. López-Armada MJC, B; Cillero-Pastor, B; Blanco Garcia, F.J. Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad? *Rev Esp Reumatol*. 2004;31(6):379-93.
41. Varady NH, Grodzinsky AJ. Osteoarthritis year in review 2015: mechanics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(1):27-35.
42. González APO-B, J.A; Pedregal, M; Azofra, M; Hermosilla, C; Mora, F. . Prevalencia de enfermedades osteoarticulares y consumo de recursos. Calidad de vida y dependencia en pacientes con artrosis. *Semergen*. 2011;37(9):462-67.
43. Ding M, Dalstra M, Linde F, Hvid I. Changes in the stiffness of the human tibial cartilage-bone complex in early-stage osteoarthrosis. *Acta Orthop Scand*. 1998;69(4):358-62.
44. Bai XS, Thomas JM, Ha AS. Surgical Correction of Articular Damage in the Knee: Osteoarticular Transplantation to Joint Reconstruction. *Semin Musculoskelet Radiol*. 2017;21(2):147-64.
45. Stadler N, Trieb K. Osteochondritis dissecans of the medial femoral condyle : New cell-free scaffold as a treatment option. *Orthopade*. 2016;45(8):701-5.
46. Brian JCG, H. Biologic Joint Reconstruction: Alternatives to arthroplasty. *J Sòrts Sci Med*. 2009;8(2):313.
47. Husted H, Schroder H, Odgaard A, Troelsen A. [Arthrosis of the knee - diagnosis and treatment]. *Ugeskr Laeger*. 2014;176(12).
48. Kerman HM, Deshpande BR, Selzer F, Losina E, Katz JN. Willingness of older adults to participate in a randomized trial of conservative therapies for knee pain: A prospective preference assessment. *Contemp Clin Trials Commun*. 2018;9:93-7.
49. Christensen BB, Olesen ML, Lind M, Foldager CB. Autologous Cartilage Chip Transplantation Improves Repair Tissue Composition Compared With Marrow Stimulation. *Am J Sports Med*. 2017;45(7):1490-6.
50. Alvarez ER, P; Restrepo, A; Forriol F. Revisión de la reparación del cartílago. Posibilidades y resultados. *Trauma Fund Mapfre*. 2010;21:117-34.

51. York PJ, Wydra FB, Belton ME, Vidal AF. Joint Preservation Techniques in Orthopaedic Surgery. *Sports Health*. 2017;9(6):545-54.
52. Gao L, Orth P, Muller-Brandt K, Goebel LK, Cucchiarini M, Madry H. Early loss of subchondral bone following microfracture is counteracted by bone marrow aspirate in a translational model of osteochondral repair. *Sci Rep*. 2017;7:45189.
53. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med*. 2009;37(10):2053-63.
54. Fuentes-Boquete IA, M.; Diaz, S.; Hermida, T.; Toro, F.; Blanco, F. Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular. *Reumatol Clin*. 2007;3(3):63-9.
55. Ribeiro VP, Pina S, Oliveira JM, Reis RL. Silk Fibroin-Based Hydrogels and Scaffolds for Osteochondral Repair and Regeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1058:305-25.
56. Akilbekova D, Shaimerdenova M, Adilov S, Berillo D. Biocompatible scaffolds based on natural polymers for regenerative medicine. *Int J Biol Macromol*. 2018;114:324-33.
57. Vannini F, Filardo G, Kon E, Roffi A, Marcacci M, Giannini S. Scaffolds for cartilage repair of the ankle joint: The impact on surgical practice. *Foot Ankle Surg*. 2013;19(1):2-8.
58. Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol*. 2009;27(5):307-14.
59. Welch T, Mandelbaum B, Tom M. Autologous Chondrocyte Implantation: Past, Present, and Future. *Sports Med Arthrosc*. 2016;24(2):85-91.
60. Giannini S, Buda R, Cavallo M, Ruffilli A, Cenacchi A, Cavallo C, et al. Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury*. 2010;41(11):1196-203.
61. Devitt BM, Bell SW, Webster KE, Feller JA, Whitehead TS. Surgical treatments of cartilage defects of the knee: Systematic review of randomised controlled trials. *Knee*. 2017;24(3):508-17.

62. Forriol FE, R. . Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatología. *Trauma Fund Mapfre*. 2008;19(2):88-101.
63. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-60.
64. Vats A, Tolley NS, Buttery LD, Polak JM. The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(2):159-64.
65. Lopez-Ruiz E, Peran M, Cobo-Molinos J, Jimenez G, Picon M, Bustamante M, et al. Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(1):246-58.
66. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
67. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150-4.
68. Soria JMB-G, J.; Andrades, J.A.; Romero, J.; Monleón Pradas M.; García-Verdugo, J.M. Uso de biomateriales en medicina regenerativa, aspectos básicos y aplicaciones en el Sistema Nervioso. *Trauma Fund Mapfre*. 2008;20:15-22.
69. Raghunath J, Rollo J, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol Appl Biochem*. 2007;46(Pt 2):73-84.
70. Annabi N, Tamayol A, Uquillas JA, Akbari M, Bertassoni LE, Cha C, et al. 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater*. 2014;26(1):85-123.
71. Klotz BJ, Gawlitta D, Rosenberg A, Malda J, Melchels FPW. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends Biotechnol*. 2016;34(5):394-407.
72. Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*. 2015;73:254-71.
73. Vallet-Regi M. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans*. 2006(44):5211-20.

74. Rumpel E, Wolf E, Kauschke E, Bienengraber V, Bayerlein T, Gedrange T, et al. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. *Folia Morphol (Warsz)*. 2006;65(1):43-8.
75. Cai DZ, Zeng C, Quan DP, Bu LS, Wang K, Lu HD, et al. Biodegradable chitosan scaffolds containing microspheres as carriers for controlled transforming growth factor-beta1 delivery for cartilage tissue engineering. *Chin Med J (Engl)*. 2007;120(3):197-203.
76. Palumbo FS, Fiorica C, Di Stefano M, Pitarresi G, Gulino A, Agnello S, et al. In situ forming hydrogels of hyaluronic acid and inulin derivatives for cartilage regeneration. *Carbohydr Polym*. 2015;122:408-16.
77. Sun J, Tan H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)*. 2013;6(4):1285-309.
78. Dispenza C, Todaro S, Bulone D, Sabatino MA, Ghersi G, San Biagio PL, et al. Physico-chemical and mechanical characterization of in-situ forming xyloglucan gels incorporating a growth factor to promote cartilage reconstruction. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;70(Pt 1):745-52.
79. Skaalure SC, Chu S, Bryant SJ. An enzyme-sensitive PEG hydrogel based on aggrecan catabolism for cartilage tissue engineering. *Adv Healthc Mater*. 2015;4(3):420-31.
80. Yan S, Wang T, Feng L, Zhu J, Zhang K, Chen X, et al. Injectable in situ self-cross-linking hydrogels based on poly(L-glutamic acid) and alginate for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules*. 2014;15(12):4495-508.
81. Mellati A, Kiamahalleh MV, Madani SH, Dai S, Bi J, Jin B, et al. Poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel/chitosan scaffold hybrid for three-dimensional stem cell culture and cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(11):2764-74.
82. Radhakrishnan J, Subramanian A, Sethuraman S. Injectable glycosaminoglycan-protein nano-complex in semi-interpenetrating networks: A biphasic hydrogel for hyaline cartilage regeneration. *Carbohydr Polym*. 2017;175:63-74.
83. Tan H, Rubin JP, Marra KG. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for adipose tissue regeneration. *Organogenesis*. 2010;6(3):173-80.
84. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 2003;24(24):4337-51.

85. Park H, Temenoff JS, Holland TA, Tabata Y, Mikos AG. Delivery of TGF-beta1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2005;26(34):7095-103.
86. Liu M, Zeng X, Ma C, Yi H, Ali Z, Mou X, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res*. 2017;5:17014.
87. Eslahi N, Abdorahim M, Simchi A. Smart Polymeric Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering: A Review on the Chemistry and Biological Functions. *Biomacromolecules*. 2016;17(11):3441-63.
88. Mora-Boza AP-B, M.; Vázquez-Lasa, B; San Román, J.; Pérez-Caballer, A.; Olmeda-Lozano, M. . Contribution of bioactive hyaluronic acid and gelatin to regenerative medicine. Methodologies of gels preparation and advanced applications. *European Polymer Journal*. 2017;95:11-26.
89. Levett PA, Melchels FP, Schrobback K, Hutmacher DW, Malda J, Klein TJ. A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Acta Biomater*. 2014;10(1):214-23.
90. O'Connell CD, Di Bella C, Thompson F, Augustine C, Beirne S, Cornock R, et al. Development of the Biopen: a handheld device for surgical printing of adipose stem cells at a chondral wound site. *Biofabrication*. 2016;8(1):015019.
91. Hoemann CD, Sun J, Legare A, McKee MD, Buschmann MD. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(4):318-29.
92. Tan H, Xiao C, Sun J, Xiong D, Hu X. Biological self-assembly of injectable hydrogel as cell scaffold via specific nucleobase pairing. *Chem Commun (Camb)*. 2012;48(83):10289-91.
93. Varghese SE, J.H. . Hydrogels for musculoskeletal tissue engineering. *Adv Polym Sci*. 2006;203:95-144.
94. Puertas-Bartolome M, Benito-Garzon L, Olmeda-Lozano M. In Situ Cross-Linkable Polymer Systems and Composites for Osteochondral Regeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1058:327-55.
95. Johnson TD, Christman KL. Injectable hydrogel therapies and their delivery strategies for treating myocardial infarction. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(1):59-72.

96. Nguyen MK, Lee DS. Injectable biodegradable hydrogels. *Macromol Biosci*. 2010;10(6):563-79.
97. Oprenyeszki F, Chausson M, Maquet V, Dubuc JE, Henrotin Y. Protective effect of a new biomaterial against the development of experimental osteoarthritis lesions in rabbit: a pilot study evaluating the intra-articular injection of alginate-chitosan beads dispersed in an hydrogel. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(8):1099-107.
98. Matricardi P, Di Meo C, Coviello T, Hennink WE, Alhaique F. Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(9):1172-87.
99. Suri S, Schmidt CE. Photopatterned collagen-hyaluronic acid interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta Biomater*. 2009;5(7):2385-97.
100. Xin X, Borzacchiello A, Netti PA, Ambrosio L, Nicolais L. Hyaluronic-acid-based semi-interpenetrating materials. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2004;15(9):1223-36.
101. Weng L, Gouldstone A, Wu Y, Chen W. Mechanically strong double network photocrosslinked hydrogels from N,N-dimethylacrylamide and glycidyl methacrylated hyaluronan. *Biomaterials*. 2008;29(14):2153-63.
102. Chan KM, Li RH, Chapman JW, Trac EM, Kobler JB, Zeitels SM, et al. Functionalizable hydrogel microparticles of tunable size and stiffness for soft-tissue filler applications. *Acta Biomater*. 2014;10(6):2563-73.
103. Skardal A, Zhang J, McCoard L, Xu X, Oottamasathien S, Prestwich GD. Photocrosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogels for two-step bioprinting. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(8):2675-85.
104. Kazemirad S, Heris HK, Mongeau L. Viscoelasticity of hyaluronic acid-gelatin hydrogels for vocal fold tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016;104(2):283-90.
105. Malinen MM, Kanninen LK, Corlu A, Isoniemi HM, Lou YR, Yliperttula ML, et al. Differentiation of liver progenitor cell line to functional organotypic cultures in 3D nanofibrillar cellulose and hyaluronan-gelatin hydrogels. *Biomaterials*. 2014;35(19):5110-21.
106. Khorshidi SK, S. A self-crosslinking tri-component hydrogel based on functionalized polysaccharides and gelatin for tissue engineering applications. *Mater, Lett*. 2016;164:468-71.

107. Nguyen TB, Lee BT. A combination of biphasic calcium phosphate scaffold with hyaluronic acid-gelatin hydrogel as a new tool for bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(13-14):1993-2004.
108. Ouyang ZB, S. Preparation and in-vitro biocompatibility of gelatin/SA/HYA composite scaffold for tissue engineering. *Polymers and Polymer Composites*. 2015;23(7):503-8.
109. De Colli M, Massimi M, Barbetta A, Di Rosario BL, Nardecchia S, Conti Devirgiliis L, et al. A biomimetic porous hydrogel of gelatin and glycosaminoglycans cross-linked with transglutaminase and its application in the culture of hepatocytes. *Biomed Mater*. 2012;7(5):055005.
110. Bae JW, Choi JH, Lee Y, Park KD. Horseradish peroxidase-catalysed in situ-forming hydrogels for tissue-engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(11):1225-32.
111. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*. 2000;21(21):2155-61.
112. Stanish WD, McCormack R, Forriol F, Mohtadi N, Pelet S, Desnoyers J, et al. Novel scaffold-based BST-CarGel treatment results in superior cartilage repair compared with microfracture in a randomized controlled trial. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(18):1640-50.
113. Shive MS, Stanish WD, McCormack R, Forriol F, Mohtadi N, Pelet S, et al. BST-CarGel(R) Treatment Maintains Cartilage Repair Superiority over Microfracture at 5 Years in a Multicenter Randomized Controlled Trial. *Cartilage*. 2015;6(2):62-72.
114. Trattnig S, Ohel K, Mlynarik V, Juras V, Zbyn S, Korner A. Morphological and compositional monitoring of a new cell-free cartilage repair hydrogel technology - GelrinC by MR using semi-quantitative MOCART scoring and quantitative T2 index and new zonal T2 index calculation. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(12):2224-32.
115. Spiller KL, Maher SA, Lowman AM. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17(4):281-99.
116. Ravanetti F, Galli C, Manfredi E, Cantoni AM, Scarpa E, Macaluso GM, et al. Chitosan-based scaffold modified with D-(+) raffinose for cartilage repair: an in vivo study. *J Negat Results Biomed*. 2015;14:2.

117. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(12):2671-86.
118. Vaca-González JG, ML.; Garzón-Alvarado, DA. . Cartílago articular: estructura, patologías y campos eléctricos como alternativa terapéutica. Revisión de conceptos actuales. . *Rev Colomb Ortop Traumatol*. 2017.
119. Zaldívar-Barinaga BR, B; Basterrechea, J; Buen, C; Sandoval, B. . Inyecciones intraarticulares con hialuronato sódico: una opción de tratamiento en la gonartrosis. *Rehabilitación*. 1999;33(1).
120. [www.collagensolutions.com](http://www.collagensolutions.com) 2016 [Collagen formulations].
121. America GMlo. *Gelatin Handbook* 2012.
122. Gomez-Mascaraque LG, Mendez JA, Fernandez-Gutierrez M, Vazquez B, San Roman J. Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: application to hydrogels of agarose-chitosan. *Acta Biomater*. 2014;10(2):798-811.
123. Zhao H, Heindel ND. Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method. *Pharm Res*. 1991;8(3):400-2.
124. Schacht EN, M.; Vansteenkiste, S.; Demeester, J.; Franssen , J.; Lemahieu, A. Some aspects of the crosslinking of gelatin by dextran dialdehydes. *Polymer Gels and Networks*. 1993;1(4):111-25.
125. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
126. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods*. 1997;204(2):205-8.
127. Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 1996;4(2):87-98.
128. Band PA, Heeter J, Wisniewski HG, Liublinska V, Pattanayak CW, Karia RJ, et al. Hyaluronan molecular weight distribution is associated with the risk of knee osteoarthritis progression. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(1):70-6.

129. ISO. Versión Oficial en Español de la Norma Internacional, ISO-10993/5:1997.Evaluación biológica de productos sanitarios., Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro. Norma Española 1998. (1998).
130. Ayhan EK, H.; Akgun, I. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluroic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World Journal of Orthopedics*. 2014;5(3):351-61.
131. Iannitti T, Elhensheri M, Bingol AO, Palmieri B. Preliminary histopathological study of intra-articular injection of a novel highly cross-linked hyaluronic acid in a rabbit model of knee osteoarthritis. *J Mol Histol*. 2013;44(2):191-201.
132. L. S. Elasticity of aging cartilage. *Fred Proc*. 1966;25(3):1089-95.
133. Abramson S. Drug delivery in degenerative joint disease: where we are and where to go? *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(2):125-7.
134. Sukur E, Talu C, Akman YE, Cerci E, Ozturkmen Y, Tuzuner T. Comparison of the chondroprotective effect of a novel hydrogel compound and traditional hyaluronate on rat cartilage in a papain-induced osteoarthritis model. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2016;50(4):458-63.
135. Place ES, Evans ND, Stevens MM. Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater*. 2009;8(6):457-70.
136. Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(2):149-65.
137. Chuah YJ, Peck Y, Lau JE, Hee HT, Wang DA. Hydrogel based cartilaginous tissue regeneration: recent insights and technologies. *Biomater Sci*. 2017;5(4):613-31.
138. Camci-Unal GC, D.; Annabi, N.; Demarchi, D.; Khademhosseini.A. . Synthesis and characterization of hybrid hyaluroic acid-gelatin hydrogels. *Biomacromolecules*. 2013;14(4):1085-92.
139. Elisseeff J. Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*. 2004;4(12):1849-59.
140. Liu Y, Chan-Park MB. Hydrogel based on interpenetrating polymer networks of dextran and gelatin for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30(2):196-207.
141. Jenkins AK, P.; Strepto, RF.; Suter, UW. . Glossary of basic terms in polymer ciencia (IUPACRecommendations). . *Pure Appl Chem*. 1996;68:2287-311.

142. Brigham MD, Bick A, Lo E, Bendali A, Burdick JA, Khademhosseini A. Mechanically robust and bioadhesive collagen and photocrosslinkable hyaluronic acid semi-interpenetrating networks. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(7):1645-53.
143. Coviello T, Matricardi P, Marianecchi C, Alhaique F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J Control Release*. 2007;119(1):5-24.
144. Vanderhooft JL, Alcoutlabi M, Magda JJ, Prestwich GD. Rheological properties of cross-linked hyaluronan-gelatin hydrogels for tissue engineering. *Macromol Biosci*. 2009;9(1):20-8.
145. Larsen NE, Dursema HD, Pollak CT, Skrabut EM. Clearance kinetics of a hylan-based viscosupplement after intra-articular and intravenous administration in animal models. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(2):457-62.
146. Brown TJ, Laurent UB, Fraser JR. Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labelled hyaluronan from the knee joint of the rabbit. *Exp Physiol*. 1991;76(1):125-34.
147. Benazzo F, Perticarini L, Padolino A, Castelli A, Gifuni P, Lovato M, et al. A multi-centre, open label, long-term follow-up study to evaluate the benefits of a new viscoelastic hydrogel (Hymovis(R)) in the treatment of knee osteoarthritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(5):959-68.
148. Elmorsy S, Funakoshi T, Sasazawa F, Todoh M, Tadano S, Iwasaki N. Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(1):121-7.
149. Gomis A, Miralles A, Schmidt RF, Belmonte C. Intra-articular injections of hyaluronan solutions of different elastoviscosity reduce nociceptive nerve activity in a model of osteoarthritic knee joint of the guinea pig. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(6):798-804.
150. Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruyse KP, Ziebell MR. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Control Release*. 1998;53(1-3):93-103.
151. Raeissadat SA, Rayegani SM, Hassanabadi H, Fathi M, Ghorbani E, Babae M, et al. Knee Osteoarthritis Injection Choices: Platelet- Rich Plasma (PRP) Versus Hyaluronic Acid (A one-year randomized clinical trial). *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2015;8:1-8.

152. Yavuz U, Sokucu S, Albayrak A, Ozturk K. Efficacy comparisons of the intraarticular steroidal agents in the patients with knee osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2012;32(11):3391-6.
153. Karakurum G, Karakok M, Tarakcioglu M, Kocer NE, Kocabas R, Bagci C. Comparative effect of intra-articular administration of hyaluronan and/or cortisone with evaluation of malondialdehyde on degenerative osteoarthritis of the rabbit's knee. *Tohoku J Exp Med.* 2003;199(3):127-34.
154. Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv Mater.* 2011;23(12):H41-56.
155. Schante CZ, G.; Helin,C.; Vandamme, T. . Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. . *Carbohydr Polym.* 2011;85:469-89.
156. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci.* 2008;97(8):2892-923.
157. Tabata Y, Ikada Y. Macrophage activation through phagocytosis of muramyl dipeptide encapsulated in gelatin microspheres. *J Pharm Pharmacol.* 1987;39(9):698-704.
158. Chang CH, Liu HC, Lin CC, Chou CH, Lin FH. Gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 2003;24(26):4853-8.
159. Yin B, Ma P, Chen J, Wang H, Wu G, Li B, et al. Hybrid Macro-Porous Titanium Ornamented by Degradable 3D Gel/nHA Micro-Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):575.
160. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Control Release.* 2005;109(1-3):256-74.
161. Ikada Y, Tabata Y. Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;31(3):287-301.
162. Angele P, Muller R, Schumann D, Englert C, Zellner J, Johnstone B, et al. Characterization of esterified hyaluronan-gelatin polymer composites suitable for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2009;91(2):416-27.

163. Chen CH, Kuo CY, Wang YJ, Chen JP. Dual Function of Glucosamine in Gelatin/Hyaluronic Acid Cryogel to Modulate Scaffold Mechanical Properties and to Maintain Chondrogenic Phenotype for Cartilage Tissue Engineering. *Int J Mol Sci.* 2016;17(11).
164. Liu Y, Chan-Park MB. A biomimetic hydrogel based on methacrylated dextran-graft-lysine and gelatin for 3D smooth muscle cell culture. *Biomaterials.* 2010;31(6):1158-70.
165. Silva RM, Silva GA, Coutinho OP, Mano JF, Reis RL. Preparation and characterisation in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15(10):1105-12.
166. Baran ET, Mano JF, Reis RL. Starch-chitosan hydrogels prepared by reductive alkylation cross-linking. *J Mater Sci Mater Med.* 2004;15(7):759-65.
167. Zhang H, Qadeer A, Chen W. In situ gelable interpenetrating double network hydrogel formulated from binary components: thiolated chitosan and oxidized dextran. *Biomacromolecules.* 2011;12(5):1428-37.
168. Weng L, Romanov A, Rooney J, Chen W. Non-cytotoxic, in situ gelable hydrogels composed of N-carboxyethyl chitosan and oxidized dextran. *Biomaterials.* 2008;29(29):3905-13.
169. Maia JC, R.A.; Coelho, J.F.; Simoes, P.N.; Fil, M.H. Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes. *Polymer.* 2011;52(2):258-65.
170. Weng L, Chen X, Chen W. Rheological characterization of in situ crosslinkable hydrogels formulated from oxidized dextran and N-carboxyethyl chitosan. *Biomacromolecules.* 2007;8(4):1109-15.
171. He Z, Wang B, Hu C, Zhao J. An overview of hydrogel-based intra-articular drug delivery for the treatment of osteoarthritis. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2017;154:33-9.
172. Kim IL, Mauck RL, Burdick JA. Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid. *Biomaterials.* 2011;32(34):8771-82.
173. Ostergaard MH, P. Intra-articular corticosteroids in arthritic disease: a guide to treatment. *BioDrugs.* 1998;9:95-103.
174. Mankin HJ, Conger KA. The acute effects of intra-articular hydrocortisone on articular cartilage in rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1966;48(7):1383-8.

175. Wernecke C, Braun HJ, Dragoo JL. The Effect of Intra-articular Corticosteroids on Articular Cartilage: A Systematic Review. *Orthop J Sports Med.* 2015;3(5):2325967115581163.
176. Huebner KD, Shrive NG, Frank CB. Dexamethasone inhibits inflammation and cartilage damage in a new model of post-traumatic osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2014;32(4):566-72.
177. Zhang Z, Wei X, Gao J, Zhao Y, Zhao Y, Guo L, et al. Intra-Articular Injection of Cross-Linked Hyaluronic Acid-Dexamethasone Hydrogel Attenuates Osteoarthritis: An Experimental Study in a Rat Model of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(4):411.
178. Schumacher HR, Chen LX. Injectable corticosteroids in treatment of arthritis of the knee. *Am J Med.* 2005;118(11):1208-14.
179. Vandeweerdt JM, Zhao Y, Nisolle JF, Zhang W, Zhihong L, Clegg P, et al. Effect of corticosteroids on articular cartilage: have animal studies said everything? *Fundam Clin Pharmacol.* 2015;29(5):427-38.
180. Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ, Tuan RS. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells.* 2006;24(6):1487-95.
181. Eyigor S, Hepguler S, Sezak M, Oztop F, Capaci K. Effects of intra-articular hyaluronic acid and corticosteroid therapies on articular cartilage in experimental severe osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24(6):724.
182. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone.* 2012;51(2):249-57.
183. Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(2):CD005328.
184. Romsing J, Moiniche S, Ostergaard D, Dahl JB. Local infiltration with NSAIDs for postoperative analgesia: evidence for a peripheral analgesic action. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2000;44(6):672-83.
185. Cicala C, Ianaro A, Fiorucci S, Calignano A, Bucci M, Gerli R, et al. NO-naproxen modulates inflammation, nociception and downregulates T cell response in rat Freund's adjuvant arthritis. *Br J Pharmacol.* 2000;130(6):1399-405.

186. Gupta A, Axelsson K, Allvin R, Liszka-Hackzell J, Rawal N, Althoff B, et al. Postoperative pain following knee arthroscopy: the effects of intra-articular ketorolac and/or morphine. *Reg Anesth Pain Med.* 1999;24(3):225-30.
187. Convery PN, Milligan KR, Quinn P, Scott K, Clarke RC. Low-dose intra-articular ketorolac for pain relief following arthroscopy of the knee joint. *Anaesthesia.* 1998;53(11):1125-9.
188. Jiang D, Zou J, Huang L, Shi Q, Zhu X, Wang G, et al. Efficacy of intra-articular injection of celecoxib in a rabbit model of osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2010;11(10):4106-13.
189. Irwin MG, Cheung KM, Nicholls JM, Thompson N. Intra-articular injection of ketorolac in the rat knee joint: effect on articular cartilage and synovium. *Br J Anaesth.* 1998;80(6):837-9.
190. Stalman A, Tsai JA, Segerdahl M, Dungen E, Arner P, Fellander-Tsai L. Ketorolac but not morphine exerts inflammatory and metabolic effects in synovial membrane after knee arthroscopy: a double-blind randomized prospective study using the microdialysis technique. *Reg Anesth Pain Med.* 2009;34(6):557-64.
191. Shapiro PS, Rohde RS, Froimson MI, Lash RH, Postak P, Greenwald AS. The effect of local corticosteroid or ketorolac exposure on histologic and biomechanical properties of rabbit tendon and cartilage. *Hand (N Y).* 2007;2(4):165-72.
192. Riggan CN, Tucker JJ, Soslowsky LJ, Kuntz AF. Intra-articular tibiofemoral injection of a nonsteroidal anti-inflammatory drug has no detrimental effects on joint mechanics in a rat model. *J Orthop Res.* 2014;32(11):1512-9.
193. Unlu Z, Ay K, Tuzun C. Comparison of intra-articular tenoxicam and oral tenoxicam for pain and physical functioning in osteoarthritis of the knee. *Clin Rheumatol.* 2006;25(1):54-61.
194. Papathanassiou NP. Intra-articular use of tenoxicam in degenerative osteoarthritis of the knee joint. *J Int Med Res.* 1994;22(6):332-7.
195. Erbas M, Simsek T, Kiraz HA, Sahin H, Toman H. [Comparison of the effectivity of oral and intra-articular administration of tenoxicam in patients with knee osteoarthritis]. *Rev Bras Anesthesiol.* 2015;65(5):333-7.
196. Colbert ST, Curran E, O'Hanlon DM, Moran R, McCarroll M. Intra-articular tenoxicam improves postoperative analgesia in knee arthroscopy. *Can J Anaesth.* 1999;46(7):653-7.

197. Elhakim M, Fathy A, Elkott M, Said MM. Intra-articular tenoxicam relieves post-arthroscopy pain. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1996;40(10):1223-6.
198. Reuben SS, Connelly NR. Postoperative analgesia for outpatient arthroscopic knee surgery with intraarticular bupivacaine and ketorolac. *Anesth Analg*. 1995;80(6):1154-7.
199. Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*. 2010;31(21):5536-44.
200. Shi J, Xing MM, Zhong W. Development of hydrogels and biomimetic regulators as tissue engineering scaffolds. *Membranes (Basel)*. 2012;2(1):70-90.
201. Kurisawa M, Terano M, Yui N. Double-stimuli-responsive degradation of hydrogels consisting of oligopeptide-terminated poly(ethylene glycol) and dextran with an interpenetrating polymer network. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1997;8(9):691-708.
202. Fan M, Ma Y, Zhang Z, Mao J, Tan H, Hu X. Biodegradable hyaluronic acid hydrogels to control release of dexamethasone through aqueous Diels-Alder chemistry for adipose tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;56:311-7.
203. Peng X, Zhuang Q, Peng D, Dong Q, Tan L, Jiao F, et al. Sustained release of naproxen in a new kind delivery system of carbon nanotubes hydrogel. *Iran J Pharm Res*. 2013;12(4):581-6.
204. Fentem JH. The Use of Human Tissues in In Vitro Toxicology, Stirling, 28/29 April 1993. Summary of general discussions. *Hum Exp Toxicol*. 1994;13(6):445-9.
205. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, et al. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol*. 2002;40(2-3):193-236.
206. Rasmussen E. Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *In Vitro Mol Toxicol*. 1999;12(1):47-58.
207. Rolon M, Vega C, Escario JA, Gomez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res*. 2006;99(2):103-7.
208. Zhang XY, Yao J, Shao Z, Chen X. Strong collagen hydrogels by oxidized dextran modification. *ACS Sustainable Chem Eng*. 2014;2:1318-24.

209. Aziz MA, Cabral JD, Brooks HJ, McConnell MA, Fitzpatrick C, Hanton LR, et al. In vitro biocompatibility and cellular interactions of a chitosan/dextran-based hydrogel for postsurgical adhesion prevention. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015;103(2):332-41.
210. Hyon SH, Nakajima N, Sugai H, Matsumura K. Low cytotoxic tissue adhesive based on oxidized dextran and epsilon-poly-L-lysine. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(8):2511-20.
211. Hozumi TK, T.; Ohta, S.; Ito, T. Injectable hydrogel with slow degradability composed of gelatin and hyaluronic acid cross-linked by Schiff's Base formation. *Biomacromolecules.* 2018;19(2):288-97.
212. Wu S, Deng L, Hsia H, Xu K, He Y, Huang Q, et al. Evaluation of gelatin-hyaluronic acid composite hydrogels for accelerating wound healing. *J Biomater Appl.* 2017;31(10):1380-90.
213. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):105-15.
214. Laverty S, Girard CA, Williams JM, Hunziker EB, Pritzker KP. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:S53-65.
215. Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Picard G, Buschmann MD. Bone marrow stimulation of the medial femoral condyle produces inferior cartilage and bone repair compared to the trochlea in a rabbit surgical model. *J Orthop Res.* 2013;31(11):1757-64.
216. Gushue DL, Houck J, Lerner AL. Rabbit knee joint biomechanics: motion analysis and modeling of forces during hopping. *J Orthop Res.* 2005;23(4):735-42.
217. Davies DV, Barnett CH, Cochrane W, Palfrey AJ. Electron microscopy of articular cartilage in the young adult rabbit. *Ann Rheum Dis.* 1962;21:11-22.
218. Bohr H. Experimental osteoarthritis in the rabbit knee joint. *Acta Orthop Scand.* 1976;47(5):558-65.
219. Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Itoh H, et al. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthrosis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop Relat Res.* 1994(298):296-304.

220. Hulmes DJ, Marsden ME, Strachan RK, Harvey RE, McInnes N, Gardner DL. Intra-articular hyaluronate in experimental rabbit osteoarthritis can prevent changes in cartilage proteoglycan content. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(3):232-8.
221. Kitoh Y, Katsuramaki T, Tanaka H, Tanaka M, Kitabayashi N, Kataoka M, et al. [Effect of SL-1010 (sodium hyaluronate with high molecular weight) on experimental osteoarthritis induced by intra-articularly applied papain in rabbits]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1992;100(1):67-76.
222. Hermeto LC, Rossi R, Jardim PH, Santana AE, Rinaldi JC, Justulin LA. Comparison between two different experimental models of osteoarthritis in rabbits. Intra-articular collagenase injection and anterior cruciate ligament transection. *Acta Cir Bras*. 2016;31(9):602-7.
223. Hermeto LC, DeRossi R, Oliveira RJ, Pesarini JR, Antonioli-Silva AC, Jardim PH, et al. Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis. *Genet Mol Res*. 2016;15(3).
224. Cheng NT, Guo A, Cui YP. Intra-articular injection of Torin 1 reduces degeneration of articular cartilage in a rabbit osteoarthritis model. *Bone Joint Res*. 2016;5(6):218-24.
225. Kikuchi T, Sakuta T, Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998;6(3):177-86.
226. Kwon DR, Park GY, Lee SU. The effects of intra-articular platelet-rich plasma injection according to the severity of collagenase-induced knee osteoarthritis in a rabbit model. *Ann Rehabil Med*. 2012;36(4):458-65.
227. Park DS, Huh JE, Baek YH. Therapeutic effect of *Aralia cordata* extracts on cartilage protection in collagenase-induced inflammatory arthritis rabbit model. *J Ethnopharmacol*. 2009;125(2):207-17.
228. Huh JE, Baek YH, Lee JD, Choi DY, Park DS. Therapeutic effect of *Siegesbeckia pubescens* on cartilage protection in a rabbit collagenase-induced model of osteoarthritis. *J Pharmacol Sci*. 2008;107(3):317-28.
229. Bustos LM, M.; Romero, D.; Mendonza, L.; Lara, A.; De la Garza, C. Análisis histopatológico del cartílago articular expuesto a metilprednisona, ropivacaína

- y ácido hialurónico en un modelo animal de osteoartritis. *Int J Mporhol.* 2014;32(4):1199-206.
230. Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, et al. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(8):1049-58.
231. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays.* 1995;17(12):1039-48.
232. Hardingham T, Bayliss M. Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Semin Arthritis Rheum.* 1990;20(3 Suppl 1):12-33.
233. Grimmer C, Balbus N, Lang U, Aigner T, Cramer T, Muller L, et al. Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hydroxylases: possible influence of low oxygen levels. *Am J Pathol.* 2006;169(2):491-502.
234. Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, Reiner A, Pidoux I, Ionescu M, et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest.* 1998;102(12):2115-25.
235. Pfander D, Rahmzadeh R, Scheller EE. Presence and distribution of collagen II, collagen I, fibronectin, and tenascin in rabbit normal and osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol.* 1999;26(2):386-94.
236. Guilak F. Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus. *J Biomech.* 1995;28(12):1529-41.
237. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(9):1263-7.
238. Walker GD, Fischer M, Gannon J, Thompson RC, Jr., Oegema TR, Jr. Expression of type-X collagen in osteoarthritis. *J Orthop Res.* 1995;13(1):4-12.
239. McDevitt C, Gilbertson E, Muir H. An experimental model of osteoarthritis; early morphological and biochemical changes. *J Bone Joint Surg Br.* 1977;59(1):24-35.
240. Binks DA, Bergin D, Freemont AJ, Hodgson RJ, Yonenaga T, McGonagle D, et al. Potential role of the posterior cruciate ligament synovio-entheseal complex in joint effusion in early osteoarthritis: a magnetic resonance imaging and

- histological evaluation of cadaveric tissue and data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(9):1310-7.
241. Dogan N, Erdem AF, Gundogdu C, Kursad H, Kizilkaya M. The effects of ketorolac and morphine on articular cartilage and synovium in the rabbit knee joint. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004;82(7):502-5.
242. Dief AE, Mostafa DK, Sharara GM, Zeitoun TH. Hydrogen sulfide releasing naproxen offers better anti-inflammatory and chondroprotective effect relative to naproxen in a rat model of zymosan induced arthritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(8):1537-46.
243. Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Muniz O, Pita JC. Cartilage proteoglycan alterations in an experimentally induced model of rabbit osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1979;22(2):155-63.
244. Pelletier JP, Mineau F, Raynauld JP, Woessner JF, Jr., Gunja-Smith Z, Martel-Pelletier J. Intraarticular injections with methylprednisolone acetate reduce osteoarthritic lesions in parallel with chondrocyte stromelysin synthesis in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1994;37(3):414-23.
245. Poole CA, Matsuoka A, Schofield JR. Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*. 1991;34(1):22-35.
246. Scanzello CR. Pathologic and pathogenic processes in osteoarthritis: the effects of synovitis. *HSS J*. 2012;8(1):20-2.
247. Heard BJ, Barton KI, Chung M, Achari Y, Shrive NG, Frank CB, et al. Single intra-articular dexamethasone injection immediately post-surgery in a rabbit model mitigates early inflammatory responses and post-traumatic osteoarthritis-like alterations. *J Orthop Res*. 2015;33(12):1826-34.
248. Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta(IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999;7(2):182-90.
249. Smith LJ, Gorth DJ, Showalter BL, Chiaro JA, Beattie EE, Elliott DM, et al. In vitro characterization of a stem-cell-seeded triple-interpenetrating-network hydrogel for functional regeneration of the nucleus pulposus. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(13-14):1841-9.

250. Levingstone TJ, Thompson E, Matsiko A, Schepens A, Gleeson JP, O'Brien FJ. Multi-layered collagen-based scaffolds for osteochondral defect repair in rabbits. *Acta Biomater.* 2016;32:149-60.





