

Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología

www.elsevier.es/rot



INVESTIGACIÓN

Tratamiento de lesiones condrales agudas de espesor completo con ácido hialurónico de alto peso molecular; un modelo experimental



D. Figueroa^a, M. Espinosa^{b,*}, R. Calvo^a, M. Scheu^a, J.J. Valderrama^c, M. Gallegos^d y P. Conget^b

^a Departamento de Traumatología, Clínica Alemana de Santiago, Santiago, Chile

^b Facultad de Medicina Clínica Alemana–Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile

^c Mutual de Seguridad, Santiago, Chile

^d Departamento de Anatomía Patológica, Clínica Alemana de Santiago, Santiago, Chile

Recibido el 29 de enero de 2014; aceptado el 4 de marzo de 2014

Disponible en Internet el 13 de abril de 2014

PALABRAS CLAVE

Ácido hialurónico de alto peso molecular;
Regeneración;
Cartílago hialino;
Artrosis

Resumen

Objetivo: Evaluar el efecto de 2 protocolos diferentes de ácido hialurónico (AH) intraarticular (hylan G-F20) sobre la regeneración del cartílago articular en lesiones condrales agudas de espesor completo.

Material y método: Se realizaron lesiones condrales de espesor completo de 3 × 6 mm en los cóndilos femorales de conejos New Zealand, tratados con una dosis única o tres dosis de AH. Los animales fueron sacrificados a las 12 semanas y el tejido regenerado fue evaluado mediante observación directa e histología con la escala ICRS.

Resultados: Macroscópicamente, en ambos grupos tratados con AH los defectos se rellenaron con tejido irregular, con zonas similares al cartílago hialino y otras en las que se observaron áreas deprimidas con exposición de hueso subcondral. El análisis histológico demostró en ambos grupos tratados con AH un tejido similar al cartílago hialino comparado con el grupo control. Sin embargo, la puntuación de la escala Internacional Cartilage Repair Society (ICRS) no mostró diferencias entre los grupos tratados con AH.

Conclusión: El uso de dosis única o 3 dosis de AH en lesiones condrales agudas tiene un beneficio limitado y similar en la regeneración del cartílago articular.

© 2014 SECOT. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: maxespinosa@gmail.com (M. Espinosa).

KEYWORDS

High molecular weight hyaluronic acid;
Regeneration;
Cartilage;
Osteoarthritis

Treatment of acute full-thickness chondral defects with high molecular weight hyaluronic acid; an experimental model

Abstract

Purpose: To evaluate the effect of 2 different protocols of intra-articular hyaluronic acid (HA, hylan G-F20) to articular cartilage regeneration in acute full-thickness chondral defects.

Materials and Methods: Full-thickness chondral defects of 3x6mm were performed into the lateral femoral condyles of New Zealand rabbits, treated with a single or three doses of HA. The animals were sacrificed at 12 weeks and the regenerated tissue was evaluated by direct observation and histology with the ICRS scale. Macroscopically, in both groups treated with HA the defects were filled with irregular tissue with areas similar to hyaline cartilage and others in which depressed areas with exposed subchondral bone were observed. Histological analysis showed in both groups treated with HA a hyaline-like cartilage compared to control group. However, the score of the International Cartilage Repair Society (ICRS) scale did not show differences between the groups treated with HA.

Conclusion: The use of single dose or 3 doses of AH in acute chondral lesions has a limited and similar benefit in articular cartilage regeneration.

© 2014 SECOT. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Las lesiones condrales de la rodilla son frecuentes en atletas, especialmente durante la práctica de deportes de contacto¹. Sabemos que estas lesiones tienen un potencial de reparación muy limitado, incluso las lesiones de pequeño tamaño que, sin tratamiento, pueden predisponer a la degeneración articular, con discapacidad funcional y un alto coste de tratamiento². En el manejo de las lesiones del cartilago articular se han propuesto múltiples opciones de tratamiento como son las perforaciones subcondrales, microfracturas, autoinjertos osteocondrales e implante de condrocitos autólogos, con resultados, a veces, pobres^{3,4}. También se han recomendado nuevas opciones terapéuticas para prevenir el desarrollo de la artrosis tras sufrir lesiones condrales focales, como son fármacos orales de acción lenta (SYSADOAS), como la glucosamina y el condroitín sulfato, y las inyecciones intraarticulares, como el ácido hialurónico (AH), que tienen un mecanismo de protección articular⁵⁻⁸. El AH es un mucopolisacárido de alto peso molecular ($5 \cdot 7 \times 10^6$ Da) con las propiedades viscoelásticas del líquido sinovial esencial para desarrollar una función articular normal. El AH tiene, por lo tanto, un efecto mecánico y también un efecto curativo sobre las células del cartilago y de la membrana sinovial. En pacientes con artrosis, la concentración de AH en el líquido sinovial de la rodilla se reduce de 2 a 3 veces y su peso molecular también disminuye hasta alcanzar niveles mínimos, 2×10^5 Da^{8,9}.

Las inyecciones intraarticulares de AH han demostrado aliviar el dolor y mejoran la función articular en pacientes con artrosis de rodilla, a corto y medio plazo^{10,11}. Estudios experimentales han demostrado que el AH disminuye la expresión de las metaloproteinasas (MMP) y de la IL-1 en la sinovial y previene cambios en los proteoglicanos (PG) de la matriz, disminuyendo la inflamación sinovial, y aumentando el contenido de PG¹²⁻¹⁴. Kaplan et al.¹⁵, realizaron un estudio sobre lesiones condrales agudas en ovejas, demostrando que 3 dosis de AH mejoraban los parámetros histológicos y el contenido de PG del cartilago articular.

Nuestras hipótesis fueron que el uso de AH aumenta la regeneración del cartilago hialino en lesiones condrales focales y que 3 inyecciones de AH aumentan la regeneración tisular. Por ello, el objetivo de nuestro estudio es evaluar, en un modelo animal, la regeneración del cartilago articular con dos protocolos diferentes de tratamiento con AH de alto peso molecular, en lesiones condrales agudas de espesor completo.

Materiales y métodos

Efectuamos lesiones condrales de espesor completo en los cóndilos femorales ($n=30$) de 15 conejos New Zealand, machos, de 3 meses de edad, y entre 2,5 y 3,5 kg de peso, siguiendo el protocolo de trabajo expuesto en la [figura 1](#).

Los animales se mantuvieron en jaulas separadas, de 40 cm $\times$ 40 cm $\times$ 60 cm, a una temperatura y humedad constante, con un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas y con alimentación *ad libitum* y también deambularon libremente, sin inmovilización.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo. Todos los procedimientos se efectuaron bajo condiciones de asepsia, utilizando anestesia intramuscular con ketamina (35 mg/kg), xilazina (5 mg/kg) y acepromazina (1 mg/kg). Se utilizó además enrofloxacino (10 mg/kg) y tramadol (4 mg/kg) en aplicación preoperatoria y hasta 2 días después de la cirugía.

Técnica quirúrgica

Los defectos condrales fueron de espesor completo, de 3 $\times$ 6 mm, realizados en las áreas de carga de los cóndilos femorales laterales de cada rodilla, a través de una artrotomía parapatelar longitudinal¹⁶. Los defectos condrales fueron realizados con un osteótomo de 3 mm hasta la capa calcificada, la cual fue retirada con una cucharilla cuidando de no dañar el hueso subcondral. Los cóndilos fueron

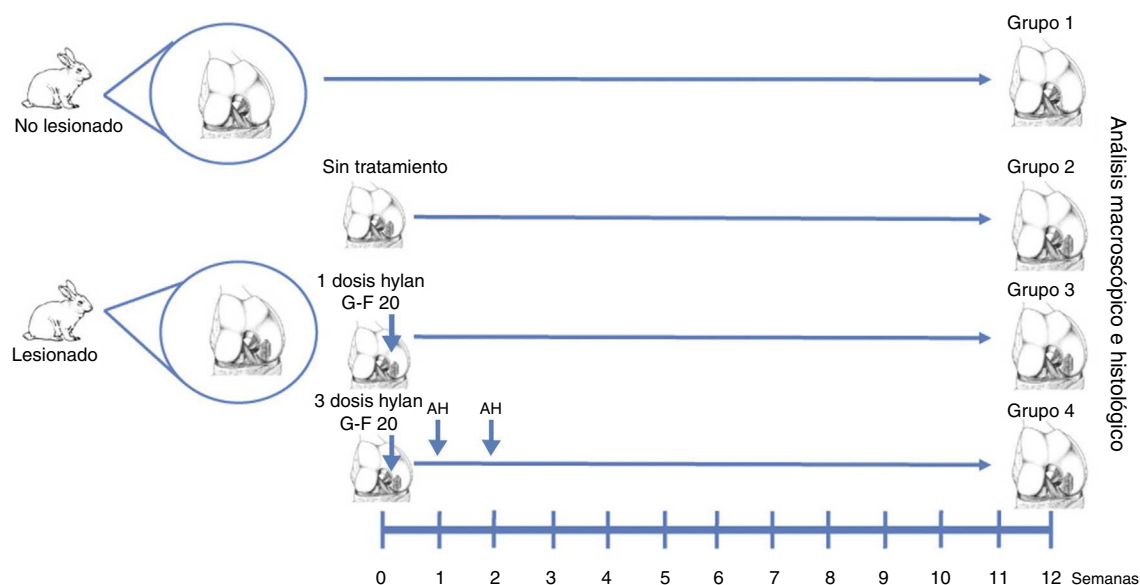


Figura 1 Protocolo experimental.

divididos en 4 grupos. En el grupo 1, no se realizó defecto y tampoco tratamiento (grupo normal, $n = 12$). En el grupo 2, se realizó un defecto condral pero no recibieron tratamiento alguno (grupo lesionado no tratado, $n = 6$). En el grupo 3, se realizó el defecto condral y recibieron una dosis única de AH (Hylan G-F 20®, 3,5 mg/0,5 ml) al finalizar la cirugía (grupo dosis única de Hylan G-F 20, $n = 6$). En el grupo 4, se realizó el defecto condral y recibieron 3 dosis semanales de AH (Hylan G-F 20® (grupo 3 dosis Hylan G-F 20, $n = 6$).

No se observaron complicaciones y ningún animal debió ser sacrificado antes de finalizar el estudio. Los conejos fueron sacrificados, a las 12 semanas, con una sobredosis intravenosa de pentobarbital, y los cóndilos fueron resacados para su estudio.

Análisis macroscópico

Todos los cóndilos ($n = 30$) fueron observados de forma directa, inmediatamente después de su obtención. Se registraron las características de color del tejido, apariencia de la superficie articular y la presencia o no de exposición de hueso subcondral.

Análisis histológico

Los cóndilos ($n = 30$) fueron fijados en formalina, decalcificados en EDTA y luego embebidos en parafina. Se realizaron cortes sagitales del tejido de 10 μm de grosor. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina/eosina (H/E) y analizados, en ciego, por un especialista entrenado de anatomía patológica, utilizando la escala International Cartilage Repair Society (ICRS) para evaluar la reparación del cartílago¹⁷. Esta escala está compuesta por 6 categorías y se asigna la puntuación de acuerdo a la característica más representativa presente en cada muestra.

Análisis estadístico

La unidad de análisis utilizada en este estudio fue cada cóndilo femoral lateral ($n = 30$). La puntuación de la escala de la ICRS (medianas) fue analizada mediante la prueba de U de Mann-Whitney y los valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Resultados

Análisis macroscópico

El grupo 1 (grupo normal) presentó un tejido suave, brillante y semitransparente. A las 12 semanas de la intervención, los cóndilos femorales del grupo 2 (grupo lesionado no tratado) presentaron un tejido muy fino, irregular, de aspecto rugoso y con un área de lesión bien definida. En el grupo 3 (grupo dosis única de AH), el tejido era fino, con apariencia hialina pero con áreas deprimidas y exposición de hueso subcondral. En el grupo 4 (grupo 3 dosis AH), el nuevo tejido formado fue levemente irregular y fino, similar al observado en el grupo 3 (fig. 2). En los grupos intervenidos, si bien los defectos fueron claramente diferenciados del cartílago circundante, no se observaron signos degenerativos articulares.

Análisis histológico

Los cóndilos del grupo 1 presentaron una superficie articular regular con una matriz hialina y condrocitos organizados en columnas. En los cóndilos del grupo 2, se observó que la mayoría presentó una superficie irregular con una matriz de fibrocartilago y condrocitos desorganizados en su distribución. En el grupo 3, la mayoría de las muestras presentaron una superficie irregular con una matriz predominantemente hialina pero con una distribución celular con columnas y zonas de clusters. Finalmente, en el grupo 4 los cóndilos presentaron superficies irregulares con gran variabilidad en la

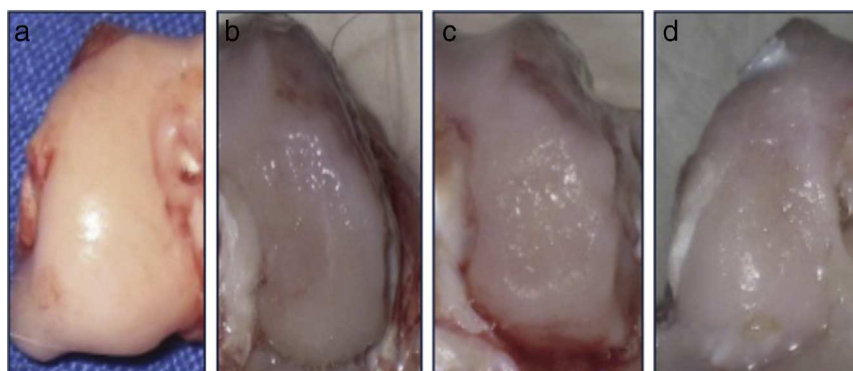


Figura 2 Caracterización macroscópica del tejido formado a las 12 semanas de la intervención. a) Grupo 1 o normal (n=12); b) Grupo 2 o lesionado no tratado (n=6); c) Grupo 3 o dosis única de Hylan G-F 20 (n=6); d) Grupo 4 o 3 dosis de Hylan G-F 20 (n=6).

distribución celular entre las muestras, observándose muestras con una distribución desorganizada y otras con una columnar y de clusters (fig. 3).

El análisis cuantitativo de los datos histológicos demostró que la viabilidad celular, el compromiso del hueso subcondral y la mineralización del cartílago se mantuvo sin cambios en todos los grupos. Sin embargo, la superficie articular, la matriz extracelular y la distribución celular varió de un grupo a otro (fig. 4). Los cóndilos del grupo 1 presentaron la máxima puntuación (3 puntos); las muestras del grupo 2 demostraron una reducción significativa de puntuación en las tres categorías (3-0, 3-2, 3-1, respectivamente) ($p < 0,05$). Tanto los cóndilos del grupo 3 como los del grupo 4 presentaron una mediana para la categoría de superficie igual a la del grupo 2 (0-0-0) ($p > 0,05$). En la categoría de matriz y distribución celular, los grupos 3 y 4 presentaron más muestras con características hialinas que el grupo

2, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Discusión

En el presente estudio, en conejos, no pudimos demostrar que el tratamiento de lesiones condrales de espesor completo con Hylan G-F 20® mejoró significativamente la regeneración del cartílago articular a los 3 meses. Además, al comparar el protocolo de dosis única con 3 dosis semanales, no encontramos diferencias en las características macroscópicas e histológicas del tejido neoformado. En estos grupos, los defectos se rellenaron con un tejido mixto, de características hialinas y de fibrocartilago, con una presentación variable entre las muestras. De acuerdo a estos resultados, el uso de Hylan G-F 20®, en lesiones

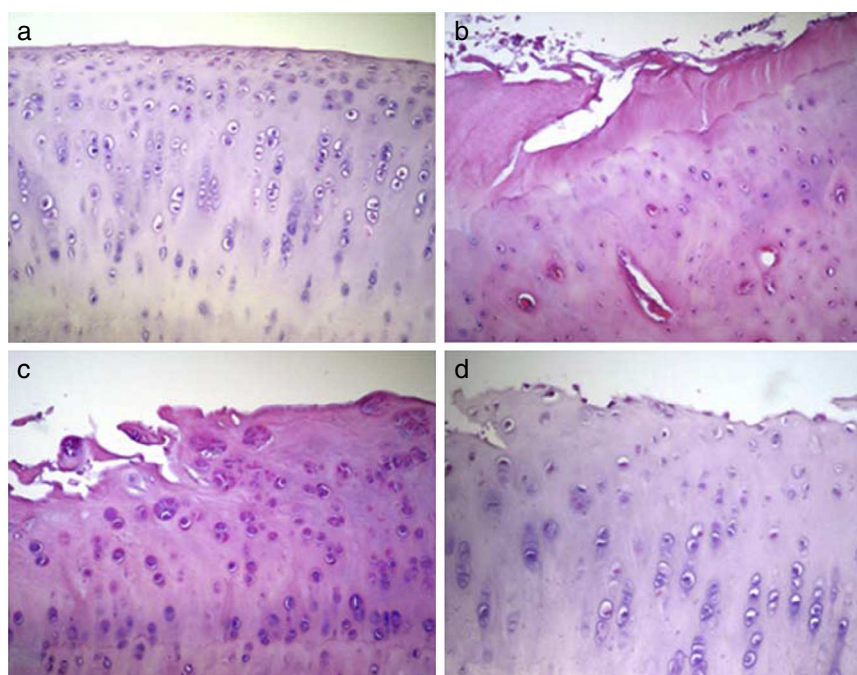


Figura 3 Análisis histológico del cartílago 12 semanas después de la intervención. Los datos mostrados son representativos de 4 cortes (20X) por animal. a) Grupo 1 o normal (n=12); b) Grupo 2 o lesionado no tratado (n=6); c) Grupo 3 o dosis única de Hylan G-F 20 (n=6); d) Grupo 4 o 3 dosis de Hylan G-F 20 (n=6).

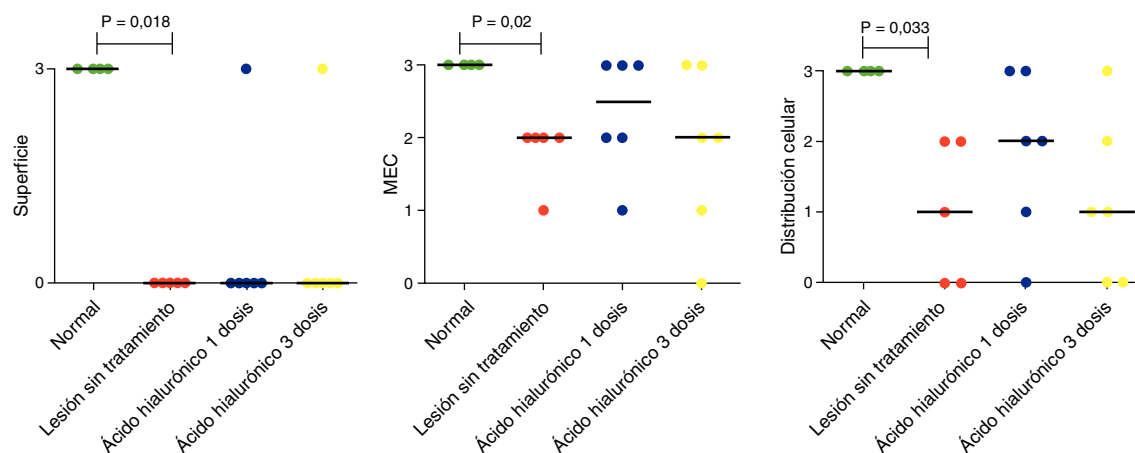


Figura 4 Evaluación de la reparación del cartílago mediante escala International Cartilage Repair Society. Los círculos corresponden a los puntajes individuales y la línea horizontal a la mediana del grupo (se muestran únicamente valores significativos).

condrales agudas, tiene algún efecto aunque no parece ser significativo.

En clínica se ofrecen múltiples opciones para el tratamiento de lesiones condrales. Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha sido capaz de regenerar el cartílago articular^{3,4}. Actualmente, la viscosuplementación intraarticular con AH se utiliza como una alternativa en los pacientes con artrosis y se han publicado estudios, multicéntricos, a doble ciego, aleatorizados y comparados contra placebo, que incluyen un elevado número de pacientes, demostrando que la infiltración con AH es una intervención segura, bien tolerada, que otorga un alivio mantenido del dolor y mejora la función del paciente con pocas reacciones adversas^{10,18,19}. Sin embargo, estos estudios se han efectuado, en su mayoría, sobre pacientes artrósicos que poco tienen que ver con las lesiones condrales aisladas.

Por otro lado, algunos estudios experimentales han publicado buenos resultados con el AH en la regeneración y viabilidad celular de los condrocitos, pero estos modelos no son comparables con nuestro trabajo ya que evalúan lesiones condrales parciales^{20,21} y no de espesor completo como en nuestro trabajo.

La viscosuplementación con AH ha sido evaluada en lesiones aisladas del cartílago articular asociada con las microfracturas^{21,22}. Strauss et al.²² demostraron, en conejos, que el uso de microfracturas asociadas a 3 dosis semanales de AH rellenan el defecto condral y mejoran la apariencia macroscópica del tejido. Adicionalmente, los cambios degenerativos articulares disminuyeron significativamente con el uso de AH. Esto podría ser explicado por el efecto sinérgico de ambos procedimientos y no de cada uno por separado.

El modo de acción preciso del AH en la reparación del cartílago aún no se conoce con certeza. Sin embargo, existen estudios que demuestran que el efecto no es sólo a través de sus propiedades mecánicas, sino que también tendría otras funciones como el aumento de la producción endógena de AH, la inhibición de la degradación de PG y un efecto antiinflamatorio in vitro²³⁻²⁵ que generará un ambiente más favorable en la articulación, retrasando el desarrollo de los cambios degenerativos y que promueve la regeneración del cartílago hialino. Sin embargo, de acuerdo

a nuestros resultados, estos beneficios serían solo teóricos.

No hemos encontrado estudios, experimentales o clínicos, que comparen el uso del mismo AH en dosis única contra 3 dosis. Strauss et al.²² asociaron a las microfracturas un protocolo de 3 o 5 dosis semanales de AH, señalando una diferencia estadísticamente significativa en favor del uso de 3 dosis, a los 3 meses, aunque la apariencia macroscópica e histológica del tejido formado en la lesión, a los 6 meses, fue similar a la del grupo control.

Una limitación de nuestro estudio es que sólo evaluamos parámetros morfológicos y no funcionales. Sin embargo, nuestro objetivo fue describir el efecto de dos diferentes protocolos de tratamiento con AH, analizando su capacidad regenerativa en el tratamiento de lesiones condrales y no su impacto en la función articular. Probablemente, la mayor fortaleza del presente trabajo es el uso de un método fácil y reproducible, en cuanto al uso de un mismo procedimiento anestésico, técnica quirúrgica y manejo perioperatorio. El hecho de que los resultados macroscópicos e histológicos fueran similares entre ellos también sugiere que nuestro análisis fue preciso y representa una doble comprobación del tejido generado.

En el presente estudio, nosotros demostramos que el uso de un protocolo de 3 dosis de AH en comparación con la dosis única no mejora significativamente la regeneración del cartílago hialino en lesiones condrales agudas de espesor completo en conejos.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Harris JD, Brophy RH, Siston RA, Flanigan DC. Treatment of chondral defects in the athlete's knee. *Arthroscopy*. 2010;26:841–52.
- Yelin E. Cost of musculoskeletal diseases: impact of work disability and functional decline. *J Rheumatol Suppl*. 2003;68:8–11.
- Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater*. 2005;9:23–32.
- Risbud MV, Sittlinger M. Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation. *Trends Biotechnol*. 2002;20:351–6.
- Kamarul T, Ab-Rahim S, Tumin M, Selvaratnam L, Ahmad TS. A preliminary study of the effects of glucosamine sulphate and chondroitin sulphate on surgically treated and untreated focal cartilage damage. *Eur Cell Mater*. 2011;21:259–71.
- Wen Z-H, Tang C-C, Chang Y-C, Huang SY, Hsieh SP, Lee CH, et al. Glucosamine sulfate reduces experimental osteoarthritis and nociception in rats: association with changes of mitogen-activated protein kinase in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18:1192–202.
- Chen L, Ling PX, Jin Y, Zhang TM. Hyaluronic acid in combination with chondroitin sulfate and hyaluronic acid improved the degeneration of synovium and cartilage equally in rabbits with osteoarthritis. *Drug Discov Ther*. 2011;5:190–4.
- Balazs EA, Denlinger JL. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*. 1993;39:3–9.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J. The pathophysiology of osteoarthritis and the implication of the use of hyaluronan and hylan as therapeutic agents in viscosupplementation. *J Rheumatol Suppl*. 1993;39:19–24.
- Strand V, Baraf HSB, Lavin PT, Lim S, Hosokawa H. A multicenter, randomized controlled trial comparing a single intra-articular injection of Gel-200, a new cross-linked formulation of hyaluronic acid, to phosphate buffered saline for treatment of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20:350–6.
- Bellamy N, Campbell J, Robinson V, Gee T, Bourne R, Wells G. Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;2:CD005321.
- Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1 β (IL-1 β), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999;7:182–90.
- Hulmes DJS, 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;12:232–8.
- Miyakoshi N, Kobayashi M, Nozaka K, Okada K, Shimada Y, Itoi E. Effects of intraarticular administration of basic fibroblast growth factor with hyaluronic acid on osteochondral defects of the knee in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2005;125:683–92.
- Kaplan LD, Lu Y, Snitzer J, Nemke B, Hao Z, Biro S, et al. The effect of early hyaluronic acid delivery on the development of an acute articular cartilage lesion in a sheep model. *Am J Sports Med*. 2009;37:2323–7.
- Hui JHP, Chen F, Thambyah A, Lee EH. Treatment of chondral lesions in advanced osteochondritis dissecans: a comparative study of the efficacy of chondrocytes, mesenchymal stem cells, periosteal graft, and mosaicplasty (osteochondral autograft) in animal models. *J Pediatr Orthop*. 2004;24:427–33.
- Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg (Am)*. 2003;85-A Suppl 2:45–57.
- Altman RD, Moskowitz R, Hyalgan Study Group. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. *J Rheumatol*. 1998;25:2203–12.
- Berenbaum F, Grifka J, Cazzaniga S, D'Amato M, Giacomelli G, Chevalier X, et al. A randomised, double-blind, controlled trial comparing two intra-articular hyaluronic acid preparations differing by their molecular weight in symptomatic knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:1454–60.
- Jansen EJP, Emans PJ, Douw CM, Guldemond NA, Van Rhijn LW, Bulstra SK, et al. One intra-articular injection of hyaluronan prevents cell death and improves cell metabolism in a model of injured articular cartilage in the rabbit. *J Orthop Res*. 2008;26:624–30.
- Kang S-W, Bada LP, Kang C-S, Lee JS, Kim CH, Park JH, et al. Articular cartilage regeneration with microfracture and hyaluronic acid. *Biotechnol Lett*. 2008;30:435–9.
- Strauss E, Schachter A, Frenkel S, Rosen J. The efficacy of intra-articular hyaluronan injection after the microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions. *Am J Sports Med*. 2009;37:720–6.
- Campo GM, Avenoso A, Nastasi G, Micali A, Prestipino V, Vaccaro M, et al. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812:1170–81.
- Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther*. 2003;5:54–67.
- Dougados M. Sodium hyaluronate therapy in osteoarthritis: arguments for a potential beneficial structural effect. *Semin Arthritis Rheum*. 2000;30 Suppl 1:19–25.