

# Ácido hialurónico intraarticular en el tratamiento de la artrosis de rodilla: estudio clínico y morfológico.

L. Frizziero<sup>(1)</sup>, E. Govoni<sup>(2)</sup>, P. Bacchini<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Departamento de Medicina Interna. Unidad de Reumatología. Hospital Maggiore. Bolonia.

<sup>(2)</sup>Instituto de Patología Anatómica. Universidad de Milán. Milán.

<sup>(3)</sup>Servicio de Anatomía e Histopatología. Hospital Malpighi. Bolonia, Italia.

## Correspondencia:

Dr. Luigi Frizziero

Divisione di Medicina Interna. Ospedale Maggiore, Largo B. Nigrisoli 2. 40133 Bologna, Italy.

Artículo remitido por Bioibérica para su publicación con fines promocionales y publicado en *CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY*, 1998; 16: 441-449.

**Objetivo:** evaluar en un ensayo clínico piloto, abierto en 40 pacientes con artrosis de rodilla, los cambios estructurales de la membrana sinovial y el cartílago tras tratamiento con ácido hialurónico intraarticular (AH-Hyalgan®). **Método:** se evaluaron los efectos estructurales del ácido hialurónico administrado en 5 inyecciones (20 mg/2 ml una vez por semana durante 5 semanas), mediante microartroscopia y análisis morfológico de muestras biópsicas recogidas a ciegas al inicio del estudio y después de 6 meses. La eficacia clínica también fue evaluada mediante escalas analógicas visuales con parámetros funcionales y de dolor. **Resultados:** a los 6 meses, la evaluación microartroscópica indicó que la mayoría de los pacientes (60%) no presentaban cambios si se compara con el inicio del estudio, mientras que un 32,5% de los pacientes mostró una mejora en el grado y/o la extensión de las lesiones del cartílago y un 7,5% presentó una condición empeorada. Estos cambios iban acompañados de una reducción estadísticamente significativa de la inflamación sinovial ( $p = 0,001$ ). Los resultados fueron confirmados mediante examen morfológico del cartílago y la membrana sinovial. A los 6 meses se observó una reconstitución de la capa superficial amorfa del cartílago estadísticamente significativa ( $p = 0,0039$ ), una mejora en la densidad ( $p = 0,0023$ ) y la vitalidad ( $p = 0,05$ ) de los condrocitos, y una reducción de la inflamación sinovial estadísticamente significativa ( $p = 0,0001$ ) acompañada de un aumento significativo del proceso de reparación sinovial. También se registró una mejora significativa y duradera del dolor y la movilidad de la articulación tras el tratamiento con AH. Disminuyó el derrame articular en los casos en los que se encontraba presente. El tratamiento fue bien tolerado. **Conclusión:** Hyalgan® constituye una terapia útil para la artrosis de rodilla, con una eficacia sintomática duradera y efectos potenciales positivos sobre los tejidos de las articulaciones. Con seguridad, nuevos estudios -en especial estudios controlados con placebo- confirmarán estos prometedores resultados observados en los tejidos de las articulaciones.

**Palabras clave:** Ácido hialurónico, artrosis de rodilla, microartroscopia, cartílago, membrana sinovial, ensayo clínico.

**Intraarticular hyaluronic acid in the management of knee osteoarthritis: a clinical and morphologic study.** **Aims:** To assess, in an open pilot clinical study on 40 patients with knee osteoarthritis, the structural changes in the synovial membrane and the cartilage after treatment with intraarticular hyaluronic acid (AH-Hyalgan®). **Method:** The structural effects of hyaluronic acid given in the form of 5 injections (20 mg/2 ml once weekly for five weeks) were assessed using microarthroscopy and morphologic analysis of blind biopsy samples taken at the beginning of the study and after six months. The clinical efficacy was also assessed using visual analogic scales with functional and pain parameters. **Results:** six months after therapy, the microarthroscopic assessment showed that most patients (60%) evidenced no changes as compared to their status at the beginning of the study, while improvement in the degree and/or extension of the cartilage lesions was seen in 32.5% and worsening in 7.5%. These changes were associated to a statistically significant decrease of synovial inflammation ( $p = 0.001$ ). These results were confirmed by the morphologic assessment of the synovial membrane and cartilage: six months after treatment there was statistically significant reconstitution of the amorphous superficial stratum of the cartilage ( $p = 0.0039$ ), statistically significant improvement in chondrocyte density ( $p = 0.0023$ ) and vitality ( $p = 0.05$ ), and statistically significant decrease of synovial inflammation ( $p = 0.0001$ ) together with a significant increase of the synovial repair process. Significant and long-lasting improvements were also seen in articular pain and mobility after AH therapy. When previously present, the articular effusion decreased. The treatment was well tolerated. **Conclusions:** Hyalgan® represents a useful therapy for knee osteoarthritis, with long-lasting symptomatic efficacy and potential positive effects on the articular tissues. Further studies, and especially placebo-controlled ones, shall certainly confirm these promising results observed in the tissues of the joints.

**Key words:** Hyaluronic acid, osteoarthritis of the knee, microarthroscopy, cartilage, synovial membrane, clinical trial.

**L**a artrosis (A) es un proceso que implica una perturbación del equilibrio normal entre degradación y reparación en el cartílago articular y el hueso subcondral, acom-



pañado de fibrosis capsular, formación marginal de osteofitos y un grado variable de inflamación de la membrana sinovial<sup>(1)</sup>. Algunos autores consideran la inflamación de la mem-

brana sinovial la causa principal del inicio de la artrosis, mientras que otros opinan que es posterior a la degradación del cartilago<sup>(2-4)</sup>. Existe una estrecha relación entre el cartilago articular y la membrana sinovial, hasta el punto de que la artrosis se considera como un proceso que afecta a la articulación en su totalidad<sup>(1)</sup>. En el pasado, la terapia para la artrosis no tenía en consideración las causas reales y los mecanismos patogénicos subyacentes de dicha condición, y se centraba en tratar los síntomas, más que en interferir en la progresión del daño del cartilago. Este enfoque está cambiando actualmente, con el desarrollo de medicamentos caracterizados por una actividad modificadora de la estructura, esto es, capaces de retardar el proceso de degeneración del cartilago y/o aumentar el proceso de reparación<sup>(5,6)</sup>.

El ácido hialurónico (AH) es uno de los componentes principales de la matriz extracelular del cartilago y las capas superficiales de la membrana sinovial, y está presente en elevadas concentraciones en el líquido sinovial. En el medio articular, el AH juega un papel clave en la determinación de las propiedades viscoelásticas del líquido sinovial, manteniendo las características estructurales y funcionales de la matriz del cartilago, y regulando diversas actividades celulares a través de receptores celulares de AH e interacciones de glucoproteínas-AH<sup>(7-11)</sup>. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el AH puede inducir la agregación y la síntesis de proteoglicanos<sup>(12,13)</sup>, estimular las células sinoviales para producir AH<sup>(14)</sup>, modular la respuesta inflamatoria<sup>(15-17)</sup>, reducir la quimiotaxis y la migración de leucocitos, neutrófilos, linfocitos<sup>(18,19)</sup> y, finalmente, posee un efecto neutralizador sobre los radicales libres del oxígeno<sup>(20-22)</sup>. En la artrosis tiene lugar una reducción de la concentración y el peso molecular del AH en el líquido sinovial, que resulta en una reducción de la viscoelasticidad del líquido y en una mayor susceptibilidad del cartilago a la degradación.

Hyalgan<sup>®</sup> (Fidia SpA) es una preparación de AH de elevado peso molecular, altamente purificado, cuyos beneficios sintomáticos en el tratamiento de la artrosis han sido probados previamente en el tratamiento de la artrosis en diversos ensayos clínicos<sup>(23-28)</sup>. Algunos estudios experimentales han sugerido que el AH intrarticular podría influir también en el proceso degenerativo, preservando la vitalidad de los condrocitos y la estructura del cartilago, así como reduciendo la proliferación de células

sinoviales<sup>(29-31)</sup>. Estos hallazgos nos llevaron a investigar, en un ensayo clínico piloto en pacientes con artrosis de la rodilla, los efectos de la administración de AH intrarticular sobre el cartilago y la membrana sinovial.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Pacientes

El estudio se realizó en 40 pacientes (13 hombres y 27 mujeres) con artrosis (A) inflamatoria, que padecían síntomas articulares dolorosos en reposo y/o al realizar movimiento, al inicio del estudio. La media de edad de los pacientes era de  $49,5 \pm 9,5$  (DE) años. La artrosis fue diagnosticada mediante pruebas clínicas y radiológicas (criterios del *American College of Rheumatology*) y fue confirmada mediante artroscopia. Se excluyeron del estudio los pacientes con enfermedades concomitantes severas, con posible infección articular, los que recibían tratamientos concomitantes que podrían interferir en los resultados, los tratados previamente con medicamentos intrarticulares y los pacientes que no parecían ser de fiar o menos dispuestos a colaborar. Antes de participar en el estudio todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito.

### Diseño del estudio y evaluaciones

Fue un estudio piloto abierto, de 6 meses, en el que las evaluaciones artroscópicas y morfológicas se llevaron a cabo a ciegas tal como se describe a continuación. Para el examen artroscópico del cartilago y la membrana sinovial, y para mantener las condiciones de un estudio a ciegas, todo el examen artroscópico fue realizado por el investigador principal mediante una videocámara. Al final del estudio, un segundo investigador examinó las cintas de vídeo que habían sido editadas previamente para extraer todas las referencias al orden del número de pacientes y cualquier otra información (esto es, basal-secuencia final) que podrían influenciar al investigador. A cada vídeo se le asignó un número extraído de una lista adecuadamente aleatorizada. El examen histológico por microscopía óptica y electrónica de las muestras biópsicas del cartilago y la membrana sinovial tomadas durante la artroscopia fue realizado a ciegas por tres investigadores distintos. Se asignaron números aleatorios a las preparaciones para eliminar cualquier posibilidad de sesgo.

## Programa del estudio

En la visita de admisión, después de revisar los criterios de selección y la evaluación de la severidad clínica y radiológica de la artrosis (Kellgren-Lawrence), los pacientes considerados adecuados para el estudio fueron sometidos a una artroscopia de la rodilla en la que se les extrajeron muestras biópsicas del cartílago y de la membrana sinovial.

La primera visita tuvo lugar 15 o 30 días después de la examinación artroscópica. Durante esta visita se recogieron muestras de sangre y orina para estudios de laboratorio rutinarios y el paciente inició el tratamiento de 5 inyecciones intrarticulares de Hyalgan® (20 mg/2ml, una vez por semana durante 5 semanas). La eficacia clínica se evaluó semanalmente durante el tratamiento, los días 7, 14, 21 y 28 y, posteriormente, los días 35, 90, 180 y 360 (opcional). El día 35 se recogieron muestras de sangre y orina para los análisis de laboratorio. El día 180, durante la última artroscopia de rodilla, se tomaron de nuevo muestras biópsicas del cartílago y la membrana sinovial para su posterior examen morfológico.

## Procedimiento seguido en el examen artroscópico y muestras biópsicas

Se utilizaron los artroscopios Hamou-Storz y Microview-Wolf, adaptados de los microhisteroscopios de 4 mm de diámetro y 20 cm de largo mediante una modificación de la palanca, con una lente oblicua de 30°, un campo de visión de 90°, y ampliaciones de hasta 150 veces el campo normal (microartroscopios). Estos instrumentos tienen una resolución de ~ 1,5 µm, comparable a la de un microscopio óptico normal de x150. La profundidad del campo utilizado (~ 80 µm) permitió la observación de la arquitectura sinovial y del modelo capilar terminal. La luz era proveída por generadores de luz, la intensidad de los cuales podía variar de 150 a 1.000 W tanto para la observación directa, la fotografía con flash y la grabación en vídeo.

Se fotografiaron muestras con una cámara Olympus OM2 equipada con un objetivo Storz; la grabación en vídeo se realizó con una videocámara Ikegami ITC-370 M conectada a un vídeo Sony U-Matic V 0-5800 PS. La anestesia local fue inducida por infiltración de los tejidos cutáneos en la base del área seleccionada para el acceso con 20 ml 2% mepivacaína HCl sin un vasocon-

trictor. El acceso siempre se efectuó antero-lateralmente (curso subpatelar) con la rodilla flexionada a un ángulo de 30°. El examen endoscópico empezó con una ampliación de 1x para obtener la visión de un ángulo amplio similar al que ofrece un artroscopio normal. La artroscopia fue realizada mediante procedimiento previamente descrito<sup>(32)</sup>, utilizando irrigación intermitente con acetato de Ringer y regulando la presión de infusión para optimizar el grado de distensión de la cavidad articular.

La microartroscopia (examinación artroscópica ampliada/magnificada<sup>(33)</sup>) fue llevada a cabo tras la inyección de un 1% de solución acuosa de metileno azul (3 ml, pH 4.5), seguido de un lavado salino tras 5 minutos. El examen microartroscópico de la membrana sinovial se realizó con una ampliación de 20x para obtener un amplio ángulo de visión; se utilizó una ampliación de 60x para examinar la estructura de la membrana sinovial y de 150x para los componentes celulares de la capa externa y subintimal.

## Muestras biópsicas

- **Membrana sinovial.** Se extrajeron muestras de la membrana sinovial de la cavidad suprapatelar y del compartimento anteromedial mediante procedimiento estandarizado previamente descrito<sup>(34)</sup>. Durante este proceso la rodilla del paciente estaba flexionada en un ángulo de 30°.

El área seleccionada para la extracción de las muestras de la cavidad suprapatelar se identificó tomando el punto de intersección del eje a través de la mitad de la patela con la línea recta, correspondiente al eje de penetración del artroscopio insertado en la posición subpatelar anteromedial y mantenida tangencialmente al vértice del cóndilo femoral medial. El punto de contacto del artroscopio con la membrana sinovial se determinó por transiluminación y fue marcado sobre la piel.

El área seleccionada en el compartimento anteromedial se identificó tomando el punto de intersección de la línea tangencial al margen anterior del ligamento colateral medial con la línea correspondiente al vértice de la penetración artroscópica, tangente al cóndilo femoral. El punto de contacto del artroscopio se señaló tal como se ha descrito. Se tomaron biopsias de las zonas señaladas con fórceps *basket*.

- **Cartílago.** Sólo se tomaron biopsias del cartílago articular de aquellos pacientes con lesiones de grado artroscópico II (por ejemplo:

cartilago marcado por fibrilación, fisuras y un aspecto aterciopelado). Se tomaron muestras de los márgenes de la lesión, que fue fácilmente identificada por una tinción más intensa del metileno azul en la zona dañada en comparación con el tejido sano. Se adoptaron una serie de procedimientos estandarizados para todos los pacientes<sup>(34)</sup>. Se insertó una sonda bajo continuo control artroscópico, utilizando una ruta de acceso independiente según el compartimento del tejido involucrado, con el fin de determinar el área exacta para la extracción de la muestra. En todos los casos la rodilla del paciente estaba flexionada a un ángulo de 30° y la muestra biopsica se obtuvo mediante fórceps *basket*.

Para la patela, se insertó la sonda medialmente en el espacio femoropatelar, avanzando a lo largo de una línea que coincidía con el eje transversal medio de la patela hasta que el vértice coincidía con la zona elegida para extraer las muestras.

Para los cóndilos femorales mediales y laterales, la sonda se introdujo en el punto de intersección de una línea recta tangencial al margen anterior del ligamento colateral con la juntura sinovia-menisco. Se avanzó a través del cóndilo femoral tangente hasta que el vértice de la sonda coincidía con el área elegida para extraer las muestras.

Para las mesetas tibiales mediales y laterales, la ruta de inserción de la sonda fue la misma descrita para el cóndilo femoral medial. La sonda avanzaba a través del cóndilo femoral, pasando tangencialmente la espina tibial hasta que el vértice coincidía con el área elegida para extraer las muestras.

### Preparación de los especímenes

Tras la escisión, las muestras biopsicas de la membrana sinovial y el cartilago articular se dividieron inmediatamente en dos fragmentos especulares para la microscopía lumínica y electrónica. Para la microscopía lumínica, se fijaron muestras en 10% de formalina que contenían un tampón de fosfato y se procesaron de forma rutinaria. Las secciones fueron coloradas utilizando distintos métodos histomorfológicos, y para las muestras de cartilago se utilizó Safranina O<sup>(35)</sup>. Las muestras para la microscopía electrónica estuvieron sujetas a una serie de procedimientos estándar de fijación, inclusión y coloración. El análisis ultraestructural morfomé-

trico se realizó en microfotografías tomadas con la ampliación estándar. La evaluación cuantitativa se realizó por un sistema interactivo analizador de la imagen (IBAS).

### Evaluación artroscópica y microartroscópica

Se utilizaron las escalas modificadas de Outerbridge y Noyes para evaluar el grado y extensión del daño del cartilago para cada compartimento de la rodilla<sup>(36,37)</sup>. El grado de las lesiones del cartilago fue evaluado con una escala de 5 puntos: grado 0: cartilago intacto; grado I: superficie aparentemente lisa; aspecto de cristal helado, reblandecimiento, descamación; grado II: fibrilación, fisuras, aspecto aterciopelado; grado III: quebraduras, fisuras; y grado IV: erosión extensa y profunda con exposición del hueso subcondral.

La extensión de las lesiones del cartilago fue evaluada mediante una escala de 6 puntos que abarcaba el porcentaje de la superficie total del compartimento afectado del siguiente modo: 0 = sin lesiones; 1 = extensión de la lesión < 20%; 2 = extensión de la lesión 21 a 40%; 3 = extensión de la lesión 41 a 60%; 4 = extensión de la lesión 61 a 80%; 5 = extensión de la lesión > 80%. Todas las evaluaciones se realizaron a ciegas, tal como se ha descrito previamente.

La evaluación artroscópica y microartroscópica de la sinovitis se realizó a ciegas con un sistema de puntuación previamente descrito<sup>(34)</sup>. La intensidad de la sinovitis fue graduada mediante una escala que ofrecía una puntuación total (0-100) y que consistía en la suma de 3 puntuaciones parciales evaluando las características macroscópicas, la vascularización y la densidad, y la forma de las células.

### Evaluación histológica

El cartilago articular fue evaluado a ciegas con tres métodos comúnmente aplicados en situaciones clínicas. Para evaluar las características estructurales de la capa amorfa superficial, se utilizó una escala de 5 puntos: grado 0: grosor normal; grado 1: aspecto compacto; grado 2: agregados con agujeros; grado 3: reducción del grosor; grado 4: fragmentación.

Se obtuvo una evaluación global del daño del cartilago con respecto a los condrocitos y la matriz extracelular con la escala de Mankin<sup>(38)</sup>,

que da una puntuación total (0-13) constituida por tres aspectos diferentes del daño del cartílago: la integridad de la estructura del tejido, la población de condrocitos, y el grado de coloración con safranina. La vitalidad de los condrocitos fue evaluada midiendo el número de condrocitos metabólicamente activos (densidad de condrocitos/1.000 mm<sup>2</sup> tejido) y el área (mm<sup>2</sup>) y/o volumen (mm<sup>3</sup>) ocupado por los componentes de los sistemas anabólicos y catabólicos de los condrocitos (retículo endoplasmático, aparato Golgi, lisosomas, vacuolas de ácidos grasos, mitocondria).

La evaluación histológica de la membrana sinovial se realizó utilizando tres parámetros que pueden estar correlacionados con los parámetros endoscópicos de la membrana sinovial: el grosor de la capa, el número de células mononucleares infiltradas y la extensión de la fibrosis. Además, para evaluar el aspecto de las zonas subsinoviales íntima y subíntima, se utilizaron los siguientes parámetros: el número de capas externas (número de capas x 5 campos) y el número de células mononucleares infiltradas (número de células x 10 campos), ambos relacionados con el proceso inflamatorio proliferativo-reactivo y la extensión de la fibrosis en las zonas profundas (escala de puntuación: 0 = 0-10%, 1 = 10-30%, 2 = 30-50%, 3 = 50-70%, 4 = 70-90%, 5 = 90-100%) relacionadas con el proceso reparador. Todas las evaluaciones se realizaron a ciegas.

### E cacia clínica

Los principales parámetros clínicos utilizados fueron dolor al descansar y dolor al realizar movimiento, medidos por escala analógica visual (EAV) de 100 mm, y movimiento activo y pasivo articular (de la posición de máxima extensión a la de máxima flexión) medida en grados con un goniómetro. Los criterios menores fueron el ángulo (grado) de máxima flexión y extensión activa del ángulo recto (180°), la presencia/ausencia de derrame articular y la circunferencia articular (cm).

### Criterios de seguridad

La tolerabilidad del tratamiento se evaluó siguiendo los efectos adversos y mediante urinalisis y tests hematológicos y bioquímicos estándar realizados al inicio y al final del tratamiento (día 35).

### Análisis estadístico

Los parámetros artroscópicos y microartroscópicos fueron analizados con el test de la *t* de *Student* para los datos pareados sobre las diferencias desde el inicio. Las evaluaciones morfológicas [capa amorfa superficial y escala Mankin (total y componentes)] se evaluaron mediante el test de rangos de Wilcoxon para las diferencias con respecto al inicio del estudio. El análisis de la variancia se aplicó a los datos clínicos y el test de la *t* de Dunnett se utilizó para probar las diferencias desde el inicio del estudio en cada visita. El nivel de significancia estadística se estableció en 5%.

## RESULTADOS

Las características demográficas y artrósicas de los pacientes admitidos en el estudio se recogen en la **Tabla I**.

### Evaluación artroscópica y microartroscópica del cartílago articular

La **Tabla II** muestra los cambios observados con respecto al inicio en la evaluación artroscópica final (día 180) en cuanto al grado de la lesión y su extensión, mientras que la **Tabla III** muestra los cambios expresados en términos de mejora o falta de ella para toda la articulación.

Al inicio, 33 pacientes presentaron lesiones del cóndilo femoral medial, mientras que en la evaluación final 9 de ellos mostraron evidencias de reparación. En dos de estos 9 casos los cambios concernían tanto al grado como a la extensión de la lesión, en 5 sólo la extensión y en los dos restantes sólo el grado. No se observó un deterioro de la condición en ninguno de los pacientes.

Un total de 27 pacientes tenían lesiones de la meseta tibial medial al inicio del estudio, y en la última evaluación ningún paciente presentó una mejora del grado de la enfermedad. Sin embargo, por lo que respecta a la extensión de la lesión, 4 mejoraron y 1 empeoró.

Al inicio, 12 pacientes tenían lesiones que afectaban al cóndilo femoral lateral. Siete de éstos presentaron una mejora en la evaluación final, 3 en el grado de la enfermedad y 4 en la extensión de la lesión. No empeoró la condición de ninguno de los pacientes.

Once pacientes presentaban lesiones en la zona de la meseta tibial lateral al inicio, y 4

Tabla I

CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y ARTRÓSICAS DE LOS PACIENTES AL INICIO DEL ESTUDIO	
Número	40
Sexo (H/M)	13/27
Edad (años) media $\pm$ DE (Rango)	49,50 $\pm$ 9,61 18-60)
Reducción del movimiento activo (no/sí)	5/35
Derrame articular (no/sí)	23/17
Duración de la enfermedad (meses) media $\pm$ DE (Rango)	28,90 $\pm$ 27,03 (2-120)
Severidad clínica de la A	
Leve	5
Moderada	28
Severa	7
Deformidad de la rodilla	
Normal	2
Vara	35
Torcida	3
Severidad radiológica (Kellgren)	
I	4
II	30
III	6
Lugar de las lesiones (compartimentos de la rodilla)	
Medial femorotibial	3
Lateral femorotibial	3
Patela	4
Medial femorotibial + patela	21
Medial + lateral femorotibial + patela	9

mejoraron en la evaluación final, 2 con respecto al grado de la enfermedad y 2 con respecto a la extensión de las lesiones.

Finalmente, al inicio, 34 pacientes presentaron lesiones que afectaban a la patela y en la valoración final 7 habían mejorado, 2 en el grado de la enfermedad y 5 en la extensión. Dos pacientes presentaron deterioro, uno en el grado y otro en la extensión de la lesión. La **Tabla IV** presenta los resultados de la valoración global de todos los compartimentos articulares. Como puede observarse, hubo una disminución de la extensión de la lesión en el 30% de los casos, y del grado de la enfermedad en el 17,5%. Un 5% empeoró en ambos aspectos. Las características del cartílago en términos del grado de la enfermedad y/o la extensión de la lesión mejoraron en 32,5% de los pacientes y deterioraron en sólo 7,5%

Las mejoras en las lesiones del cartílago se observaron con más frecuencia en los pacientes con un menor grado inicial de la enferme-

dad (56%) que en los que tenían un grado más elevado inicialmente (27%). Dado que en la examinación final se observó un deterioro en sólo 3 de los 40 pacientes (7,5%) no fue posible realizar una evaluación fiable de la incidencia del deterioro en los dos subgrupos (**Tablas V**).

#### Estudios histológicos del cartílago

Como se describe en la sección **Material y método**, sólo se tomaron muestras biópsicas del cartílago de 9 pacientes que presentaban lesiones de grado II en la examinación artroscópica basal. En la **Tabla VI** se presentan los resultados después del tratamiento en estos 9 pacientes. En el control final (el día 180), la capa amorfa presentó una estructura y grosor normales en 6 casos, y en otros 2 el grosor fisiológico normal fue restaurado. Las diferencias entre los valores basales y finales fueron significativas ( $p = 0,0039$ ). La evaluación global de la estructura cartilaginosa se realizó utilizando la escala

Tabla II

CAMBIOS ARTROSCÓPICOS REFLEJADOS EN EL GRADO Y LA EXTENSIÓN DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO EN EL SEXTO MES EN COMPARACIÓN CON LOS VALORES INICIALES EN LOS DISTINTOS COMPARTIMENTOS DE LA RODILLA

Compartimento	Grado(1)			Extensión(2)		
		Inicio (n = 40)	Mes 6 (n = 40)		Inicio (n = 40)	Mes 6 (n = 40)
Cóndilo femoral medial	Normal	7	7	Sin lesión	7	7
	II	9	13	1	1	2
	III	24	20	2	3	5
				3	10	11
				4	11	9
5	8	6				
Platillo tibial medial	Normal	13	13	Sin lesión	13	13
	II	8	8	1	1	1
	III	18	18	2	7	9
	IV	1	1	3	11	11
				4	5	4
5	3	2				
Cóndilo femoral lateral	Normal	28	28	Sin lesión	28	28
	I	0	2	1	0	3
	II	8	7	2	5	4
	III	4	3	3	4	2
				4	2	2
5	2	1				
Platillo tibial lateral	Normal	30	29	Sin lesión	30	29
	I	0	3	1	2	2
	II	7	5	2	2	5
	III	3	3	3	3	1
				4	2	2
5	1	1				
Patela	Normal	6	6	Sin lesión	6	6
	I	0	1	1	0	1
	II	12	12	2	4	6
	III	22	20	3	11	11
	IV	0	1	4	11	8
			5	8	8	

(1)Puntuación de la extensión 1: < 20%; 2:21 - 40%; 3:41 - 60%; 4:61 - 80%; 5 < 80% de la superficie total del compartimento afectado.

(2)Grado de las lesiones del cartilago: I = superficie aparentemente lisa, aspecto de cristal helado, reblandecimiento, descamación; II = fibrilación, fisuras: aspecto aterciopelado; III = hendiduras y fisuras; IV = erosión extensa y profunda con exposición del hueso subcondral.

de Mankin. En 6 de los 9 pacientes, la puntuación total se redujo en el control final en comparación con el inicio. El parámetro que presentó mayor grado de cambio fue la coloración con safranina, que refleja la reconstrucción de la matriz extracelular. En este caso, la diferencia entre los valores iniciales y finales alcanzaron, por poco, una significancia estadística ( $p = 0,06$ ).

La evaluación del sistema de condrocitos ultraestructural mostró que la densidad media (DE) de condrocitos había aumentado después del tratamiento ( $1,19 \pm 0,17/1.000 \text{ mm}^2$  de tejido) comparado con el inicio ( $1,00 \pm 0,23$ ), alcanzando los valores de referencia normales recogidos en la literatura ( $1,36 \pm 0,30$ ). Las diferencias entre los valores del inicio y los del control final fueron significati-

Tabla III

**CAMBIOS ARTROSCÓPICOS EN EL MES 6 EN COMPARACIÓN CON EL INICIO DEL ESTUDIO SOBRE EL GRADO Y LA EXTENSIÓN DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO EN LOS COMPARTIMENTOS DE LA RODILLA**

Compartimento		Grado (n = 40)	Extensión (n = 40)
Cóndilo femoral medial	Sin lesiones	7	7
	Sin cambios	29	26
	Mejora	4	7
Platillo medial tibial	Sin lesiones	13	13
	Empeoramiento	-	1
	Sin cambios	27	22
	Mejora	-	4
Cóndilo femoral lateral	Sin lesiones	28	28
	Sin cambios	9	8
	Mejora	3	4
Platillo tibial lateral	Sin lesiones	29	29
	Empeoramiento	1	1
	Sin cambios	8	8
	Mejora	2	2
Patela	Sin lesiones	6	6
	Empeoramiento	1	1
	Sin cambios	31	27
	Mejora	2	6
Cambios globales	Empeoramiento	2	2
	Sin cambios	31	26
	Mejora	7	12

Tabla IV

**CAMBIOS ARTROSCÓPICOS EN EL GRADO Y LA EXTENSIÓN DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO EN EL MES 6 EN COMPARACIÓN CON LOS VALORES INICIALES: VALORACIÓN GLOBAL DE TODOS LOS COMPARTIMENTOS DE LA RODILLA EN LOS 40 PACIENTES TRATADOS.**

	Grado		Extensión		Grado/extensión	
	Nº de pacientes	%	Nº de pacientes	%	Nº de pacientes	%
Mejora	7	17,5	12	30	13	32,5
Sin cambios	31	77,5	26 <sup>(1)</sup>	65	24 <sup>(2)</sup>	60
Empeoramiento	2	5	2	5	3 <sup>(3)</sup>	7,5

<sup>(1)</sup>Un paciente empeoró en el platillo tibial lateral y mejoró en el cóndilo femoral medial.

<sup>(2)</sup>Un paciente empeoró en el grado de la enfermedad en la patela pero mejoró respecto a la extensión de la lesión.

<sup>(3)</sup>Un paciente empeoró en el grado y la extensión de la lesión en la patela pero mejoró respecto a la extensión en el cóndilo femoral medial.

vas ( $p = 0,0023$ ). Además, todas las áreas y volúmenes relativos ocupados por las organelas, inclusiones y mitocondria, mostraron una mejora significativa después del tratamiento ( $p > 0,05$ ).

#### Evaluación artroscópica y microartroscópica de la membrana sinovial

El día del control final (día 180), la puntuación media (DE) total para el grado de sinovitis fue



Tabla V

CAMBIOS ARTROSCÓPICOS SOBRE LAS MODIFICACIONES EN EL GRADO DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO EN EL MES 6 CON RESPECTO A LOS VALORES INICIALES PARA LOS 40 PACIENTES SUBDIVIDIDOS SEGÚN EL GRADO INICIAL DE LA LESIÓN EN EL COMPARTIMENTO MÁS AFECTADO							
Grado	Inicio		Mes 6				
	Nº de pacientes	Mejora		Sin cambios		Empeoramiento	
		Nº pacientes	%	Nº pacientes	%	Nº pacientes	%
I	9	5	56	3	33	1	11
III	30	8	27	20	67	2	6
IV	1	0		1		0	

Tabla VI

ESTRUCTURA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR: CAMBIOS MORFOLÓGICOS OBSERVADOS EN LAS MUESTRAS BIÓPSICAS TOMADAS AL INICIO Y EN EL MES 6 EN 9 PACIENTES.		
Variables morfológicas	Inicio (n = 9)	Mes 6 (n = 9)
<b>Capa superficial Amorfa (valor)</b>		<b>p = 0,039</b>
0	0	3
1	0	3
2	1	2
3	5	1
4	3	0
<b>Escala Mankin (valor)</b>		<b>p = 0,1250</b>
<b>Integridad estructural</b>		
0	0	1
1	3	4
2	4	3
3	2	1
<b>Integridad celular</b>		<b>p = 0,6250</b>
0	2	5
1	7	3
2	0	1
<b>Tinción con Safranina O</b>		<b>p = 0,0625</b>
0	2	4
1	3	4
2	3	1
3	1	0
<b>Puntuación total</b>		<b>p = 0,0625</b>
0	0	1
1	2	3
2	1	1
4	2	3
5	2	0
6	1	0
7	1	1

de  $48,5 \pm 13,41$  comparado con  $62,25 \pm 9,74$  al inicio. Esto fue equivalente a una mejora del 22%, con una diferencia altamente significativa ( $p = 0,0001$ ). Por lo que respecta a los pacientes individuales, 32 presentaron una disminución en el grado de su sinovitis, 3 no cambiaron y 5 presentaron un aumento. La **Tabla VII** recoge, por separado, los resultados de los tres parámetros (características macroscópicas, vascularización, componente celular) que constituyeron la puntuación global. Se encontró una reducción estadísticamente significativa entre los valores iniciales y finales para todos los parámetros ( $p = 0,0001$ ).

#### Histología de la membrana sinovial

La histología se realizó a ciegas por observadores independientes. La repetibilidad inter e intra-observador de la evaluación fue elevada, con un coeficiente r que siempre fue  $> 0,92$ .

El grosor de la capa, en términos del número de capas de sinoviocitos estratificados, representa un índice de fenómenos reactivos-proliferativos y está estrechamente vinculado al proceso exudativo de la infiltración. En el control final (día 180) hubo una diferencia significativa del grosor de la capa (media de capas por campo  $\pm$  DE =  $2,64 \pm 0,71$ ) en comparación con el inicio ( $3,25 \pm 0,67$ ) ( $p = 0,0001$ ). Por lo que respecta a los pacientes individuales, hubo una disminución del grosor de la capa en 34 casos, ningún cambio en 2 y un aumento en 4.

El número de células mononucleares infiltradas en las capas subintimal y subsinovial es un índice de inflamación crónica subaguda. Se encontró una reducción estadísticamente significativa en este parámetro ( $p = 0,0001$ ) tras el

Tabla VII

**CAMBIOS MICROARTROSCÓPICOS EN LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA MEMBRANA SINOVIAL AL INICIO Y EN EL MES 6. VALOR MEDIO ± DE (RANGO).**

	<b>Inicio</b>	<b>Mes 6</b>	<b>%</b>	<b>Reducción</b>
<b>Características macroscópicas</b>	32,88 ± 6,19 (20-45)	27,62 ± 6,60 (15-45)	-16%	p = 0,0001
<b>Características vasculares</b>	13,00 ± 2,95 (5-20)	10,13 ± 3,30 (5-15)	-22%	p = 0,0001
<b>Características celulares</b>	16,37 ± 4,80	10,75 ± 6,05	-34%	p = 0,0001
<b>Puntuación total</b>	62,25 ± 9,74 (45-85)	48,50 ± 13,41 (30-80)	-22%	p = 0,0001

tratamiento (número medio de capas por campo ± DE = 20,22 ± 8,03) comparado con el inicio (26,50 ± 7,53). Además, la extensión de la fibrosis aumentó después del tratamiento, indicando una reparación estructural continua, y la diferencia entre el inicio (19 pacientes con una puntuación de 1; 14 con una puntuación de 2 y 6 con una puntuación de 3) y el control final (4 pacientes con una puntuación de 1; 9 con una puntuación de 2; 18 con una puntuación de 3; 8 con una puntuación de 4, y 1 con una puntuación de 5) fue altamente significativa (p = 0,0001).

También hubo un alto grado de correlación entre las características macroscópicas de la membrana sinovial evaluada por artroscopia, y el grosor de la capa sinovial evaluada histológicamente ( $r_{\text{inicio}} = 0,97$ ,  $r_{\text{control final}} = 0,96$ ), así como entre las características cualitativas y cuantitativas de las células observadas microartroscópicamente (donde la presencia de tipos de células redondas-ovaladas correspondiente a una imagen endoscópica clara de sinovitis fue detectable), y la entidad de la infiltración mononuclear ( $r_{\text{inicio}} = 0,96$ ,  $r_{\text{control final}} = 0,88$ ).

### Evaluación clínica

- **Dolor al descansar.** Al inicio todos los pacientes presentaron dolor al descansar [EAV (media ± DE) 50,80 ± 27,05 mm]. El día 35, una semana después de finalizar el tratamiento, se observó una reducción significativa en comparación con el inicio (27,92 ± 15,91 mm; p = 0,0001). Además, se observó una mejora continua y significativa durante el seguimiento posterior, los días 90 y 180 (25,87 ± 21,33 mm y 21,57 ± 20,53 mm

respectivamente; p = 0,0001). Esta mejora persistió en los 18 pacientes que se sometieron al control del día 360 (13,67 ± 13,11 mm).

- **Dolor al realizar ejercicio.** Todos los pacientes presentaron dolor al realizar ejercicio al inicio pero hacia el día 35 (una semana después de finalizar el tratamiento) el valor medio de este parámetro bajó significativamente (EAV desde 63,20 ± 23,39 mm a 34,67 ± 17 mm; p = 0,0001). Se registraron otras reducciones significativas los días 90 y 180 (32,60 ± 22,19 mm y 28,75 ± 21,61 mm, respectivamente; p = 0,0001). En los 18 pacientes que realizaron otra visita de control el día 360 la intensidad del dolor fue notablemente más baja (18,67 ± 15,07 mm).

- **Función articular.** Los movimientos activos y pasivos, la flexión y la extensión mostraron mejoras estadísticamente significativas después del tratamiento en comparación con los valores iniciales (valor medio ± DE para el movimiento activo: desde 103,75 ± 19,31 grados al inicio a 110,50 ± 15,60 grados el día 35 y 115,20 ± 16,80 grados el día 90; movimientos pasivos: desde 110,62 ± 20,42 grados al inicio a 117,55 ± 15,57 grados el día 35 y 122,25 ± 16,60 grados el día 90; flexión máxima desde 73,50 ± 19,45 grados al inicio a 67,82 ± 14,30 el día 35 y 63,42 ± 14,55 el día 90; extensión máxima: desde 178,62 ± 3,39 al inicio a 179,37 ± 2,32 el día 35 y el día 90).

- **Derrame.** El derrame articular estaba presente en 17 pacientes al inicio del estudio. Este número disminuyó progresivamente hasta que, el día 35, el derrame estuvo presente sólo en un paciente.

- **Seguridad.** No se observaron efectos adversos en ninguno de los 40 pacientes tratados. No

se observaron cambios significativos en los parámetros del laboratorio.

## DISCUSIÓN

Los beneficios clínicos observados en este estudio, a pesar de las limitaciones y sesgos asociados con un estudio abierto, están en consonancia con estudios anteriores sobre la eficacia y seguridad del ácido hialurónico intrarticular (Hyalgan®) en el tratamiento de los síntomas de la artrosis de rodilla<sup>(23-28)</sup>. Se observó una reducción de los síntomas dolorosos y una mejor función articular. Además, hubo una reducción progresiva de los derrames articulares en la mayoría de los casos en los que éstos eran frecuentes. La mejoría clínica fue gradual, pero se mantuvo durante el período de seguimiento de 6 meses.

El efecto sostenido de esta preparación de AH sobre los síntomas en nuestros pacientes no puede explicarse simplemente por una restauración temporal de la viscoelasticidad del líquido sinovial, dado que, como se ha demostrado en modelos con ovejas, el AH intrarticular tiene una media vida metabólica de 20 horas, aproximadamente, en las articulaciones de la rodilla sanas, y de cerca de 12 horas en las inflamadas<sup>(11)</sup>. Los cambios observados pueden deberse a los efectos del AH sobre los componentes celulares y del tejido de la articulación.

El aspecto más original de este ensayo clínico es su enfoque morfológico, que integra técnicas *in vivo* y *ex vivo* con la evaluación a ciegas de los cambios en los tejidos articulares. La microartroscopia permitió, incluso, la detección de los menores cambios en las lesiones y la precisa técnica de muestras biópsicas hizo posible la localización de las mismas zonas para la segunda biopsia. La estrecha correspondencia entre los datos obtenidos con estas dos técnicas, tal como se demuestra por el alto grado de correlación entre los parámetros de evaluación artroscópica e histológica, confirma la consistencia de estos resultados.

La evaluación artroscópica del daño articular mostró que hubo una progresión más lenta de las lesiones del cartílago en los pacientes con daño menos severo del cartílago (grado II) comparado con los casos más severos (grado III). Sin embargo, la menor proporción de éxito obtenida en los pacientes con grado III puede entenderse como una indicación de que estos pacientes podrían necesitar un mayor número

de inyecciones intrarticulares de Hyalgan® durante el mismo período de tiempo.

La posibilidad de realizar diversos exámenes histológicos del tejido cartilaginoso en la misma zona en nuestros pacientes nos permitió realizar un análisis detallado del tejido en el tiempo. El hallazgo principal obtenido por la aplicación de la escala de Mankin fue la mayor afinidad del tejido por la tinción de proteoglicanos. Ello representa un índice del proceso reparador en el cartílago y de la recuperación de la actividad anabólica por los condrocitos supervivientes. A nivel submicroscópico se observó que la activación de estos condrocitos también conllevó una extensión aumentada de las estructuras sintéticas del complejo citocavitario, mayores cantidades de mitocondria y una reducción del número de vacuolas lisosomales.

Tras el tratamiento con Hyalgan®, hubo una mejora del estatus inflamatorio de la membrana sinovial en cuanto a la infiltración de células inflamatorias y la hiperplasia de los sinoviocitos. Comparando los resultados obtenidos en este estudio con los observados en nuestros estudios previos sobre las transformaciones que tienen lugar con la edad<sup>(36)</sup>, podemos concluir que Hyalgan® reduce el grado artroscópico en cuanto al daño sinovítico, aunque no lo reduce hasta llegar a valores normales. Sin embargo, debería recordarse que el proceso envejecedor fisiológico en sí se asocia a un aumento en el valor artroscópico. Considerando que la media de los pacientes en el presente estudio se situaba justo debajo de los 50 años, el valor artroscópico medio total de la última evaluación fue muy positivo, especialmente si se considera el hecho de que un valor final de 20-25 puntos es el que se obtiene en sujetos normales de la misma edad<sup>(36)</sup>.

Una limitación objetiva de este estudio fue la falta de un grupo controlado con placebo. Por tanto, no podemos sacar conclusiones definitivas en lo que respecta a los efectos estructurales sobre los tejidos de la articulación que se atribuyen a la administración de Hyalgan®. No obstante, cabe señalar que todas las observaciones artroscópicas e histológicas se realizaron a ciegas utilizando, siempre que era posible, los parámetros y escalas de mayor aceptación en la literatura. Los resultados obtenidos sugieren que las inyecciones intrarticulares de Hyalgan® podrían poseer diversos efectos beneficiosos y conllevar un control de la inflamación sinovial y una reducción de la progresión del

daño cartilaginoso. Por tanto, Hyalgan® podría ser un tratamiento eficaz para la artrosis de rodilla y un candidato potencial como verdadero modificador de la estructura.

Otro ensayo clínico recientemente publicado corrobora nuestra tesis de que Hyalgan® podría retrasar la progresión estructural de la enfermedad. Dicho estudio, realizado en pacientes con artrosis de rodilla que recibieron 3

ciclos de inyecciones de Hyalgan® cada tres meses durante un año, mostró un grado de deterioro del cartilago significativamente menor (evaluado por artroscopia) en comparación con un grupo control<sup>(39)</sup>. Sin embargo, serán necesarios nuevos estudios, en especial controlados con placebo, para confirmar los prometedores resultados observados en los tejidos articulares.

## BIBLIOGRAFÍA

- Dieppe, P.: Osteoarthritis: Risk factors, process and outcome. *Rheumatology Europe*, 1995; 24: 66-68.
- Gardner, D.L.: The nature and causes of osteoarthritis. *Br Med J*, 1983; 286: 418-424.
- Glynn, L.E.: Primary lesion in osteoarthritis. *Lancet*, 1977; 1: 574-575.
- Walker, E.R., Boyd, R.D.; Wu, D.D.; Lukoscheck, M.; Burr, D.B.; Radin, E.L.: Morphologic and morphometric changes in synovial membrane associated with mechanically induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1991; 34: 515-524.
- Lequesne, M.; Brandt, K.; Bellamy, N.; Moskowitz, R.; Menkes, C.J.; Pelletier, J.P.: Guidelines for testing slow-acting drugs in osteoarthritis. *J Rheumatol*, 1994; 21 (Suppl. 41): 65-71.
- GREES (Group for the Respect of Ethics and Excellence in Science - Osteoarthritis Section): Recommendations for the registration of drugs used in the treatment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 1996; 55: 552-557.
- Laurent, T.C.; Fraser, R.: Hyaluronan. *Faseb J*, 1992; 6: 2397-2404.
- Balazas, E.A.; Denlinger, J.L.: Viscosupplementation: a new concept in the treatment of OA. *J Rheumatol*, 1993; 20 (Suppl. 39): 3-9.
- Spelling, P.F.; Heise, N.; Toledo, O.M.S.: Glycosaminoglycans in the synovial fluids of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 1991; 9: 195-199.
- Dahl, L.B.; Dahl, I.M.S.; Engström-Laurent, A.; Granath, K.: Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropaties. *Ann Rheum Dis*, 1985; 44: 817-822.
- Abatangelo, G.; O'Reagan, M.: Hyaluronan: Biological role and function in articular joints. *Eur J Rheumatol Inflamm*, 1995; 15: 9-16.
- Hardingham, T.E.; Muir, E.: The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim Biophys Acta*, 1972; 279: 401-405.
- Toole, B.P.; Jackson, G.; Gross, J.: Hyaluronate in morphogenesis: Inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci*, 1972; 69:1384-1386.
- Smith, M.M.; Ghosh, P.: The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatol Int*, 1987; 7: 113-122.
- Punzi, L.; Shciavon, F.; Cavasin, F.; Ramonda, R.; Gambari, P.F.; Todesco, S.: Influence of intraarticular hyaluronic acid on PGE2 and cAMP of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol*, 1989; 7: 247-250.
- Ialenti, A.; Di Rosa, M.: Hyaluronic acid modulates acute and chronic inflammation. *Agents Actions*, 1994; 43: 44-47.
- Corrado, E.M.; Peluso, G.; Gigliotti, S.; et al.: The effects of intra-articular administration of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee: A clinical study with immunological and biochemical evaluations. *Eur J Rheumatol Inflamm*, 1995; 15: 47-56.
- Peluso, G.F.; Perbellini, A.; Tajana, G.F.: The effect of high and low molecular weight hyaluronic acid in mytogen-induced lymphocyte proliferation. *Curr Ther Res*, 1990; 47: 437-443.
- Ghosh, P.: The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: Interactions with cells, cartilage and components of the synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol*, 1994; 12: 75-82.
- Sato, H.; Takahashi, T.; Ide, H.; et al.: Anti-oxidant activity of synovial fluid, hyaluronic acid, and two subcomponents of hyaluronic acid. *Arthritis Rheum*, 1988; 31: 63-71.
- Cortivo, R.; Govoni, E.; De Galateo, A.; Brun, P.; Abatangelo, G.: Hyaluronate reverses inhibition of proteoglycan synthesis by oxygen free-radicals in cultured embryonic cartilage. *Eur J Cell Biol*, 1989; 49 (Suppl. 28): 18.
- Presti, D.; Scott, J.E.: Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass. *Cell Biochem Function*, 1994; 12: 281-288.
- Dixon, S.T.J.; Jacobi, R.K.; Berry, H.; Hamilton, E.B.D.: Clinical trial of intra-articular injection of hyaluronic acid in patients with osteoarthritis of the knee. *Curr Med Res Op*, 1988; 11: 135-143.

24. Leardini, G.; Mattara, L.; Franceschini, M.; Perbellini, A.: Intra-articular treatment of knee osteoarthritis: A comparative study between hyaluronic acid and 6-methyl prednisolone acetate. *Clin Exp Rheumatol*, 1991; 9: 375-381.
25. Pietrogrande, V.; Melanote, L.; D'Agnolo, B.; et al.: Hyaluronic acid versus methylprednisolone intra-articularly injected for treatment of osteoarthritis of the knee. *Curr Ther Res*, 1991; 50: 691-701.
26. Dougados, M.; Nguyen, M.; Listrat, V.; Amor, B.: High molecular weight sodium hyaluronate (Hyalectin<sup>®</sup>) in osteoarthritis of the knee: A 1-year placebo-controlled trial. *Osteoarthr Cartil*, 1993; 1: 97-103.
27. Carabba, M.; Paresce, E.; Angelini, M.; Re K.A.; Torchiana, E.E.M.; Perbellini, A.: The safety and efficacy of different dose schedules of hyaluronic acid in the treatment of painful osteoarthritis of the knee with joint effusion: *Eur J Rheumatol Inflamm*, 1995; 15: 25-31.
28. Maheu, E.: Hyaluronan in knee osteoarthritis: A review of clinical trials with Hyalgan. *Eur J Rheumatol Inflamm*, 1995; 15: 17-24.
29. Abatangelo, G.; Botti, P.; Del Bue, M.; et al.: Intra-articular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. Biochemical results. *Clin Orthop Rel Res*, 1989; 241: 278-285.
30. Schiavonato, A.; Lini, E.; Guidolin, D.; et al.: Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. *Clin Orthop Rel Res*, 1989; 241: 286-299.
31. Benazzo, F.; Cetta, G.; Finardi, E.; Perbellini, A.; Govoni, E.; Ceciliani, L.: Artrosi sperimentale da vitamina A nel coniglio e possibilità terapeutiche con acido ialuronico. *It J Orthop Traum*, 1993; 19: 393-420.
32. Frizziero, L.: Artrocentesi e artroscopia. In CARCASSI U (Ed.): *Trattato di Reumatologia*. Società Editrice Universo, Roma 1993; 1: 561-584.
33. Frizziero, L.; Georgountzos, A.; Zizzi, F.; Focherini, M.C.: Microarthroscopic study of the morphologic features of normal and pathological synovial membrane. *Arthroscopy*, 1992; 8: 504-509.
34. Pasquali Ronchetti, I.; Frizziero, L.; Guerra, D.; et al.: Aging of the human synovium: An in vivo and ex vivo morphological study. *Semin Arthritis Rheum*, 1992; 21: 400-414.
35. Kiviranta, I.; Jurvelin, J.; Tammi, M.; Säämänen, M.; Helminen, H.J.: Microspectro-photometric quantification of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry*, 1985; 82: 249-255.
36. Outerbridge, R.E.: The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg*, 1961; 43B: 752-757.
37. Noyes, F.R.; Stabler, C.L.: A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sport Med*, 1989; 17: 505-513.
38. Mankin, H.J.; Forman, H.; Lippiello, L.; Zarins, A.: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. *J Bone Joint Surg*, 1971; 53A: 523-537.
39. Listrat, V.; Ayrat, X.; Patarnello, F.; et al.: Arthroscopic evaluation of potential structure modifying activity of hyaluronan (Hyalgan) in osteoarthritis of the knee. *Osteoarthr Cartil*, 1997; 5: 153-160.