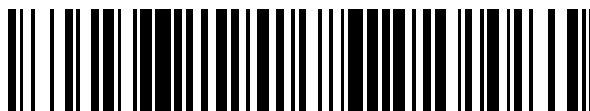


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 115**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
A61K 31/726 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2013** **PCT/EP2013/060501**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013** **WO13174863**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2013** **E 13728330 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 2852392**

54 Título: **Usos de la condroitina no sulfatada**

30 Prioridad:

23.05.2012 IT MI20120896

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2019

73 Titular/es:

ALTERGON S.A. (100.0%)
Via Dogana Vecchia 2
6900 Lugano, CH

72 Inventor/es:

DE ROSA, MARIO y
SCHIRALDI, CHIARA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 729 115 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Usos de la condroitina no sulfatada.

La presente invención se refiere al uso de composiciones farmacéuticas, nutracéuticas y cosmeceúticas o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada como ingrediente activo.

5 Técnica anterior

La condroitina, el precursor metabólico del sulfato de condroitina, es un polisacárido lineal natural formado por residuos alternos de N-acetil-D-galactosamina β 1: 4 y D-glucuronato β 1: 3. En los vertebrados, la condroitina es sulfatada regioselectivamente en los 4 o 6 hidroxilos de N-acetil-D-galactosamina, y en algunos casos los 2 o 3 hidroxilos de ácido glucurónico (Sugahara et al., J. Biol. Chem., 1996, 271:26745-54). El peso molecular de la condroitina y la extensión y los sitios de sulfatación dependen de la especie, la edad y el tipo de tejido (Kuettner et al., Eds., in Articular cartilage and osteoarthritis, NY, Raven Press, 1992; Volpi Ed., in Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity, S. Diego, California Academic Press - Elsevier Inc, 2006).

El sulfato de condroitina, que representa la parte polisacárida de diversas familias de proteoglicanos (GAG), está unido a un residuo de serina de la proteína del núcleo a través del tetrasacárido GlcA-Gal-Gal-Xyl. En cuanto a la mayoría de las proteínas de membrana, la biosíntesis de la proteína del núcleo de los GAG comienza en el citosol, y el polipéptido luego se traslada al retículo endoplásmico. La síntesis de tetrasacáridos comienza en el lumen del retículo endoplásmico y se completa en el golgi, donde comienza la polimerización/sulfatación del sulfato de condroitina. La polimerización tiene lugar debido a la acción concertada y altamente organizada de un sistema multienzimático asociado con la membrana, en el que GalNAc transferasa y GlcA transferasa añaden los dos azúcares alternativamente en la extremidad no reductora del proteoglicano naciente, lo que lleva a la formación de cadenas de condroitina de aproximadamente 70 kDa. La sulfatación del polímero tiene lugar en el golgi; en particular, la sulfatación en la posición 6 tiene lugar en la región medial/trans del golgi, mientras que la sulfatación en la posición 4 tiene lugar en la región trans. Los estudios con preparaciones microsomales (Sugumaran and Silbert, J. Biol. Chem. 1990, Oct 25, 265(30): 18284-8) han demostrado que el procedimiento de sulfatación comienza solo 30 segundos después del inicio del procedimiento de polimerización de condroitina; en el procedimiento de sulfatación, el sustrato donante del grupo sulfato es PAPS (3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato), cuya formación es catalizada por la ATP sulfurilasa y la APS quinasa.

La reacción de activación de los azúcares y el sulfato tiene lugar en el citosol; las formas activadas se transportan luego al retículo endoplásmico y al golgi, donde se usan para la síntesis de sulfato de condroitina.

Los GAG en la matriz extracelular adquieren conformaciones muy extensas, formando geles porosos a los que se atraen los cationes y el agua. De esta manera, los GAG hidratan y expanden los tejidos, lo que hace que la matriz sea apropiada para soportar incluso las fuertes fuerzas compresivas.

El sulfato de condroitina no solo está presente en los vertebrados, sino también en los peces cebras, nematodos e insectos. Algunas bacterias también producen polímeros relacionados con la condroitina como componentes de sus cápsulas. A diferencia de los vertebrados, estos polisacáridos no están presentes como proteoglicanos y no están sulfatados, pero están asociados con los componentes lipídicos de la superficie bacteriana o se liberan en el medio de cultivo (Whitfield, Ann. Rev. Biochem. 2006, 75:39-68; De Angelis, Glycobiol, 12:9R-16R).

El sulfato de condroitina, obtenido por extracción de diversas fuentes animales, tales como el cartílago de cerdo, la aleta de tiburón y el cartílago teleósteo, se usa como nutracéutico y como un medicamento condroprotector y antiartrémico en el tratamiento de la osteoartritis tibiofibular de la rodilla y en osteoartritis del cartílago articular (Kuettner KE et al., Eds., in Articular cartilage and osteoarthritis, NY, Raven Press, 1992; Simànek V et al., 2005, 149:51-56; Goerres GW et al., J. Clinical Densitometry 2005, 8:484-487; Altman RD et al., OsteoArthritis and Cartilage 2005, 13:13-19; Chan PS, et al., OsteoArthritis and Cartilage 2005, 13:387-394; Chou MM, et al., Exp. Biol. Med. 2005, 230:255-262; Clegg DO, et al., New England J. of Medicine, 2006, 23:795-808; Roman-Bias et al., OsteoArthritis and Cartilage, 2006, 14:839-848; Maheu E et al., OsteoArthritis and Cartilage, 2006, 14:303-322; Fotini N et al., Biomed. Chromatogr. 2006, 20:539-550; Lagnaoui R et al., Thérapie 2006, 61: 341-346; Volpi N Ed. in Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity, S. Diego, California Academic Press - Elsevier Inc, 2006; Zhang W et al., Ann. Rheum. Dis. 2007, 66:377-38. Otros campos terapéuticos en los que se usa el sulfato de condroitina son la cistitis intersticial (Nickel et al., BJU Int. 2009, 103:56-60; Cervigni et al., Int Urogynecol. J. Pelvic Floor Dysfunction. 2008, 19:943-947) y synovitis (Hochberg and Clegg, Osteoarthritis and Cartilage 2008, 16 suppl. 3:S22-S24; Moller, Osteoarthritis y Cartilage 2009, 17 suppl. 1:S32-S33).

Sin embargo, la condroitina, un intermediario metabólico, no se puede aislar en cantidades significativas de fuentes animales. Los procedimientos para la producción de condroitina a partir de microorganismos o por síntesis enzimática fueron diseñados recientemente.

La producción de condroitina por una cepa diseñada por ingeniería genética de *E. coli* K4, descrita en el documento WO 2010136435, es particularmente interesante; dicha cepa produce el polisacárido K4, una condroitina que

presenta residuos de β -fructofuranosa en C3 del ácido glucurónico. Estos residuos se pueden eliminar fácilmente mediante hidrólisis ácida controlada, debido a la baja estabilidad del enlace glucósido con el que se une la fructosa a la cadena de condroitina. La ingeniería de la cepa se diseñó para mejorar la procesividad de todo el complejo enzimático responsable de la síntesis del polisacárido K4 mediante la inserción de varias copias del gen autólogo Rah, que actúa como regulador positivo de la transcripción del grupo de genes responsables de la síntesis de material capsular. Usando este microorganismo y una estrategia integrada basada en la optimización de un procedimiento de fermentación de tres fases (lote alimentado por lotes, en régimen de microfiltración), se obtienen rendimientos de condroitina > 8 g/L. Los altos rendimientos de producción, la simplicidad del procedimiento de purificación aguas abajo, los bajos costos generales del procedimiento y el bajo impacto ambiental hacen que el procedimiento descrito en el documento WO 2010136435 sea superior a todas las estrategias de fermentación descritas anteriormente (Rodríguez et al., Eur. J. Biochem., 1988, 177:117-124; Manzoni et al., Biotechnology Letters, 1996, 18:383-386; WO 01/02597 A1; US 6,288,044; US 6,777,398; US 2005266460; WO 0180810; EP 1282684; EP 1832662; US 20030104601; US 20050164984; US 20070015249; US 20030109693; EP 1950308; WO 2007145197; WO 2007069693; WO 2007058252; WO 2007023867; US 7,273,729; JP 2004024208; US 20060052335; US 20060057697; US 7,232,676; US 20070059805); Más recientemente, el documento US 2011244520A1 describió una serie de microorganismos diseñados que producen condroitina en concentraciones comparables a las del documento WO 2010136435.

En lo que respecta a la síntesis enzimática de condroitina, los documentos US 2005266460, WO 0180810, EP 1282684, EP 1832662, US 20030104601 y US 20050164984 describen el uso de condroitina sintetasa a partir de *Pasteurella multocida*, una enzima que cataliza la síntesis de condroitina a partir de los azúcares UDP correspondientes. En particular, estos documentos describen la secuencia del segmento de nucleótido que codifica la enzima, la construcción y el uso de recombinantes (en sistemas de expresión procariotas y eucariotas) que los expresan, y la producción de condroitina modificada de diversas dimensiones con dichos recombinantes. Todos estos documentos carecen de evidencia experimental de los procedimientos de producción reivindicados; en particular, nunca se reportan datos detallados sobre los métodos de fermentación usados para producir las enzimas y los rendimientos de condroitina. Los documentos US 20070015249 y US 20030109693 describen la producción de una condroitina sintetasa de *E. coli* K4 y su uso para la producción de condroitina *in vitro*. La producción de la enzima, codificada por el gen kfoC de la región II del grupo K4 de *E. coli* responsable de la biosíntesis del antígeno capsular, se caracteriza por las siguientes etapas: amplificación de kfoC, clonación del gen en el vector pTrcHis, y su expresión en la cepa comercial de *E. coli* TOP. Los dos documentos también reivindican proteínas naturales o artificiales con mutaciones, que pueden inducir ligeras modificaciones estructurales en la condroitina sintetasa sin alterar su función catalítica. Estos documentos también carecen de datos sobre los rendimientos de los procedimientos de producción, con respecto a la producción de condroitina sintetasa y la producción enzimática de condroitina *in vitro* a partir de los correspondientes azúcares UDP.

Los documentos EP 1950308, WO 2007145197, WO 2007069693, WO 2007058252, WO 2007058252 y WO 2007023867 describen métodos *in vitro* de síntesis de condroitina y derivados que usan condroitina sintetasa de *E. coli* K4 y sus mutantes, que solo tienen una de las dos actividades de la transferasa.

Los documentos US 7,273,729, JP 2004024208, US 20060052335, US 20060057697 y US 7,232,676 describen el uso de la condroitina sintetasa humana, una enzima que cataliza la síntesis de condroitina a partir de los azúcares UDP correspondientes. Los documentos reivindican la estructura de la condroitina sintetasa humana, un vector de expresión que comprende la secuencia de la enzima, la expresión de dicho vector en células eucariotas y un método para sintetizar la cadena de polisacáridos de la condroitina.

El documento US 20070059805 reivindica la estructura de la condroitina sintetasa humana, un vector de expresión que comprende la secuencia de la enzima, la expresión de dicho vector en células eucariotas y un método para sintetizar la cadena de polisacárido de la condroitina.

Todos los documentos citados anteriormente consideran que la condroitina es un intermediario para la síntesis de sulfato de condroitina, sin indicar sus propiedades biológicas intrínsecas. Algunos de ellos mencionan la posibilidad de usar condroitina en composiciones no especificadas, pero solo genéricamente, como en el caso de los documentos US 20110244520 (reivindicación 63) y WO 0180810 (reivindicación 73); este último documento afirma en las páginas 4-5 que los polímeros de condroitina son "más inertes, en términos generales, que la molécula de HA análoga". Kujawa M J et al., (Developmental Biology 1985, 114, 504-518 y 519-528) describen que el ácido hialurónico y, aunque de manera menos eficiente, la condroitina, estimulan la condrogénesis *in vitro* de células mesenquimatosas de la etapa 24 del polluelo en cultivo (4,5 días después de la fertilización). Este efecto solo se observa cuando dichos polisacáridos se unen covalentemente a las superficies sobre las cuales se cultivan las células, mientras que no se observan efectos cuando tales moléculas están en solución. No se pueden conectar aplicaciones terapéuticas con tales observaciones, que se relacionan con el procedimiento de ambiogénesis en condiciones rigurosas en un modelo experimental que no puede ser aplicable en general.

El documento WO 2012/032151 también describe complejos cooperativos híbridos entre ácido hialurónico y condroitina. Este último solo se propone como un excipiente reológico para reducir la viscosidad, y no se describe ningún efecto farmacológico.

Definiciones

El término condroitina se usa a menudo de manera inadecuada para indicar sulfato de condroitina; por el bien de la claridad, por lo tanto, los dos términos "condroitina" y "sulfato de condroitina" se usarán por separado a continuación. El término "condroitina" significa el polisacárido no sulfatado, indicado por la letra C, mientras que el término "sulfato de condroitina" significa el polisacárido sulfatado de manera diferente, indicado por las letras CS.

Descripción de la invención.

Aunque el uso de sulfato de condroitina en el campo médico está ampliamente documentado, todavía no hay datos disponibles para las aplicaciones de la condroitina. Ahora se ha descubierto que la condroitina posee una serie de importantes actividades biológicas que la hacen útil para diversas aplicaciones no solo en el campo terapéutico, sino también en medicina estética, nutracéuticos y cosmeceúticos.

Los modelos experimentales y los ensayos clínicos han demostrado que la condroitina interactúa con los sistemas biológicos de una manera multifactorial, dando lugar a respuestas biológicas en las células, tejidos y todo el cuerpo que son nuevos o mayores que los del sulfato de condroitina.

Aunque la condroitina es un intermediario metabólico para la biosíntesis del sulfato de condroitina, dicha molécula no está presente como tal en los tejidos, porque ya está anclada en la etapa de biosíntesis a un residuo de serina de la proteína central a través del tetrasacárido GlcA-Gal-Gal-Xyl, en la que crece la cadena formada por la repetición de las unidades de disacárido de N-acetil-D-galactosamina β 1: 4 y D-glucuronato β 1: 3. El procedimiento de elongación de la cadena, y su posterior sulfatación, tienen lugar casi simultáneamente.

La presencia de condroitina libre en el cuerpo después de la administración exógena, por lo tanto, representa una nueva condición metabólica, responsable de una serie de respuestas biológicas multifactoriales.

Se ha encontrado que la condroitina estimula el crecimiento celular, en particular el crecimiento de los condrocitos, promoviendo el mantenimiento del tipo celular, posee actividad antiinflamatoria y antibacteriana, y estimula la reparación de heridas. La condroitina también puede reemplazar ventajosamente al sulfato de condroitina u otros glicosaminoglicanos en las aplicaciones típicas de este último, por ejemplo, en la viscosuplementación, la reparación del cartilago, en el campo oftálmico, en el tratamiento de enfermedades articulares y en tratamientos de biorrevitalización de la piel usando microinyecciones intradérmicas.

La presente invención se refiere a composiciones que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, para uso en la viscosuplementación articular y la reparación del tejido cartilaginoso en un paciente y para uso en el tratamiento de la enfermedad del ojo seco.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso no terapéutico de composiciones o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, en la biorrevitalización cutánea por medio de microinyecciones intradérmicas. El uso no terapéutico de composiciones o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, en el tratamiento de la senescencia cutánea es un objeto adicional de la presente invención.

También se ha encontrado que la condroitina aumenta la actividad de los constituyentes activos antitumorales y es útil en el tratamiento de diversos trastornos tales como osteoartritis, cistitis intersticial y trastornos del sistema respiratorio. Las composiciones de la invención que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, son útiles para la reparación de heridas, para el tratamiento de patologías articulares, oculares, oncológicas, patologías del aparato respiratorio, osteoartritis, cistitis intersticial.

Adicionalmente, la invención se refiere al uso de composiciones o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, en la aplicación de lentes de contacto.

La condroitina también es útil en soluciones de diálisis peritoneal y como un componente estructural de los andamios de crecimiento de tejido. La presente invención se refiere al uso no terapéutico de composiciones que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, como agente osmótico y protector en soluciones para diálisis intraperitoneal. Además, se refiere al uso *in vitro* de composiciones o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, como andamiaje para el crecimiento de cultivos de células en 3D.

La invención se refiere por lo tanto al uso de composiciones farmacéuticas, nutracéuticas y cosmeceúticas o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada como ingrediente activo de acuerdo con las reivindicaciones.

La condroitina se puede combinar opcionalmente con otros ingredientes activos, tales como ácido hialurónico, antiinflamatorios, fármacos antitumorales, mucolíticos y antibacterianos.

Las vías de administración y las dosis dependerán del tipo de afección que se va a tratar, y pueden ser establecidas por expertos sobre la base de estudios preclínicos y clínicos, usando metodologías conocidas. En términos

generales, las dosis no serán sustancialmente similares a las usadas actualmente para el sulfato de condroitina cuando se emplean en las mismas aplicaciones. Dichas dosis pueden ser, por ejemplo, entre 0.1 y 200 mg/Kg por vía oral y entre 0.01 y 20 mg/Kg por inyección, mientras que las formulaciones tópicas pueden contener concentraciones de condroitina que varían entre 0.01 y 80% en peso. La condroitina se puede formular en composiciones apropiadas para administración oral, inyectable o tópica. Ejemplos de estas formas de administración incluyen cápsulas, comprimidos, gotas para los ojos, geles, cremas, soluciones o suspensiones, polvos orodispersables, aerosoles y jarabes.

La administración inyectable, oral o tópica de condroitina, incluso en dosis muy altas, no causa reacciones adversas que puedan perjudicar su uso. Las características toxicológicas de la condroitina, informadas en la tabla 1, demuestran su seguridad.

Tabla 1 - Perfil toxicológico de la condroitina; los detalles experimentales se informan en los ejemplos 5-9.

Prueba	Modelo experimental	Valores
Toxicidad		
Aguda	Ratón/rata	LD ₅₀ >2000 mg/Kg p.o. y 160 mg/Kg i.v.
Subaguda 30 días	Rata	Sin toxicidad >200 mg/kg/día p.o. y i.m.
Crónica 26 semanas	Rata	Sin toxicidad >200 mg/kg/día p.o.
Mutagenicidad/genotoxicidad		
Prueba <i>in vitro</i> , Prueba de Ames	5 cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	Hasta 2.0 mg/placa: sin mutación inversa puntual
Prueba <i>in vitro</i> , prueba de aberración cromosómica	Linfocitos humanos	Hasta 5 µg/mL no se observan aumentos significativos en el número de células con aberraciones cromosómicas,
Prueba <i>in vitro</i> , prueba de reparación de ADN	Cepa de <i>Escherichia coli</i> sensible a la acción de sustancias mutagénicas	Incluso a dosis más altas no interactúa y no altera el ADN
Prueba <i>in vivo</i> , prueba de micronúcleo	Ratón	Incluso a dosis de 80 mg/Kg, la condroitina se puede considerar no mutagénica en la prueba de micronúcleo temprana
Estudio de carcinogenicidad	Rata	El examen histopatológico de las pruebas subcrónicas y crónicas realizadas en ratas demuestra la ausencia total de degeneración neoplásica potencial en todos los órganos fundamentales.
Estudios de toxicidad en el sistema reproductor		
Estudio de fertilidad y capacidad reproductora	Rata	La administración oral diaria de condroitina en ratas durante 60 días, incluso a una dosis de 200 mg/Kg, no tiene ningún efecto sobre la fertilidad de las ratas macho. De manera similar, la administración diaria de hasta 200 mg/kg durante 15 días antes del apareamiento y hasta el día 21 de lactancia no tiene efecto en la capacidad reproductora de las hembras.
Estudio de desarrollo embrio-fetal	Rata	La condroitina no presenta actividad teratogénica, incluso a la dosis máxima probada de 100 mg/Kg.
Estudio de desarrollo postnatal	Rata	La condroitina no tiene efectos teratogénicos en ratas después de la administración de una dosis oral de 200 mg/Kg/día desde el día 15 de gestación hasta el final del

		período de lactancia.
Sensibilización		
Sensibilización sistémica y anafilaxia	Cobaya	La condroitina no induce reacciones anafilácticas o de hipersensibilidad en ninguno de los animales tratados
Sensibilización de la piel	Cobaya	No se observa ningún signo de sensibilización de la piel en los animales tratados.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se resume la evidencia experimental que constituye la base de los usos a los que se refiere la invención. Detalles adicionales se informan en los ejemplos.

5 Estimulación del crecimiento celular.

La presencia de condroitina estimula fuertemente el crecimiento de numerosos tipos de células, tales como queratinocitos, fibroblastos y, en particular, condrocitos. Se trata de una fenomenología compleja, claramente demostrada por experimentos *in vitro* que simulan el procedimiento de cicatrización de heridas. Los experimentos de cicatrización de heridas se realizan mediante microscopía óptica de lapso de tiempo, una técnica que permite controlar el comportamiento celular durante largos períodos de tiempo (2-4 días) en términos de adhesión, proliferación y motilidad, en un entorno que reproduce las condiciones óptimas para el crecimiento celular (atmósfera con 5% v/v de CO₂ en aire húmedo y temperatura de 37±0.1 °C). El cultivo se hace confluyente y se realiza un corte (herida) en este la velocidad de reparación se evalúa a lo largo del tiempo calculando la variación en el área de la herida. El análisis cualitativo y cuantitativo muestra que la reparación de la herida en presencia de condroitina toma menos de 20 h, mientras que, en la presencia de sulfato de condroitina, la herida no se cicatriza completamente, incluso después de 70 h; en las mismas condiciones, el control (medio sin polisacárido añadido) se cierra después de 40 h. En cada una de las condiciones experimentales, C presenta la capacidad de reducir el tiempo de cicatrización, que se reduce aproximadamente a la mitad. Este resultado representa un importante indicador de cicatrización de heridas abiertas, reduciendo en consecuencia las complicaciones típicas relacionadas con infecciones, sepsis, etc.

Estimulación del crecimiento de condrocitos y mantenimiento del tipo celular.

El experimento en cultivos primarios de condrocitos humanos, aislado de muestras de cartílago humano sano obtenido durante las operaciones de rinoplastia, demuestra que la presencia de condroitina en el medio de cultivo no solo estimula el crecimiento celular, sino que también tiene una acción específica para mantener el tipo de célula de condrocito. En el caso de los condrocitos se observa un procedimiento de diferenciación celular que, a medida que avanzan las fases de crecimiento, tiene un aspecto morfológicamente similar a los fibroblastos. Este tipo de comportamiento es contrarrestado por la presencia de condroitina en el medio de cultivo. Un estudio del efecto de la condroitina en la proliferación de condrocitos, realizado con microscopía de vídeo de lapso de tiempo, muestra que el crecimiento de las células tratadas con condroitina es mejor que el de las células no tratadas y las células tratadas con sulfato de condroitina.

El análisis de fenotipo que implica pruebas inmunohistoquímicas en condrocitos humanos cultivados en presencia de condroitina o sulfato de condroitina muestra que después de 4 días de tratamiento, los diferentes cultivos (células no tratadas, células tratadas con condroitina y células tratadas con sulfato de condroitina) presentan una fuerte positividad a colágeno tipo II, un marcador específico para el tipo de célula de condrocito, pero esta condición solo se mantiene durante más tiempo (7 y 10 días) en las células tratadas con condroitina.

El análisis de PCR en tiempo real de la expresión génica de los principales marcadores de diferenciación específicos (β -actina, agrecano, colágeno tipo II, colágeno tipo I y sox9) en condrocitos humanos cultivados en presencia de condroitina o sulfato de condroitina muestra que: a) el tratamiento con condroitina provoca una variación en la expresión de los genes de diferenciación y matriz analizados (agrecano, colágeno tipo I, colágeno tipo II y sox9) en los diferentes tiempos de análisis considerados (4, 7 y 10 días); b) si los condrocitos en la segunda fase de crecimiento se tratan con condroitina, presentan niveles altos de expresión de colágeno tipo II, mientras que si se tratan con sulfato de condroitina, presentan niveles altos de expresión de colágeno tipo I, acompañados de una evidencia cambio morfológico en el tipo de fibroblastos; c) las células en la tercera fase de crecimiento presentan una respuesta menor al tratamiento con condroitina o sulfato de condroitina, aunque se observa claramente la persistencia de la expresión del colágeno tipo II en presencia de condroitina, lo que demuestra el mantenimiento del fenotipo condrocito incluso en fases de crecimiento avanzadas.

Estos resultados tienen un considerable interés de aplicación en la ingeniería de tejidos, lo que demuestra que el crecimiento de condrocitos obtenible por trasplante en presencia de condroitina permite que las células se amplifiquen con el tiempo, manteniendo el fenotipo condrocito y, por lo tanto, las características del tejido que se está formando. Este resultado también es importante en términos farmacológicos para el uso de condroitina en todos los trastornos en los que el fenotipo condrocito y su metabolismo óptimo desempeñan un papel estratégico en la cicatrización del trastorno.

Actividad antiinflamatoria

El uso de sulfato de condroitina en el tratamiento de la osteoartritis (OA) se basó durante décadas en la hipótesis de que su contenido disminuye con la edad en pacientes que sufren de OA, y que el producto administrado en consecuencia tiene la función de complementar la capacidad reducida de biosíntesis de los proteoglicanos y del líquido sinovial. Estudios recientes sobre los mecanismos de acción del sulfato de condroitina en el tratamiento de la OA han modificado esta hipótesis del mecanismo de acción, lo que demuestra que el sulfato de condroitina participa activamente en la reducción del estado inflamatorio subyacente a la progresión de la artritis reumatoide y la artritis reumatoide. En particular, se ha demostrado que, como resultado de los traumas articulares repetidos (tejido cartilaginoso, líquido sinovial, hueso subcondral), los mediadores proinflamatorios, que desempeñan un papel crucial en la patogenia del trastorno, se liberan en la matriz extracelular. Incluyen interleucina 1b (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α). En particular, en los condrocitos, la IL-1 β se une a los receptores de membrana y activa las rutas de señalización a través de quinasas tales como ERK-1/2 y p38MAPK, que a su vez activan las vías inflamatorias en la célula. En particular, los estudios *in vitro* han demostrado que el sulfato de condroitina inhibe la fosforilación y activación de ERK-1/2 y p38MAPK, reduciendo en consecuencia la translocación de NF- κ B, que apoya un efecto antiinflamatorio del sulfato de condroitina (Du Souich, P., et al., J. Cellular and Molecular Medicine, 2009, 13:1451-1463). En un estudio más reciente realizado con condrocitos humanos extraídos de cartílago de la rodilla y amplificados en el laboratorio, Calamia et al. (Calamia V et al., Arthritis Res. Ther., 2010, 12(4):R138) estudiaron el efecto de añadir IL-1b, una citoquina proinflamatoria (Fernandes JC, et al., Biorheology, 2002, 39:237-246), y se evaluó la modulación de dos marcadores implicados en la manifestación del estado inflamatorio, la chaperonina GRP78 y la enzima superóxido dismutasa (SOD-2).

Un estudio comparativo entre la condroitina y el sulfato de condroitina ha demostrado que aunque la condroitina es una molécula no presente de forma natural en el cuerpo, es capaz de activarse *in vitro*, en sistemas celulares como condrocitos, señales de acción del mismo tipo que las propuestas para el sulfato de condroitina, pero significativamente más potente. Los resultados experimentales demuestran que: a) la expresión de GRP78 se modula positivamente mediante el tratamiento con condroitina, en un grado significativamente mejor que el sulfato de condroitina; b) el procedimiento de regulación positiva de la SOD-2 inducida por la IL-1 β (un síntoma de fuerte estrés oxidativo) se reduce de manera eficaz mediante el tratamiento previo con condroitina, mientras que el tratamiento previo con sulfato de condroitina es ineficaz.

La condroitina es, por lo tanto, un medicamento útil en el tratamiento de trastornos en los que el componente inflamatorio es el resultado o un factor causal del trastorno, como en el caso de la OA y la artritis reumatoide.

Actividad antibacterial

Recientemente se demostró que en pacientes que sufren de OA, la administración del antibiótico trimoxazol para tratar una infección urinaria concomitante también tiene el efecto de aliviar significativamente los síntomas de la OA. Este hallazgo llevó a la hipótesis de que la acción del sulfato de condroitina en el tratamiento de la OA también puede asociarse, al menos en cierta medida, con una posible actividad antimicrobiana. Esta hipótesis fue confirmada por dos estudios (Rozin AP, Clin. Rheumatol., 2009, Oct 28(10):1221-3; Sprecher H. et al., Clin. Exp. Rheumatol., 2008, 26(3):509-510) que demuestran actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* por productos que contienen sulfato de condroitina.

Un estudio comparativo entre la condroitina y el sulfato de condroitina demostró que aunque la condroitina está presente en la cápsula de algunos microorganismos en diversas formas modificadas (por ejemplo, fructosilada), es capaz de inhibir el crecimiento de enterobacterias patógenas. En particular, se ha demostrado una acción marcada en *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*.

Esta actividad contribuye a la eficacia de la condroitina en diversas indicaciones, tales como: a) cicatrización de heridas, ya que además de promover la reparación de heridas, la presencia de condroitina previene el riesgo de infección de los tejidos expuestos; b) OA, debido a que la flora intestinal/fecal alterada tiene efectos adversos en la progresión del trastorno, como se demuestra en la literatura; por lo tanto, el efecto antibacteriano actúa como un factor adyuvante para evitar que el trastorno empeore; c) cistitis intersticial, porque las áreas en las cuales los líquidos se estancan pueden constituir áreas preferenciales para la infiltración bacteriana y las infecciones.

Estimulación de la reparación de heridas.

Debido a sus múltiples interacciones con los sistemas celulares, la condroitina posee una capacidad considerable para acelerar los procedimientos de reparación de tejidos. La capacidad de las aplicaciones tópicas de condroitina o

sulfato de condroitina para acelerar el procedimiento de cicatrización se evaluó en un modelo experimental ampliamente reconocido, el minicerdo. Las heridas se hicieron quirúrgicamente en la parte posterior del animal, y el tratamiento se realizó goteando lentamente la solución acuosa de los compuestos en la herida dos veces al día, y frotando con un apósito de gasa que luego se usó para cubrir la herida. El estudio continuó durante 6 semanas.

- 5 La evaluación dermatológica de la cicatrización de heridas demostró que la calidad del procedimiento de cicatrización fue mejor en presencia de condroitina que el sulfato de condroitina, debido a que el primero fue más rápido y se caracterizó por una apariencia cualitativamente mejor de los bordes de la herida y del tejido circundante.

En el caso del tratamiento con condroitina, la evaluación histopatológica mostró un menor contenido de tejido de granulación y síntomas inflamatorios mucho más leves que en el tratamiento con sulfato de condroitina.

- 10 La evaluación histológica demostró que, en el caso del tratamiento con condroitina, la organización de las fibras de colágeno era similar a la de un tejido normal, lo que indica un procedimiento avanzado de cicatrización de heridas.

Tratamiento de trastornos articulares.

- 15 La capacidad de regeneración de la condroitina a nivel celular, las propiedades reológicas de dicho polisacárido y su acción específica en el tipo de célula de condrocito forman la base para el uso de este compuesto en el tratamiento de la enfermedad articular. La evaluación del potencial terapéutico de la condroitina en el tratamiento de la enfermedad articular realizada en el perro, un modelo experimental en el que los problemas ortopédicos degenerativos o inflamatorios asociados con la enfermedad articular degenerativa (DJD) son particularmente recurrentes tanto en la edad joven como en el geriátrico, demostraron que la administración oral durante 6 meses de condroitina a una dosis de 15 mg/Kg/día es más eficaz que el sulfato de condroitina y mejora significativamente el cuadro clínico, con una buena regresión de la enfermedad.

Biorrevitalización de la piel.

- 25 La biorrevitalización de la piel por medio de microinyecciones intradérmicas de soluciones de ácido hialurónico es uno de los tratamientos de belleza más comunes. La razón es que la introducción de este polisacárido en la dermis provoca respuestas biológicas complejas, mediadas por múltiples actividades de señalización celular, que conducen a la reactivación del tejido metabólico. Se ha encontrado que las microinyecciones intradérmicas de condroitina tienen efectos biorrevitalizantes superiores a los del ácido hialurónico. Se microinyectaron 2 mL de condroitina a la concentración de 20 o 60 mg/mL a intervalos quincenales durante 6 meses. Otro grupo de sujetos fue tratado de manera similar con 2 mL de 20 mg/mL de ácido hialurónico. Las mediciones instrumentales de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL), la consistencia del tejido y la aspereza de la piel se tomaron al principio y al final del estudio. El médico y el paciente también evaluaron de forma independiente la apariencia general a lo largo del tiempo. Este estudio demuestra que la condroitina, a la misma concentración que el ácido hialurónico (20 mg/mL), tiene un efecto biorrevitalizador más temprano y más prolongado, mientras que a concentraciones más altas (60 mg/mL), el efecto biorrevitalizador de la condroitina es mucho mayor, logrando excelentes resultados a partir del segundo tratamiento.

- 35 Refuerzo a la actividad de los fármacos antitumorales.

- La condroitina refuerza fuertemente la acción apoptótica de la gemcitabina (GEM) y la mitomicina-C (MMC), dos antitumorales que son útiles en el tratamiento intravesical de los tumores vesicales no musculares. En un estudio *in vitro* realizado en líneas celulares de cáncer de vejiga humana HT-1376, se evaluó la capacidad de inhibir el crecimiento y la acción apoptótica/necrótica de diferentes combinaciones de GEM o MCC con condroitina o sulfato de condroitina. Este estudio demuestra que: a) la combinación de antitumoral y condroitina o sulfato de condroitina tiene un fuerte efecto sobre la inhibición del crecimiento de células tumorales; b) las condiciones sinérgicas difieren, dependiendo del antitumoral usado; c) el sinergismo polisacárido-GEM conduce principalmente a las células que sufren apoptosis, mientras que el sinergismo del polisacárido MMC conduce a las células que sufren necrosis; d) los efectos sinérgicos de la condroitina son significativamente mayores que los del sulfato de condroitina; e) las asociaciones sinérgicas de condroitina con GEM o MMC pueden representar un enfoque terapéutico prometedor en el campo de los tumores superficiales de vejiga.

Viscosuplementación y reparación de cartílago.

- Debido a su especificidad de acción en la estimulación de condrocitos y el mantenimiento de su tipo celular a lo largo del tiempo, la condroitina es un agente eficaz de la viscosuplementación y reparación de tejido de cartílago dañado. La validez de este uso terapéutico de condroitina se verificó comparando la eficacia de la combinación de ácido hialurónico y condroitina en el tratamiento de enfermedades articulares relacionadas con daños en el componente cartilaginoso de la articulación con la de un tratamiento convencional basado en ácido hialurónico solo. El estudio, realizado en voluntarios que sufrían un deterioro severo de la articulación de la rodilla con daño en el componente cartilaginoso, síntomas inflamatorios en curso evidentes, hinchazón y dolor, demostró que la presencia de condroitina conduce a un excelente nivel de recuperación de la articulación con la reparación del componente cartilaginoso y una mejora general a lo largo del tiempo en el cuadro patológico de los síntomas de dolor. Sin

embargo, tales buenos resultados no se observan en el tratamiento convencional de viscosuplementación con ácido hialurónico solo.

Tratamiento de la cistitis intersticial.

El uso de ácido hialurónico y sulfato de condroitina en el tratamiento de la cistitis intersticial es conocido (D. Porru et al., Urol. Int. 1997, 59:26-29; Curtis et al., BUJI, 2008, 103:56-60; M. Cervigni, Int. Urogynecol., 2008, 19:943-947; D. Porru et al., Reviews on Recent Clinical Trials, 2008, 3:00-00; DE 102006060953). En vista de las analogías estructurales con estos polisacáridos y las acciones estimulantes celulares y tisulares de la condroitina, se realizó un estudio comparativo de la eficacia de las combinaciones de ácido hialurónico y condroitina o sulfato de condroitina en el tratamiento de la cistitis intersticial.

Los voluntarios, con un diagnóstico confirmado de cistitis intersticial, fueron tratados con instilaciones en la vejiga cateterizada de una solución de ácido hialurónico y condroitina o ácido hialurónico y sulfato de condroitina. El tratamiento se repitió una vez a la semana durante 6 semanas, y luego una vez al mes durante 5 meses más. Al inicio del tratamiento y al final del estudio, se realizó una cistoscopia con dilatación de la vejiga para verificar el estado del tejido epitelial y se tomó una biopsia de la pared de la vejiga para establecer el estado inflamatorio. La urodinámica (urgencia, frecuencia y nicturia) y la presencia de escozor y dolor vesical fueron evaluados durante el estudio. La comparación de la cistoscopia realizada antes y después del tratamiento demostró una mejor resolución general de la condición patológica de los pacientes tratados con la combinación de ácido hialurónico/condroitina, un hallazgo que se confirmó mediante la evaluación histológica de las biopsias de la pared de la vejiga, que demostró mejor resolución del procedimiento inflamatorio, y por los datos clínicos, que demostraron una resolución más completa y más rápida de la condición patológica, tanto en términos de urodinámica como de dolor residual.

Uso en formulaciones oftalmológicas.

Debido a su biocompatibilidad, acción de cicatrización de heridas, capacidad de hidratación, acción antimicrobiana moderada, la viscosidad óptima de las soluciones acuosas que la componen y la posibilidad de esterilización por calor sin modificaciones reológicas, la condroitina se puede usar en la fabricación de preparaciones oftálmicas, tales como gotas para los ojos y ungüentos, en combinación con otros ingredientes activos. Las características mejoradas de las gotas para los ojos hechas con condroitina como componente reológico-terapéutico son: a) viscosidad óptima sin adherencia en la preparación; b) distribución uniforme y más homogénea de las gotas para los ojos en todas las partes de la córnea; c) mejor estabilidad de la película lagrimal; d) mejor adherencia a las células corneocconjuntivales; e) una acción reepitelizante, antiinflamatoria y desinfectante sobre la superficie corneal; f) normalización de la tensión superficial; g) mayor tiempo de residencia en la córnea; h) la posibilidad de realizar aplicaciones repetidas durante el día para restaurar las condiciones apropiadas de desgarro.

Un estudio de pacientes con ojo seco, que comparó dos preparaciones oftálmicas, una convencional basada en ácido hialurónico y otra basada en condroitina, ambas a la concentración del 3% p/v en solución salina, con un ciclo terapéutico que implica las aplicaciones 4 veces al día durante 30 días, demostraron que las gotas para los ojos basadas en condroitina presentan los mejores índices de evaluación tanto en la evaluación clínica como en la evaluación subjetiva del paciente tratado.

Uso en diálisis peritoneal.

Sus propiedades fisicoquímicas y la capacidad de regeneración tisular forman la base para un nuevo uso de condroitina en el campo de la diálisis peritoneal. La solución de diálisis consiste principalmente en azúcares (solución de glucosa) a la que se añaden otras sales. Existen tres concentraciones diferentes (1.36%, 2.27% y 3.86%): cuanto mayor sea la concentración, mayor será la cantidad de fluidos eliminados. En el caso de una mayor retención de líquidos, se indicará por lo tanto el uso de soluciones con una alta concentración, mientras que en el caso de deshidratación, las soluciones con una menor concentración serán más apropiadas.

Si el tratamiento no se puede optimizar, el cambio a hemodiálisis se debe evaluar cuidadosamente.

La diálisis peritoneal tiene muchas ventajas sobre la hemodiálisis, ya que implica menos restricciones en la dieta y la actividad, tiene menos efectos adversos en la hemodinámica, la función renal residual se conserva mejor y la rehabilitación es más fácil. Sin embargo, en los últimos años han surgido una serie de inconvenientes en los casos de diálisis peritoneal a largo plazo, asociados con el deterioro de la función peritoneal, con la eliminación insuficiente de agua y desechos metabólicos durante el tratamiento de diálisis. Se cree que este deterioro de la función peritoneal está asociado con las altas concentraciones de glucosa presentes como agente osmótico en los fluidos de diálisis peritoneal, que causan un procedimiento de glicosilación de proteínas y la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). A pesar de la actualidad del problema y las numerosas innovaciones de formulación propuestas, aún no se han desarrollado estrategias que minimicen satisfactoriamente el daño funcional a la membrana peritoneal asociado con la diálisis peritoneal a largo plazo (documentos US 2010286085, WO 9801141, US 5955450, US 55978051, WO 9314796, JP 1151462).

Se ha encontrado que el uso de condroitina en formulaciones de diálisis peritoneal, como agente osmótico con un efecto protector, representa una buena solución para minimizar los problemas descritos anteriormente, debido a la capacidad de este polisacárido para promover la regeneración del mesotelio peritoneal, previniendo procedimientos fibróticos.

5 Tratamiento de trastornos del sistema respiratorio.

La condroitina se puede usar para tratar trastornos de los aparatos orofaríngeos y pulmonares de diferentes etiologías, tales como estomatitis, amigdalitis, laringitis, faringitis, tos y bronquitis debido a sus propiedades reológicas y biológicas, tales como la capacidad de retener agua, promover la hidratación del tejido, su acción formadora de película y su capacidad para adherirse a las membranas mucosas, su capacidad para bioestimular células y tejidos y su acción antiinflamatoria y antibacteriana. Para estos usos, la condroitina se puede formular en combinación con agentes calmantes y mucolíticos en diferentes formas farmacéuticas, tales como jarabes, comprimidos, polvos y aerosoles bucodispersables.

La condroitina como un nutraceutico y cosmeceutico.

En vista de las actividades biológicas informadas anteriormente (especialmente la actividad antiinflamatoria y antibacteriana) y su ausencia completa de toxicidad, la condroitina es útil, posiblemente junto con otros compuestos, en la formulación de nutraceuticos y cosmeceuticos, que son útiles en particular para la biorrevitalización de células y tejidos.

Andamios de crecimiento tisular

La condroitina se puede usar como un elemento estructural para la construcción de andamios para el crecimiento en 3D de sistemas celulares para uso en el campo de la medicina regenerativa.

Los siguientes ejemplos describen la invención con más detalle.

Ejemplo 1 - Activación del crecimiento de queratinocitos

Se usan células HaCat, una línea celular inmortalizada de queratinocitos humanos, como sistema modelo. Las células HaCat se cultivan y amplifican en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS) + 1% de solución Pen-Strep (10,000 unidades de penicilina-G/mL y 10 mg de estreptomicina/mL en solución salina) en una incubadora para cultivos celulares (37 °C, 5% de CO₂ en aire húmedo). Los experimentos de cicatrización de heridas se realizan mediante microscopía óptica de lapso de tiempo, una técnica que permite controlar el comportamiento celular durante largos períodos de tiempo (2-4 días) en términos de adhesión, proliferación y motilidad. El sistema consta de un microscopio óptico invertido (Zeiss Axiovert 200), un baño termostático (LAUDA Ecoline), una microincubadora de CO₂ con geometría tal como para albergar placas de dimensiones variables (de 6 a 96 pocillos) y una unidad de control para la salida de gases (aire y CO₂). El instrumento también está equipado con una cámara de video digital y un motor de control, lo que permite que la incubadora se mueva a lo largo de las direcciones x, y, z para que las imágenes seleccionadas por el operador se puedan grabar y adquirir a intervalos preestablecidos.

El sistema ensamblado de este modo permite que las células se mantengan en un entorno que reproduzca las condiciones óptimas para el crecimiento celular (atmósfera con 5% v/v de CO₂ en aire húmedo y temperatura de 37 ± 0.1 °C), y que se controle durante todo el experimento. El sistema también está equipado con un software que permite un análisis preciso de las imágenes. En particular, la instrumentación está equipada con un software automatizado que permite calcular la reparación de la herida en las pruebas de cicatrización de heridas y proporciona datos sobre la velocidad de reparación y la velocidad de migración celular, que son parámetros importantes para evaluar el efecto de biorrevitalización de sustancias que pueden acelerar o inhibir la reparación de la herida *in vitro*.

El procedimiento estándar para una prueba de cicatrización de heridas es el siguiente: a) se añaden 100 µL de una solución de colágeno en CH₃COOH de 0.1 mg/mL a cada pocillo de una placa de múltiples pocillos de 12 pocillos para aumentar la adhesión del sustrato celular y mejorar la direccionalidad de la migración celular, dejando la placa abierta bajo una campana de flujo laminar hasta que el ácido se haya evaporado completamente; b) se usa DMEM con FBS al 2% como medio de cultivo y se añade condroitina o sulfato de condroitina o ácido hialurónico a los pocillos, este último se usa como sistema de comparación, con concentraciones finales de entre 0.1 y 1% p/v; nada se añade al medio de cultivo en dos de los 12 pocillos, que actúan como controles; c) una porción de la suspensión celular HaCat (1.8 * 10⁵) se coloca en cada pocillo para obtener una confluencia completa después de 2 días de incubación (37 °C, 5% de CO₂ en aire húmedo); d) se realiza un corte (herida) de aproximadamente 1 mm de largo con una punta estéril en la capa confluyente presente en cada pocillo; e) la placa de múltiples pocillos de 12 pocillos se aloja en la etapa de incubadora de la estación de trabajo de microscopía de vídeo de lapso de tiempo; f) el experimento comienza solo cuando las condiciones ambientales son ideales para el mantenimiento de las células *in vitro* y para una buena visualización de las imágenes (37 °C ±0.1, 5% de CO₂ y ausencia de condensado); g) se seleccionan 4-5 campos de vista del corte para cada pocillo, y luego comienza el experimento, que dura 72-96 h en

promedio; h) durante este período, el instrumento controla el cierre de los diversos cortes representados por todos los campos de visión seleccionados con un intervalo de tiempo de 1 h; i) la prueba de cicatrización de heridas es seguida por un análisis cualitativo y cuantitativo de la reparación de la herida por software que mide automáticamente el área del corte a lo largo del tiempo para cada campo seleccionado; 1) los resultados a lo largo del tiempo se informan en forma de imágenes, que permiten la observación cualitativa de la reparación de la herida, y en términos numéricos como el porcentaje de reparación [(área tiempo t ÷ área tiempo cero) * 100].

Los resultados demuestran que la condroitina ya acelera el procedimiento de reparación a una concentración de 0.1 p/v, mientras que el sulfato de condroitina lo ralentiza. Este hallazgo se confirma más claramente al 1% p/v. El análisis cualitativo y cuantitativo de la reparación de la herida muestra que la herida se repara en menos de 20 h en presencia de condroitina, mientras que el control solo se cierra después de 40 h, y en el caso del sulfato de condroitina, la herida no se cicatriza completamente, incluso después de 70 h.

Ejemplo 2 - Prueba de proliferación de condrocitos

Se usaron cultivos primarios de condrocitos humanos aislados de muestras de cartílago humano sanos obtenidas durante las operaciones de rinoplastia como sistema modelo. Los fragmentos de tejido que se acaban de extraer en el quirófano se sumergieron en una solución salina de NaCl al 0.9% p/p y se transfirieron rápidamente al laboratorio para la extracción de condrocitos. Operando en condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar, la muestra de tejido se transfirió a una placa de Petri donde se cortó en trozos pequeños usando pinzas y escalpelos estériles. Los trozos de cartílago se sumergieron luego en solución reguladora de fosfato 0.01 M, pH 7.4 (PBS) que contenía colagenasa tipo 1 (3 mg/mL), dispasa (4 mg/mL) y gentamicina (5 µL/mL de una solución de 80 mg/mL) para asegurar la esterilidad durante la digestión enzimática. Los trozos se dejaron incubar durante la noche en un tubo Falcon a 37°C, bajo agitación. Después de 16-18 h, la solución se filtró a través de un filtro de 70 µm, transfiriendo las partes adheridas al tubo Falcon sobre el filtro y lavando con 7-8 mL de DMEM con FBS al 10%. El filtrado se centrifugó a 1.500 rpm durante 7 minutos, el sobrenadante se eliminó y las pellas se suspendieron en 10 mL de FBS al 10% en DMEM que contenía fungizona (5 µL/mL de una solución de 80 mg/mL) y gentamicina (5 µL/mL de una solución de 80 mg/mL). La suspensión celular obtenida de este modo se colocó en un matraz de 25 cm² y se incubó a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, con cambios de medio cada 2 o 3 días hasta la completa confluencia del cultivo celular. Las células, que tienen el aspecto característico de condrocitos (células hinchadas pequeñas con una forma ligeramente alargada), se separaron de la base del matraz, se contaron y se incubaron nuevamente en medio fresco. Comenzando con 0.4 g de cartílago, se obtuvieron aproximadamente 2 * 10⁶ células en la segunda fase de crecimiento. El conocimiento del número de ciclos de crecimiento a los que el cultivo ha sido sometido previamente es de importancia crucial para las células primarias; especialmente en el caso de los condrocitos se observa un procedimiento de diferenciación celular en el que, a medida que avanzan las fases de crecimiento, las células presentan cada vez más una apariencia morfológicamente similar a los fibroblastos. Por esta razón, todo el estudio se lleva a cabo con cultivos de condrocitos primarios en la 2^a-4^a fase de crecimiento.

El efecto de la condroitina sobre la proliferación de condrocitos se evaluó con microscopia de vídeo de lapso de tiempo, como se describe en el ejemplo 1. El estudio se realizó comparativamente con condrocitos estimulados con sulfato de condroitina, usando condrocitos no estimulados como sistema de control. Se sembraron 20 * 10³ células por pocillo de una placa de múltiples pocillos de 24 pocillos. Las células se trataron con condroitina o sulfato de condroitina con un contenido de endotoxina ≤0.1 EU/mg a una concentración de 1% p/v en DMEM con FBS al 10%; en los controles, las células se sembraron en DMEM con FBS al 10%. Los experimentos se realizaron por triplicado y se analizaron durante un tiempo total que osciló entre 96 y 120 h. El análisis de imágenes, realizado con el software de análisis Image Pro-plus 5.1, permitió obtener un número preciso de células con un conteo manual a veces preestablecido por el operador, para construir una curva de crecimiento a lo largo del tiempo. El análisis de los datos indica (Tabla 2) que el crecimiento de las células tratadas con condroitina fue mejor que el de las células no tratadas y las células tratadas con sulfato de condroitina.

Tabla 2 - Número de condrocitos en función del tiempo, incubados en presencia de condroitina o sulfato de condroitina al 1% p/v.

Tiempo (h)	Células x 10 ⁴		
	control	Sulfato de condroitina	condroitina
0	7.0±0.8	7.0±0.5	7.0±0.7
20	10.0±1.1	10.0±1.2	10.2±0.9
40	15.1±1.6	14.0±1.8	15.3±1.3
60	18.8±1.4	18.0±1.6	22.0±1.8

80	22.5±1.9	21.8±1.7	27.0±2.0
100	27.0±2.3	25.0±2.5	32.0±2.1

Ejemplo 3 - Análisis de fenotipo con pruebas inmunohistoquímicas en condrocitos humanos cultivados en presencia de condroitina o condroitina sulfatada

La evaluación del fenotipo condrocito de células frescas extraídas de muestras de tejido de cartilago humano y después de 4, 7 y 10 días de crecimiento en un medio que contiene condroitina o sulfato de condroitina se realizó con pruebas inmunohistoquímicas, usando el kit Envision + (DaKo) que usa un anticuerpo para el colágeno tipo II, considerado un marcador específico para la diferenciación de condrocitos (Stokes et al., Biochem. J., 2001, 360:461-470). Después de 4 días de tratamiento, los diversos cultivos (células no tratadas, células tratadas con condroitina y células tratadas con sulfato de condroitina) presentaron una fuerte positividad al colágeno tipo II, pero esta condición solo se mantuvo durante más tiempo (7 y 10 días) en las células tratadas con condroitina.

Ejemplo 4 - Análisis por PCR en tiempo real de la expresión génica de los principales marcadores específicos de diferenciación en condrocitos humanos cultivados en presencia de condroitina o sulfato de condroitina

Para evaluar los efectos biológicos de la condroitina en cultivos de condrocitos humanos, se determinó la expresión de un conjunto de genes considerados clave para establecer el fenotipo y marcadores apropiados para evaluar la calidad del tejido generado. El estudio se realizó con condrocitos preparados a partir de cartilago humano, como se informó en el ejemplo 2, las células se cultivan en presencia de condroitina o sulfato de condroitina. Usando un procedimiento estándar, se sembraron 5×10^4 células por pocillo en una placa de múltiples pocillos de 24 pocillos. Los condrocitos se cultivaron en DMEM que contenía 1% p/v de condroitina o sulfato de condroitina (contenido de endotoxina ≤ 0.1 EU/mg). Las células se estimularon durante 4, 7 y 10 días (Ishak et al., International J. of Pediatric Otorhinolaryngology, 2011, 75: 835-840), después de lo cual se extrajo el ARN con reactivo de Trizol, como se describe en el manual del kit (Life Technologies Ltd, Milan, Italy). También se llevó a cabo un análisis morfológico cualitativo del cultivo celular en diversos momentos, en paralelo con la extracción de ARN, observando las muestras correspondientes a los 4, 7 y 10 días bajo el microscopio óptico. Las células sembradas en los tres momentos diferentes se observaron bajo el microscopio, y las imágenes que mejor representaban las condiciones de crecimiento celular se adquirieron usando una estación de trabajo de microscopía de vídeo de lapso de tiempo. Después de la extracción de ARN, se realizó la transcripción inversa con un total de 1 µg de ARN y luego con amplificación mediante PCR en tiempo real de genes que son marcadores específicos para condrocitos (Tabla 3).

Tabla 3 - Oligo-secuencias usadas para el estudio de PCR en tiempo real de la expresión de los principales marcadores específicos de diferenciación en condrocitos humanos estimulados con condroitina sulfatada y no sulfatada.

Gen	Oligo-secuencias	Temperatura de hibridación (°C)
β-Actina	Hacia adelante: 5'gCgAgAAgATgA CCC AgA TC 3' Reverso: 5'ggATAgCACAgCCTggATAg 3'	55
Agrecano	Hacia adelante: 5' TCgAggACAgCgAggCC 3' Reverso: 5' TCgAgggTgTAgCgTgTAgAg 3'	56
Colágeno tipo I	Hacia adelante: 5'CAgCCgCTTCACCTACAgC 3' Reverso: 5'TTTgTATTCAATCACTgTCTTgCC 3'	56
Colágeno tipo II	Hacia adelante: 5'CAACACTgCCAACgTCCAgAT 3' Reverso: 5'CTgCTTCgTCCAgATAggCAA 3'	57
Sox9	Hacia adelante: 5'AgACCTTTgggATgCCTTAT 3' Reverso: 5' TAgCCTCCCTCACTCCAAgA 3'	55

Los genes relacionados con la producción de la matriz, tal como el agregano, el colágeno tipo I, el colágeno tipo II y el gen Sox9, cuya expresión está estrechamente relacionada con la expresión del colágeno tipo II, se analizaron como marcadores específicos para la diferenciación y caracterización de condrocitos (Akiyama H., *Mod Rheumatol.*, 2008, 18(3): 213-9; Yang et al., *J. of Orthopaedic Res.* 2011).

- 5 La expresión génica de dichos marcadores en condrocitos humanos cultivados en medio básico (control) y con tratamiento con condroitina (C) o tratamiento con sulfato de condroitina (CS) se analizó en cultivos celulares en las fases de crecimiento segunda y tercera.

10 La tabla 4 muestra los valores de los niveles de expresión génica después de 4, 7 y 10 días en comparación con el control y con los genes de mantenimiento, que permiten la estandarización de la expresión (método $\Delta\Delta\text{ct}$) (Pfaffl MW., *Nucleic Acids Res.*, 2001, May 1; 29(9): e45). Los resultados del análisis de la expresión génica se informaron como el promedio de al menos 3 experimentos independientes para pruebas realizadas en presencia de C o CS, en células en las fases 2 y 3.

15 En la fase de crecimiento 2, la expresión de agregano fue menor que el control 4 días después de sembrar en placa las células tratadas con C, mientras que al mismo tiempo, la expresión del gen fue ligeramente mayor en promedio para las células tratadas con CS. La diferencia observada no fue significativa entre las muestras tratadas con CS y el control, pero sí significativa entre las muestras tratadas con CS y las muestras tratadas con C. Los datos de expresión a corto plazo coincidieron con el hallazgo de una mayor proliferación de condrocitos en presencia de C, lo que puede explicar el retraso en la expresión, y en consecuencia la síntesis, de agregano. Después de 7 días, se observó un aumento significativo en la expresión de agregano en las muestras tratadas con C (1.66 ± 0.22) en comparación con el control, y una ligera regulación disminuida para las muestras tratadas con CS. Este último persistió, volviéndose significativo después de 10 días de incubación, mientras que, al mismo tiempo, los valores de expresión de agregano de las células tratadas con C fueron similares a los de los controles.

25 La observación en experimentos de lapso de tiempo de las muestras tratadas y no tratadas indicó un cambio de fenotipo al tipo de fibroblasto a medida que el cultivo avanzaba (y en las etapas posteriores), y la modificación morfológica evidente fue confirmada por el marcador específico, colágeno tipo I. Como se muestra en la tabla 4, después de 4 días de incubación, ambos tratamientos (C y CS) llevaron a un aumento no significativo en la expresión de colágeno tipo I; sin embargo, después de 7 días, el aumento se volvió significativo para las células tratadas con CS, a diferencia de las células tratadas con C, que en realidad presentaron una reducción estadísticamente significativa del 30% después de largos tiempos de incubación. Tanto el análisis morfológico como la evaluación de la expresión del colágeno tipo I confirmaron que el fenotipo condrocito estaba mejor conservado en presencia de C que CS (Chiu L.H. et al., *J. Cell. Physiol.*, 2011, 226: 1981-1988).

35 También se analizaron el Sox9 y colágeno tipo II; este último es considerado como uno de los marcadores específicos más significativos del tipo de células de condrocitos, especialmente en la tipificación inmunohistoquímica. La expresión del gen Sox-9 se analizó porque Sox-9 se clasificó recientemente como un factor de transcripción que controla positivamente la síntesis de colágeno de tipo II y es crucial para la condrogénesis (Yang et al., *Journal of Orthopaedic Research* August 2011).

40 Se observó un comportamiento similar para los 2 tratamientos (C y CS) en relación con la regulación positiva de Sox9, en comparación con el control, después de 4 días de incubación. A lo largo del tiempo (7 y 10 días), la condroitina ayudó a mantener altos niveles de expresión en comparación con el control, aunque con menor significación que en tiempos cortos, mientras que la CS mostró una regulación disminuida después de 10 días.

Finalmente, el marcador de condrocitos principal, el colágeno tipo II, fue fuertemente regulado por incremento en todos los tiempos de cultivo analizados para los tratamientos con C, y presentó un aumento significativo después de los tiempos cortos para las células tratadas con CS, que disminuyó a medida que los tiempos de incubación aumentaron, volviendo sustancialmente a los valores de control.

45 El panel de genes analizados demostró comparativamente que el tratamiento con C permite un mantenimiento más prolongado del fenotipo, modulando la producción de agregano, probablemente en una forma relacionada con la etapa de proliferación que precede a la etapa de síntesis de la matriz extracelular (Ishak M.F. et al, *Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2011, 75: 835-840). El análisis bajo el microscopio óptico de condrocitos en la tercera fase de crecimiento unos pocos días (4 días) después de la deposición demostró que la proliferación y la producción de matriz tuvieron lugar. En estos momentos, la expresión génica de agregano en presencia de C todavía era baja, pero luego aumentó en comparación con el control después de 7 días, secuencialmente con el aumento en la densidad celular (Roughley et al., *European Cells and Materials*, 2006, 11: 1-7). El comportamiento en presencia de CS fue similar a la incubación de hasta 7 días, pero después de 10 días hubo una evidente regulación disminuida, que fue significativa en comparación con los valores de expresión de las muestras tratadas con C. Cuando los condrocitos estaban en presencia de C, la expresión de colágeno tipo I fue más baja que el control en todos los tiempos de incubación. Los resultados para el medio que contiene CS fueron diferentes; presentó un aumento en la expresión del colágeno tipo I después de 7 días.

Al mismo tiempo, para las muestras tratadas con CS, se observó una regulación disminuida del colágeno tipo II en los primeros 4 días de crecimiento, que luego se transformó en sobreexpresión en comparación con el control (aproximadamente dos veces) después de 7 días y posteriormente, con una tendencia oscilante, mayor regulación disminuida después de 10 días. 4 días después de sembrar en placas, las muestras tratadas con C ya presentaron una alta expresión de colágeno tipo II en comparación con el control, y esta modulación se mantuvo de manera persistente a los 7 y 10 días, confirmando el papel de esta molécula en el mantenimiento del fenotipo condrocito durante un tiempo más prolongado, incluyendo en siembras secuenciales en placas.

En resumen, el estudio en su conjunto demuestra que:

a) el tratamiento con C determina una variación en la expresión de la diferenciación y los genes de la matriz analizados (agrecano, colágeno tipo I, colágeno tipo II y Sox9) en los diversos tiempos de análisis considerados (4, 7 y 10 días);

b) los condrocitos en la segunda fase de crecimiento, si se tratan con C, presentan niveles altos de expresión de colágeno de tipo II, mientras que si se tratan con CS, presentan niveles altos de expresión de colágeno de tipo I, acompañados de un cambio morfológico evidente en el fenotipo de fibroblastos;

Tabla 4 - Evaluación de la expresión de agrecano, colágeno tipo I, colágeno tipo II y Sox 9, genes marcadores en condrocitos humanos en las fases de crecimiento segunda y tercera. Los datos se informan como la proporción de los niveles de expresión de estos genes en cultivos de condrocitos después de 4, 7 y 10 días de tratamiento con 1% p/v de condroitina (C) o sulfato de condroitina (CS) en comparación con el nivel de expresión de Los mismos genes en el control consisten en células no tratadas.

Gen	Función	Muestra	Fase	Expresión de plegado*		
				4g	7g	10g
Agrecano	Este gen es un miembro de la familia de proteoglicanos agrecano/versican. La proteína codificada es una parte integral de la matriz extracelular en el tejido del cartílago.	C	II	0.08±0.02	1.66±0.22	1.07±0.15
			III	0.16±0.08	0.79±0.2	2.3±1.0
		CS	II	1.28±0.75	0.72±0.27	0.45±0.19
			III	0.17±0.10	0.87±0.20	0.59±0.13
Colágeno tipo I	El gen que codifica para las cadenas pro-alfa 1 del colágeno tipo I se presenta como una formación de fibrillas de colágeno presentes en el tejido conjuntivo, y está presente principalmente en los huesos, la córnea, la dermis y los tendones.	C	II	1.23±0.29	1.03±0.52	0.67±0.20
			III	0.24±0.01	0.85±0.49	0.59±0.13
		CS	II	1.20±0.56	1.44±0.08	1.36±0.05
			III	0.34±0.01	2.42±0.88	1.09±0.45
Colágeno tipo II	Este gen codifica para la cadena alfa 1 del colágeno tipo II, una proteína fibrilar presente en el cartílago. Las mutaciones de este gen están asociadas con la ausencia de condrogénesis, condrodysplasia y osteoartritis prematura. Específico para el fenotipo condrocito.	C	II	2.70±0.32	2.4±0.43	2.56±0.75
			III	1.69±0.20	2.62±0.47	2.3±0.16
		CS	II	2.8±0.75	1.25±0.45	0.58±0.29
			III	0.50±0.01	2.26±0.17	0.8±0.45
Sox9	El gen SOX9 codifica una proteína que desempeña un papel importante durante las primeras etapas de desarrollo. El papel clave se juega sobre todo en el desarrollo del esqueleto y el cartílago. En los condrocitos, SOX9 interactúa con un sitio específico en el intrón 6 de COL2A1, regulando su actividad.	C	II	1.87±0.85	1.16±0.15	1.78±0.75
			III	3.68±0.44	1.09±0.01	0.53±0.02

		CS	II	2.2±1.20	0.86±0.31	0.53±0.02
			III	2.6±1.21	1.41±0.04	0.81±0.05
* Nivel de expresión génica estandarizada en comparación con el control (condrocitos no tratados)						

c) las células en la tercera fase de crecimiento presentan una menor respuesta al tratamiento con C o CS, a pesar de la persistencia evidente de la expresión del colágeno de tipo II en presencia de C, lo que demuestra que el fenotipo de condrocito se mantiene, incluso en fases de crecimiento avanzado.

5 Ejemplo 5 - Fundamentos moleculares para la acción antiinflamatoria de la condroitina

El objetivo del estudio fue evaluar los efectos de la condroitina o el sulfato de condroitina en la expresión génica de GRP78 y SOD-2 en condrocitos humanos, después del tratamiento con la citoquina proinflamatoria IL-1 β .

En el estudio se usaron condrocitos humanos extraídos de cartílago nasal tratado con IL-1 β , una citoquina proinflamatoria que actúa como mediadora en la activación de los mecanismos biológicos subyacentes a la aparición de la OA. En particular, se evaluó la modulación de dos marcadores implicados en la manifestación del estado inflamatorio, la chaperonina GRP78 y la enzima superóxido dismutasa (SOD-2).

En un experimento estándar, se sembraron 10⁴ células por pocillo de una placa de múltiples pocillos de 24 pocillos, y después de 5 días, cuando se alcanzó la confluencia, las células se privaron de alimento durante 24 horas (incubación en DMEM con FBS al 0.5%). Luego, las células se trataron durante 2 h con 1% p/v de condroitina (C) o sulfato de condroitina (CS) (contenido de endotoxina $\leq$ 0.1 EU/mg), en DMEM sin FBS; el control se mantuvo en las mismas condiciones, pero sin la adición de C o CS. Luego se añadió IL-1 β a la concentración de 10 ng/mL a los cultivos. Después de 24 horas de incubación, las células se recuperaron y el ARN se extrajo de ellas con reactivo Trizol, como se describe en el manual del kit (Life Technologies Ltd, Milán, Italia).

La transcripción inversa se realizó con un total de 1 μ g de ARN, amplificando los genes de referencia (GRP78 y SOD-2) mediante PCR en tiempo real como se informó en Calamia V et al., (Calamia V, et. al., Arthritis Res. Ther. 2010, 12(4):R138).

La Tabla 5 muestra los resultados de los análisis de RT-PCR relacionados con la expresión de los dos genes marcadores seleccionados, en comparación con un control negativo que consiste en condrocitos no tratados con C, CS o IL-1 β y un control positivo que consiste en condrocitos tratados con IL-1 β sola. La expresión de GRP78 aumentó dos veces en el tratamiento con IL-1 β sola (control positivo), aproximadamente tres veces en comparación con el control negativo en el tratamiento con CS + IL-1 β , y aproximadamente diez veces en el tratamiento con C + IL-1 β . Aunque este gen es un síntoma de un mecanismo inflamatorio activo, se ha demostrado que la proteína que codifica, situada en el retículo endoplásmico, es un autoantígeno de la artritis reumatoide (un trastorno con connotaciones autoinmunes) y es responsable de la estimulación de los monocitos. Síntesis de citoquinas, modulando de este modo la respuesta antiinflamatoria del organismo.

En cuanto a la expresión de SOD-2 (Tabla 5), los resultados demuestran la equivalencia sustancial en la expresión génica en el caso de IL-1 β + CS e IL-1 β , pero una reducción considerable en el caso de IL-1 β + C.

Los valores de expresión génica se confirman por los datos de expresión de proteínas obtenidos en la transferencia de Western mediante análisis densitométrico de las bandas de proteínas GRP78 y SOD2 en comparación con el gen de la tubulina constitutiva (Tabla 6).

Tabla 5. Variaciones en la expresión génica de GRP78 y SOD 2 en condrocitos humanos después del tratamiento con IL-1 β , sulfato de condroitina IL-1 β (IL-1 β CS) e IL-1 β + condroitina (IL-1 β + C), en comparación con las células no tratadas tomadas como 1 (control negativo). La expresión génica se determina mediante un análisis de PCR en tiempo real (n = 3, * p < 0.05 IL-1 β + CS versus control positivo, § p < 0.01 IL-1 β + C vs IL-1 β + CS y control positivo)

Gen	Control	IL-1 β	IL-1 β +CS	IL-1 β +C
GRP78	1	2.0±0.5	2.8±0.2*	10±2,1§

SOD-2	1	22±4	24±3	8±1.1\$
-------	---	------	------	---------

Tabla 6. Valores de expresión de proteínas de GRP78 y SOD 2 en condrocitos humanos después del tratamiento con IL-1 β , IL-1 β + sulfato de condroitina (IL-1 β + CS) e IL-1 β + condroitina (IL-1 β + C), obtenido del análisis densitométrico de la transferencia de Western, análisis realizado en n = 3 experimentos independientes, * p (transferencias comparadas con tubulina expresada de forma constitutiva, (* p <0.05 IL-1 β + C contra IL-1 β + CS y positivo controlar)

Proteína	Control	IL-1 β	IL-1 β +CS	IL-1 β +C
GRP78	1	1.15±0.15	1.18±0.10	1.71±0.31*
SOD-2	1	1.96±0.20	1.94±0.30	1.42±0.22*

En resumen, los resultados experimentales demuestran que: a) la expresión de GRP78 inducida por IL-1 β se modula positivamente mediante el tratamiento previo con C, en un grado significativamente mejor que el tratamiento previo con CS; b) el procedimiento de regulación positiva de la SOD-2 inducida por la IL-1 β (un síntoma de fuerte estrés oxidativo) se reduce de manera efectiva mediante el tratamiento previo con condroitina, mientras que el tratamiento previo con sulfato de condroitina es ineficaz.

Ejemplo 6 - Condroitina como un antibacteriano.

Se examinó la actividad antibacteriana de la condroitina (C) y el sulfato de condroitina (CS) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 en un medio sólido in vitro. Las concentraciones exploradas oscilaron entre 40 μ g/mL y 40 mg/mL de C o CS como concentraciones finales en el medio. La infusión de cerebro-corazón (Oxoid) se usó como medio de cultivo para *E. coli* ATCC 25922, y M17 (Oxoid) para *E. faecalis* ATCC 19433; ambos medios se ajustaron al mismo pH y la misma osmolaridad antes de solidificarse añadiendo agar y enfriando. Se colocaron 100 μ L de una suspensión bacteriana que contenía 10^2 , 10^3 o 10^4 bacterias/mL como inóculo. Las placas inoculadas se incubaron en agitadores en aire a 37 °C, durante 16 h. El número de colonias se contó luego en las placas de control en ausencia de las sustancias en estudio y en las placas en las diversas concentraciones de C y CS. Los datos de los experimentos para los dos microorganismos, realizados por triplicado para cada una de las condiciones, se muestran en las tablas 7 y 8.

Los resultados demuestran que el efecto de C es mayor que el de CS en todas las concentraciones, pero en particular surgió una fuerte eficacia del primero, que culminó en una inhibición total del crecimiento de *E. coli* cuando se obtuvieron 40 mg/mL de C añadido, y un umbral de sensibilidad superior dentro de la inhibición que ya es alto en concentraciones 10 veces mayores

Tabla 7 - Inhibición de crecimiento celular de *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 en placa en presencia de CS y C

Concentración	No. de bacteria inoculada			CFU después de 16 h			Factor de inhibición	Valoración cualitativa de inhibición
Control	10	100	1000	8±2	90±8	870±100	-	
40 μ g/mL de CS	10	100	1000	7±2	85±7	860±70	1	insignificante
400 μ g/mL de CS	10	100	1000	5±1	50±5	400±70	2	suave
4 mg/mL de CS	10	100	1000	0	9±2	100±10	10	significativo
40 mg/mL de CS	10	100	1000	0	0	3±1	330	alto
40 μ g/mL de C	10	100	1000	7±2	80±5	800±70	1.3	suave
400 μ g/mL de C	10	100	1000	2±1	10±2	120±30	9	significativo
4 mg/mL de C	10	100	1000	0	1±1	20±4	66	alto
40 mg/mL de C	10	100	1000	0	0	0	1000	total

Tabla 8 - Inhibición de crecimiento celular de *Enterococcus faecalis* cepa ATCC 19433 en placa en presencia de CS y C.

Concentración	No. de bacteria inoculada			CFU después de 36 h			Factor de inhibición	Valoración cualitativa de inhibición
Control	10	100	1000	9±2	95±8	950±100	-	
40 µg/mL de CS	10	100	1000	8±2	90±7	960±70	-	insignificante
400 µg/mL de CS	10	100	1000	7±1	80±5	780±70	1.3	suave
4 mg/mL de CS	10	100	1000	5±1	48±4	520±30	2	significativo
40 mg/mL de CS	10	100	1000	0	15±2	120±10	7.4	alto
40 µg/mL de C	10	100	1000	8±2	82±5	870±70	1.2	suave
400 µg/mL de C	10	100	1000	5±1	55±6	480±30	2	significativo
4 mg/mL de C	10	100	1000	0	18±4	150±4	6.1	significativo
40 mg/mL de C	10	100	1000	0	0	20±2	50	alto

- 5 La cepa de *Enterococcus* demostró ser menos sensible en general; sin embargo, en presencia de la concentración máxima de las sustancias probadas, presentó un factor de inhibición de 7.4 con CS, pero un factor de 50 con C. Estos resultados demuestran la eficacia de C como antibacteriano.

Ejemplo 7 - Estudios de toxicidad sobre la condroitina.

- 10 Estudio de toxicidad aguda: el estudio se realizó en dos modelos animales, el ratón y la rata, a los que se administró condroitina por vía oral (p.o.) o por vía intravenosa (i.v.). Para cada experimento, los animales (ratones o ratas Sprague Dawley) se dividieron en 5 grupos de 20 (10 machos y 10 hembras) que recibieron condroitina p.o. o i.v. en dosis que oscilan entre 250 y 2,000 mg/kg para administración oral y 20 a 160 mg/kg para administración intravenosa; el volumen administrado fue de 10 mL/kg para administración p.o. y 5 mL/Kg para administración i.v. La tabla 9 muestra el diseño del estudio.

- 15 Tabla 9 - Diseño del estudio para la evaluación de la toxicidad aguda de la condroitina administrada al ratón y a la rata en una sola dosis oral o intravenosa.

Número de animales	Dosis (mg/Kg)	Dosis (mg/animal)		Condroitina total para 20 animales (mg)	
		ratón	rata	Ratón	Rata
20	0	0,0	0	0	0
20	20	0,6	4	12	80
20	40	1,2	8	24	160
20	80	2,4	16	48	320
20	160	4,8	32	96	640
Total				180	1.200

- 20 Durante el tratamiento, los animales se examinaron cada 24 h durante 40 días, y no se observaron signos de toxicidad o mortalidad. Al final del tratamiento, los animales se sometieron a eutanasia y se realizó una autopsia completa. Los valores de LD₅₀ para ambos tipos de animales fueron más de 2,000 mg/Kg para administración p.o. y

160 mg/Kg para administración i.v. En general, el estudio demuestra que la condroitina no es tóxica a las dosis usadas en condiciones de administración aguda.

Estudio de toxicidad subaguda: el estudio se realizó en ratas mediante la administración de condroitina por vía oral (p.o.) e intramuscular (i.m.). Para cada uno de los dos estudios, los animales (ratas Sprague Dawley) se dividieron en 4 grupos formados por 15 machos y 15 hembras; se administró condroitina a la concentración de 50, 100 y 200 mg/kg respectivamente a los primeros 3 grupos, y el portador solo al cuarto grupo; el volumen de administración fue de 10 mL/kg para administración p.o. y 5 mL/Kg para administración i.m. La administración diaria continuó durante 30 días. Las dosis usadas representan hasta 20 veces la dosis terapéutica humana. El estado general de salud y el comportamiento de los animales tratados se controlaron diariamente, y las variaciones de peso, el estado hematológico y la orina se evaluaron cada 5 días. Durante todo el período de tratamiento no se produjeron muertes, y los animales no presentaron alteraciones de comportamiento significativas o variaciones anormales de peso. De manera similar, los parámetros químico-clínicos no presentaron variaciones estadísticamente significativas en comparación con los animales de control. Al final del estudio, todos los animales se sometieron a eutanasia y se realizó una autopsia y un análisis histopatológico de los órganos principales (pulmones, corazón, hígado, ovarios, útero, testículos, riñones y glándula pituitaria). Ninguna de estas evaluaciones indicó diferencias significativas entre los animales tratados con condroitina y los animales de control que recibieron el portador solo. En general, el estudio demuestra que la condroitina no es tóxica a las dosis usadas en condiciones de administración subaguda.

Estudio de toxicidad crónica: este estudio se realizó en ratas (Sprague Dawley) tratadas diariamente durante 26 semanas con condroitina administrada p.o. (por sonda) a dosis de 50 a 200 mg/kg. El estado general de salud y el comportamiento de los animales tratados se controlaron diariamente, y las variaciones de peso, estado hematológico y orina se evaluaron cada 7 días. Durante todo el período de tratamiento no se produjeron muertes, y los animales no presentaron alteraciones de comportamiento significativas o variaciones anormales de peso. De manera similar, los parámetros químico-clínicos no presentaron variaciones estadísticamente significativas en comparación con los animales de control. Al final del estudio, todos los animales se sometieron a eutanasia y se realizó una autopsia y un análisis histopatológico de los órganos principales (pulmones, corazón, hígado, ovarios, útero, testículos, riñones, glándula pituitaria, ganglios linfáticos y tracto gastrointestinal). Ninguna de estas evaluaciones indicó diferencias significativas entre los animales tratados con condroitina y los animales de control que recibieron el portador solo. En general, el estudio demuestra que la condroitina no es tóxica a las dosis usadas en condiciones de administración crónica.

Ejemplo 8 - Estudios de mutagenicidad y genotoxicidad.

Los estudios de mutagenicidad de condroitina se realizaron en diferentes modelos de mutagenicidad y genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* (Sirtori C., File CONDRAL®, Vol. IV - Reproductive Toxicity and Mutagenesis; Slater E. et al., Rapid detection of mutagens and carcinogens, Cancer Res. 1971, 31: 970-973).

Prueba *in vitro*, prueba de Ames. La prueba se realizó con y sin activación metabólica en 5 cepas de *Salmonella typhimurium*. La condroitina se probó a concentraciones de entre 2,0 µg/placa y 2,0 mg/placa. El análisis de la mutación inversa obtenida en las diferentes dosis y en el control no demostró diferencias significativas en el número de revertentes de histidina en cada grupo. El estudio demuestra que la condroitina y los metabolitos que puede generar no inducen una mutación inversa puntual específica en las cepas de *Salmonella typhimurium* analizadas.

Prueba *in vitro*, prueba de aberración cromosómica: la prueba de aberración cromosómica se realizó en linfocitos humanos en dos experimentos diferentes con y sin activación metabólica. El diseño del estudio se reporta en la tabla 10.

Tabla 10 - Diseño experimental de la prueba de aberración cromosómica para la evaluación de la mutagenicidad de la condroitina.

	Sin mezcla de S9			Con mezcla de S9	
	experimento I		experimento II	experimento I	experimento II
Periodo de exposición	4h	22h	46h	4h	4h
Recuperación	18h	-	-	18h	42h
Intervalo de preparación	22h	22h	46h	22h	46h

Se analizaron dos cultivos en paralelo en cada uno de los dos experimentos. Las dosis de condroitina probadas entre 1.6 y 5.0 µg/mL se seleccionaron como se describe en la Guía de la OCDE # 473 del 21 de julio de 1997. No se observaron aumentos significativos en el número de células con aberraciones cromosómicas en el estudio doble independiente, incluso en las concentraciones más altas de condroitina. probado

Prueba *in vitro*, prueba de reparación de ADN: la prueba de alteración del ADN se realizó con una cepa de *Escherichia coli* sensible a la acción de sustancias mutagénicas. En el estudio, la mitomicina C se usó como control positivo y la penicilina G como control negativo. La condroitina se probó con y sin activación metabólica en las concentraciones descritas por Slater et al. Slater et al. (Slater E. et al., Rapid detection of mutagens and carcinogens, Cancer Res. 1971, 31:970-973, 1971). Los resultados demuestran que incluso en las dosis más altas, la condroitina no interactúa y no altera el ADN.

Pruebas *in vivo*, prueba de micronúcleo: usando ratones como modelo experimental, se administró condroitina en una prueba temprana de micronúcleo en dosis de 20 a 80 mg/kg, administrada por vía intraperitoneal (i.p.) a 5 grupos de ratones suizos (5 por grupo). La administración se realizó dos veces, con 24 h de diferencia, usando trietanolamina como control positivo. 6 h después de la segunda administración, los animales se sometieron a eutanasia y la médula ósea se preparó como se describe en el Estudio RCC-CCR 105303, 2007. La frecuencia de las células micronucleadas se determinó en un total de 2,000 eritrocitos por animal. No se observaron diferencias significativas en el estudio entre los grupos tratados y el control que solo recibió el portador. En conjunto, los datos demuestran que la condroitina puede considerarse no mutagénica en la prueba de micronúcleo temprana.

Ejemplo 9 - Estudios de carcinogenicidad.

El examen histopatológico de las pruebas subcrónicas y crónicas realizadas en la rata (Ejemplo 6) demostró la ausencia total de degeneración neoplásica potencial en todos los órganos fundamentales. En particular, el estudio crónico, incluso en las dosis más altas, demostró la ausencia total de síntomas de irritación del tracto gastrointestinal, que a largo plazo generalmente anuncia el desarrollo de posibles tumores, tales como el carcinoma gastrointestinal. De manera similar, es importante tener en cuenta que el catabolismo hidrolítico de la condroitina no es diferente del de el sulfato de condroitina, y que los oligosacáridos y azúcares obtenidos representan especies químicas naturalmente presentes en el cuerpo.

Ejemplo 10 - Estudios de toxicidad en el sistema reproductor.

Estudio de fertilidad y capacidad reproductora: el estudio de toxicología de los posibles efectos de la condroitina en la fertilidad masculina y la capacidad reproductora femenina se realizó en 200 ratas Wistar (160 hembras y 40 machos), aleatorizadas en cuatro grupos, cada uno de los cuales consistió en 40 hembras y 10 hombres, tratados con 0, 50, 100 o 200 mg/Kg de condroitina. Cada grupo de ratas hembra se dividió a su vez en dos subgrupos de 20 animales; el primer grupo recibió el producto diariamente desde el día 14 antes del inicio del período de apareamiento hasta el día 19 de gestación, y el segundo lo recibió hasta el día 21 después del nacimiento. Todos los machos fueron tratados con condroitina durante 60 días antes del apareamiento y durante todo el período de gestación de las hembras. El protocolo usado sigue las directrices de la Directiva CEE 85/571. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tres grupos tratados, o dentro de cada grupo entre los dos subgrupos de hembras y el control. El análisis histopatológico de las crías sacrificadas después del nacimiento en el día 21 no mostró diferencias entre los animales de control y los tratados, lo que demuestra la ausencia total de anomalías. Sobre la base de estos resultados, se puede concluir que la administración oral diaria de condroitina durante 60 días, incluso a una dosis de 200 mg/kg, no tiene ningún efecto sobre la fertilidad de ratas macho; de manera similar, no tiene ningún efecto sobre la capacidad reproductora de las hembras tratadas con condroitina que se administra diariamente hasta 200 mg/kg durante 15 días antes del apareamiento y hasta el día 21 de la lactancia.

Desarrollo embrio-fetal: el estudio de toxicidad fetal se realizó en 50 ratas neozelandesas preñadas de 5 meses, aleatorizadas en 4 grupos de 12 individuos, tratados con condroitina i.m. en dosis de 0, 25, 50 y 100 mg/Kg una vez al día, desde el 6 hasta el 27 día de gestación. En el día 28, se extrajeron los fetos por cesárea y se les realizó una prueba histopatológica completa. Durante el período de tratamiento, se evaluaron los siguientes parámetros: aumento del peso corporal de los ratones preñados, número de cuerpos lúteos e implantes, fetos nacidos vivos, peso medio, sexo de los fetos nacidos vivos, número de resorciones y número de fetos nacidos muertos. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo de control que recibió i.m. Tratamiento con el portador solo. No se observaron alteraciones externas o alteraciones del aparato óseo o vísceras en los fetos en los 4 grupos. La evaluación general de los datos lleva a la conclusión de que la condroitina no presenta actividad teratogénica, incluso a la dosis máxima probada de 100 mg/kg.

Desarrollo postnatal: el estudio de toxicidad postnatal se realizó en 48 ratas Wistar hembras, tratadas por vía oral desde el día 15 de gestación hasta el final del período de lactancia, es decir, 21 días después del parto. Los animales se dividieron en cuatro grupos que recibieron 0, 50, 100 o 200 mg/Kg de condroitina p.o. todos los días. Al final del período de lactancia, todas las hembras fueron sometidas a eutanasia, y se evaluaron la morfología y las malformaciones esqueléticas y viscerales de las crías. Los parámetros observados a lo largo del tiempo fueron el peso corporal de las hembras lactantes y el número, género y peso de las ratas nacidas. Los resultados no mostraron diferencias entre los grupos tratados, o entre los grupos tratados y el grupo de control. No se observaron anomalías en el desarrollo de la descendencia durante la lactancia. Se puede concluir que la condroitina no tiene efectos teratogénicos en ratas después de la administración de dosis orales de 50, 100 y 200 mg/Kg/día desde el día 15 de gestación hasta el final del período de lactancia.

Ejemplo 11 - Sensibilización

La actividad de sensibilización sistémica y cutánea de la condroitina se evaluó en la cobaya.

Sensibilización sistémica y anafilaxis: La prueba de hipersensibilización inducida por condroitina se realizó en 6 cobayas, como se describe a continuación. Se sensibilizaron seis animales con una inyección intramuscular de 100 µg de ovalbúmina + 5 mg de condroitina en 100 µL de solución salina regulada a pH 6.8. El suero se obtuvo 10 días después de la sensibilización de los animales. Otras 24 cobayas se trataron por vía intradérmica con el suero hiperinmune de los animales sensibilizados previamente y se dividieron en 4 grupos de 6 (grupo A: control negativo; grupo B: prueba con 0.5 mg/mL de condroitina; grupo C: prueba con 50 mg/mL de condroitina; grupo D: control positivo). 3 h después de la inyección intradérmica con suero hipersensibilizado, los cuatro grupos de animales se trataron i.v. como sigue: grupo A: 1 mL de NaCl al 0.9% + 0.2% de solución de azul de Evans; grupo B: 1 mL de 0.5 mg/mL de condroitina + 0.2% de solución de azul de Evans; grupo C: 1 mL de 50 mg/mL de condroitina + 0.2% de solución de azul de Evans; Grupo D: 1 mL de 0.1 mg/mL de ovalbúmina + 0.2% de solución de azul de Evans. 24 h después de la i.v. En la inyección del antígeno de ovoalbúmina y azul de Evans, todos los animales del grupo D presentaron exudación del marcador de azul de Evans en el área dérmica en la que se inyectó el suero hiperinmune. Sin embargo, la condroitina no indujo reacciones anafilácticas o de hipersensibilidad en ninguno de los animales tratados.

Sensibilización de la piel - La prueba de hipersensibilización cutánea inducida por condroitina se realizó en cobayas, como se describe a continuación. Se sensibilizaron 20 animales con una inyección intradérmica de 5.0 mg de condroitina en 0.1 mL de NaCl al 0.9% con y sin adyuvante de Freund. 10 animales del grupo de control recibieron inyecciones de 0.1 mL de NaCl al 0.9% con y sin adyuvante de Freund. La inducción de la sensibilización se completó después de 7 días aplicando 0.5 mL de una solución de condroitina de 50 mg/mL a las áreas de la piel previamente inyectadas de los animales sensibilizados. Se aplicaron 0.5 mL de una solución de NaCl al 0.9% al grupo de control. 21 días después, todos los animales se trataron con 0.5 mL de una solución de condroitina al 50% en el lado izquierdo del abdomen y 0.5 mL de una solución de NaCl al 50% en el lado derecho del abdomen. No se observaron signos de sensibilización cutánea en los animales tratados.

Ejemplo 12 - Reparación de heridas.

El mini cerdo (un animal que pesa 25-28 Kg), un modelo cuya validez para los estudios de reparación de heridas es ampliamente reconocido, se usó como modelo experimental para evaluar la capacidad de la condroitina para acelerar el procedimiento de reparación del tejido cutáneo dañado.

Operando con anestesia general desde la parte posterior de los animales, se afeitó el pelo y el área afeitada se lavó a fondo con una solución al 10% de complejo de yodo-povidonol y luego con alcohol isopropílico. Se hicieron 12 heridas elípticas, seis en cada lado, 20 mm de largo y 6 mm de ancho, en las espaldas afeitadas y desinfectadas de los animales. Las heridas penetraron hasta la grasa subcutánea, a unos 4 cm de la línea media de la espalda, con el lado más largo de la herida paralelo a la línea espinal. Las incisiones se cosieron luego con dos puntos para cerrar el plano dérmico. Los puntos superficiales se retiraron después de aproximadamente 7 días. Las heridas se cubrieron con un apósito no adhesivo asegurado con yeso adhesivo, y el cuerpo de los animales se protegió con una venda elástica. Se seleccionaron ocho animales y se dividieron en dos grupos de 4, tratados por vía tópica con condroitina (primer grupo) o sulfato de condroitina (segundo grupo), como se describe en el protocolo que se muestra en la tabla 11. A partir de la cabeza del animal, las dos primeras heridas en ambos lados se trataron con el portador solo, que consistía en 2.5 mL de solución salina, los dos segundos en ambos lados se trataron con 2.5 mL de una solución de condroitina 30 mg/mL en solución salina (primer grupo) o con 2.5 mL de una solución de 30 mg/mL de solución de sulfato de condroitina en solución salina (segundo grupo), y los terceros dos en ambos lados se trataron con 2.5 mL de una solución de 60 mg/mL de condroitina en solución salina (primer grupo) o 2.5 mL de solución de 60 mg/mL de sulfato de condroitina en solución salina (segundo grupo). El tratamiento se realizó goteando lentamente la solución en la herida dos veces al día y aplicando un apósito de gasa, que luego se usó para cubrir la herida de manera que el ingrediente activo permaneciera in situ durante más tiempo. El estudio continuó durante 6 semanas, después de lo cual los animales fueron sacrificados. Se tomó una biopsia de aproximadamente 4 mm después de 4 semanas, mientras que las áreas completas de las 12 heridas dorsales se extrajeron de los animales sacrificados para pruebas histológicas. Se realizaron las siguientes evaluaciones en los animales tratados:

a) una evaluación después de 4 y 6 semanas por 4 dermatólogos que evaluaron de forma independiente la calidad de la herida (color, textura, bordes, distorsión) y la apariencia del tejido circundante en una escala de 5 puntos;

b) una evaluación patológica en una escala del 1 al 3 realizada por dos cirujanos veterinarios en el tejido extirpado después de que los animales fueron sacrificados, para evaluar la presencia de situaciones histopatológicas anormales (cantidad de tejido de granulación y respuesta inflamatoria, con una puntuación de 3 para cicatrización óptima a 1 para síntomas inflamatorios en curso y abundante tejido de granulación);

c) un análisis histológico de las biopsias de 4 semanas y el tejido extirpado después de que los animales fueron sometidos a eutanasia, realizado por dos histólogos que operaron de forma independiente, quienes evaluaron la organización del colágeno en una escala de 3 puntos. Una organización de las fibras de colágeno similar al modelo

normal, pero más pequeña que la dermis normal (la mejor cicatrización), obtuvo 3 puntos, una disposición intermedia del tejido de fibra obtuvo 2 puntos y diversas fibras dispuestas en haces paralelos o en un plano anotado. 1 punto.

Tabla 11: diseño del estudio para evaluar la eficacia de la condroitina en comparación con el sulfato de condroitina en la reparación de heridas. Cada grupo constaba de 4 animales. El primer grupo fue tratado con condroitina (C) y el segundo con sulfato de condroitina (CS).

Grupo	Dos primeras heridas en ambos lados irrigadas con 2.5 mL de:	Dos segundas heridas en ambos lados irrigadas con 2.5 mL de:	Dos terceras heridas en ambos lados irrigadas con 2.5 mL de:
1	Solución salina	30 mg/mL de C	60 mg/mL de C
2	Solución salina	30 mg/mL de CS	60 mg/mL de CS

La tabla 12 muestra las evaluaciones de calidad de la herida.

Tabla 12 - Evaluación dermatológica, histopatológica e histológica de heridas después del tratamiento con condroitina (C) y sulfato de condroitina (CS); a-b) después de 4 y 6 semanas, 4 dermatólogos evaluaron de forma independiente la calidad de la herida (color, textura, bordes y distorsión) y la apariencia del tejido circundante en una escala de 5 puntos, donde 5 representa una calidad excelente; b) evaluación histopatológica en una escala de 1 a 3 realizada por dos veterinarios en el tejido extirpado después de que los animales fueron sacrificados, para evaluar la presencia de situaciones histopatológicas anormales (cantidad de tejido de granulación y respuesta inflamatoria, donde 3 indica una cicatrización óptima y 1 indica síntomas inflamatorios en curso y abundante tejido de granulación; d/e) análisis histológico de las biopsias de 4 semanas y tejidos extraídos después de que los animales fueron sometidos a la eutanasia, realizado por dos histólogos que operaron de forma independiente y evaluaron la organización del colágeno en una escala de 3 puntos, donde 3 representa una organización de las fibras de colágeno similar al modelo normal, pero una dermis más pequeña que la normal (la mejor cicatrización), 2 representa una disposición intermedia del tejido de la fibra y 1 punto representa diversas fibras dispuestas en haces paralelos o en un plano.

Evaluación	Solución salina	30 mg/mL		60 mg/mL	
		C	CS	C	CS
a) Evaluación de la calidad de la herida después de 4 semanas	2.3±0.1	3.8±0.4	2.6±0.2	4.1±0.3	2.9±0.2
b) Evaluación de la calidad de la herida después de 6 semanas	3.5±0.3	4.5±0.3	3.4±0.3	4.9±0.1	3.7±0.3
c) Evaluación histopatológica después de 6 semanas	1.7±0.2	2.3±0.1	1.7±0.2	3.0±0.2	2.3±0.2
d) Evaluación histológica de biopsias después de 4 semanas	1.3±0.1	2.3±0.2	1.3±0.1	2.7±0.1	1.3±0.1
e) Evaluación histológica de biopsias después de 6 semanas	1.7±0.2	2.7±0.1	1.7±0.2	3.0±0.2	1.7±0.1

La evaluación dermatológica de la cicatrización de heridas demostró una calidad mucho mejor del procedimiento de cicatrización de heridas en presencia de condroitina, que fue más rápida y se caracterizó por una apariencia cualitativamente mejor de los bordes de la herida y del tejido circundante.

En el caso del tratamiento con condroitina, la evaluación histopatológica mostró un menor contenido de tejido de granulación y síntomas inflamatorios muy limitados.

La evaluación histológica demostró que en el caso del tratamiento con condroitina, la organización de las fibras de colágeno es muy similar a la del tejido normal, lo que indica un procedimiento muy avanzado de cicatrización de heridas.

Ejemplo 13 - Potencial terapéutico de la condroitina en el tratamiento de la enfermedad articular

- 5 El potencial terapéutico de la condroitina en el tratamiento de la enfermedad articular se evaluó en el perro, un modelo experimental en el que los problemas ortopédicos degenerativos o inflamatorios asociados con la enfermedad articular degenerativa (DJD) son particularmente recurrentes en la edad joven y geriátrica.

10 El estudio se realizó en 90 animales con un peso medio de 30 ± 10 Kg, una edad media de aproximadamente 8 años, de diferentes razas, tanto machos como hembras, todos con DJD del hombro, cadera y/o sofocos, asignados al azar en tres grupos de 30 animales tratados con 15 mg/Kg/día de condroitina (grupo C), 15 mg/Kg/día de sulfato de condroitina (grupo CS) o 15 mg/Kg/día de almidón (grupo placebo). Los animales recibieron la dosis diaria con su comida. Se realizaron una radiografía y un conjunto de pruebas de diagnóstico para DJD de forma preliminar en todos los animales incluidos en el estudio. Los animales no recibieron ningún tratamiento farmacológico durante las tres semanas anteriores al estudio, y durante el estudio no recibieron ningún tratamiento adicional a los probados.

15 El estudio continuó durante 6 meses; durante el tratamiento, los animales, que fueron atendidos por sus dueños, fueron monitoreados por tres veterinarios que evaluaron independientemente el estado de los animales. Cada mes, los dueños de los animales y los tres veterinarios completaron un cuestionario, asignando una puntuación en una escala de 1 a 5 a un conjunto de parámetros. Una vez al mes, los propietarios evaluaron, en una escala de 1 a 5, la cojera del animal, su disposición para jugar, la tolerancia a la carga y el comportamiento que indica síntomas de dolor. Una vez al mes, los veterinarios evaluaron, en una escala de 1 a 5, la regresión de la enfermedad, la caracterización del tipo y grado de enfermedad articular y el dolor y la capacidad del animal para compensar. Al final del estudio, el estado de la enfermedad se verificó mediante una radiografía y un conjunto de pruebas de diagnóstico para DJD. Sobre la base de los cuestionarios y las evaluaciones clínicas finales, los tres cirujanos veterinarios expresaron una puntuación general promedio para la regresión de la enfermedad en los tres grupos de animales en una escala de 1 a 10, donde los valores de 3 a 1 indican un deterioro creciente de los síntomas clínicos desde el inicio del ensayo, y los valores crecientes de 3 a 10 indican una evolución hacia una cicatriza completa. El grupo control tuvo una puntuación media de 2.5 ± 1.3 , el grupo CS 5.3 ± 2.3 y el grupo C 8.5 ± 2.1 . En conjunto, el ensayo en perros que padecen DJD indica que el tratamiento oral con condroitina a la dosis diaria de 15 mg/kg durante 6 meses contribuye significativamente a mejorar los síntomas clínicos, con una buena regresión de la enfermedad.

- 30 Ejemplo 14 - Tratamientos de biorrevitalización de la piel que comprenden microinyecciones intradérmicas de condroitina.

La actividad de biorrevitalización de la piel resultante de microinyecciones de condroitina se evaluó por comparación con tratamientos similares basados en ácido hialurónico. 60 voluntarios de entre 50 y 70 años fueron reclutados para el ensayo, y recibieron un tratamiento estético de biorrevitalización de la piel con tres ciclos de microinyecciones quincenales en un período de 6 meses de 2 mL de una solución de condroitina estéril sin pirógenos (MW 35 KDa) 20 mg/mL (C-20) o 60 mg/mL (C-60), usando un ciclo de tratamiento convencional similar con 2 mL de ácido hialurónico 20 mg/mL 1,200 KDa (HA-20) como referencia positiva. Los voluntarios no habían recibido tratamientos similares ni tratamientos de peeling químico en los 5 meses inmediatamente anteriores al estudio. Durante el período de tratamiento de 6 meses, todos los voluntarios reclutados usaron la misma crema hidratante, aplicada por la mañana y por la noche. Las mediciones instrumentales de TEWL (pérdida de agua trans epidérmica) y la textura del tejido y una réplica de silicona de la superficie de la piel se realizaron en el mismo laboratorio al comienzo del estudio y después de 6 meses para documentar la aspereza de la piel. Después de 0, 2, 4 y 6 meses, el médico estético que realizó el tratamiento y el paciente completaron de forma independiente un cuestionario para evaluar la situación estética general en una escala de 1 a 5, donde 1 indica que el tratamiento no tuvo ningún resultado y 5 indica éxito completo. Estas evaluaciones, junto con los datos instrumentales, llevaron a una evaluación general del resultado obtenido. La tabla 13 muestra los promedios de los resultados obtenidos.

Grupo	Evolución											
	por el paciente		por el médico						instrumental			
	meses											
	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
HA-20	1.4±0.1	2.8±0.2	3.5±0.3	4.1±0.3	1.3±0.1	3.0±0.2	4.1±0.1	4.3±0.2	1.6±0.1	3.0±0.2	4.0±0.2	4.1±0.1
C-20	1.2±0.1	3.1±0.1	4.5±0.2	4.5±0.3	1.5±0.2	3.8±0.4	4.5±0.2	4.7±0.1	1.5±0.2	4.1±0.3	4.6±0.4	4.7±0.1
C-60	1.3±0.2	4.0±0.5	4.9±0.1	5.0±0.0	1.2±0.1	4.0±0.2	5.0±0.0	5.0±0.0	1.1±0.1	4.5±0.1	5.0±0.0	5.0±0.0

Tabla 13: 60 voluntarios de entre 50 y 70 años se reclutaron para el ensayo y recibieron un tratamiento estético de biorrevitalización de la piel con tres ciclos de microinyecciones quincenales en un periodo de 6 meses de 2 ml de una solución de condroitina estéril sin pirógenos (MW 35 KDa) 20 mg/mL (C-20) o 60 mg /ml (C-60), utilizando un ciclo de tratamiento convencional similar con 2 ml de ácido hialurónico 20 mg/ml 1,200 KDa (HA-20) como referencia positiva . Después de 0, 2, 4 y 6 meses, el médico estético que realizó el tratamiento y el paciente completaron de forma independiente un cuestionario para evaluar la situación estética general en una escala de 1 a 5, donde 1 indica que el tratamiento no tuvo ningún resultado y 5 indica éxito completo Las mediciones instrumentales de TEWL (pérdida de agua transepidérmica) y la textura del tejido y una réplica de silicona de la superficie de la piel se realizaron en el mismo laboratorio al comienzo del estudio y después de 6 meses para documentar la aspereza de la piel. Una vez más, la evaluación se expresó con la opinión del dermatólogo, quien evaluó los datos comparativamente y obtuvo el resultado total en una escala de 1 a 5. Cada cifra representa el promedio de los 10 casos examinados.

Como se verá, la condroitina, a la misma concentración que el ácido hialurónico, tiene un efecto biorrevitalizante más temprano y más prolongado (HA-20 en comparación con C-20), mientras que a concentraciones más altas (C-60), el efecto biorrevitalizante es mucho mayor, en cuanto a las evaluaciones por médico y paciente y los resultados instrumentales, logrando excelentes resultados a partir del segundo tratamiento.

Ejemplo 15: la condroitina como agente que aumenta la actividad de los ingredientes activos antitumorales

Se estudió la capacidad de la condroitina (C) y del sulfato de condroitina (CS) para estimular la acción apoptótica de la gemcitabina (GEM) y la mitomicina-C (MMC), dos antitumorales usados en el tratamiento intravesical de los tumores vesicales no musculares. Las líneas celulares de cáncer de vejiga humana HT-1376 se usaron como modelo del sistema, evaluando la capacidad de diferentes combinaciones de GEM o MCC y C o CS para inhibir el crecimiento.

La línea celular de carcinoma de vejiga humana HT-1376 (American Type Tissue Cultures Collection, Rockville, MD) se cultivó en DMEM complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% inactivado por calor, ácido 4,2-hidroxietil-1-piperazinil-etanosulfónico (HEPES) 20 mM, 100 U/mL de penicilina, 100 pg/mL de estreptomicina, 1% p/v de L-glutamina sódica y 1% p/v de piruvato. Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada que comprendía 95% de aire/5% de CO₂ a 37 °C. Para el estudio del sinergismo entre C o CS y MMC o GEM para inhibir el crecimiento de HT-1376, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 6 * 10³ células/pocillo. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, las células se trataron con diferentes concentraciones de C o CS o GEM o MMC, y las combinaciones de estos con polisacáridos y antitumorales. La evaluación del sinergismo polisacárido-antitumoral se basó en el análisis después de 72 horas de tratamiento de las curvas de fracción de las células supervivientes frente a la concentración de antitumoral, realizada con el programa informático Calcsyn (Biosoft, Ferguson, MO). Los valores de índice de combinación (IC) de <1, 1 y > 1 indican sinergia, aditividad y antagonismo, respectivamente, en la interacción polisacárido-antitumoral. La contribución específica de los diversos ingredientes C, CS, GEM y MMC a la citotoxicidad de las diversas combinaciones se determinó mediante el cálculo del factor de potenciación (PF), definido como la relación entre la IC₅₀ (inhibición del crecimiento del 50%) de C, CS, GEM o MMC tomados individualmente y la IC₅₀ de las combinaciones C/GEM, C/MMC, CS/GEM y CS/MMC; un valor de PF más alto indica mayor citotoxicidad.

Se usó la citometría de flujo para evaluar la cantidad de células apoptóticas o necróticas. Se usó isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC) combinado con yoduro de propidio (PI) como marcador; las células apoptóticas eran anexina V-FITC positiva y PI negativa, y las células necróticas eran anexina V-FITC positiva y PI positiva. Las células se marcaron incubándolas con Annexin V-FITC (Diagnostics MedSystems) y PI (Sigma) en una solución reguladora de unión (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2.5 mM) para 10 min a temperatura ambiente, y luego lavar y resuspender el material celular en la misma solución reguladora. Las células apoptóticas y necróticas se analizaron por citometría de flujo (FACScan, Becton-Dickinson), adquiriendo un promedio de 2×10^4 eventos por muestra, con determinaciones por triplicado en tres experimentos separados.

Los efectos de C, CS, GEM y MMC, tomados individualmente, sobre el crecimiento de HT-1376, se evaluaron 48 y 72 h después del inicio del tratamiento. Todos los productos causaron inhibición del crecimiento dependiente del tiempo y la dosis. Después de 72 h, a la concentración de 12 mg/mL, la IC₅₀ fue de 2 mg/mL para C, 12 mg/mL para CS, 18 µg/mL para MMC y 0.5 µg/mL para GEM. A dichas concentraciones, el efecto citotóxico fue moderado, y el crecimiento celular se reanudó si el producto de prueba se eliminó del medio.

El efecto sinérgico de la combinación polisacárido-antitumoral sobre la inhibición del crecimiento de HT-1376 se evaluó sobre la base de estos resultados. En particular, se estudió la inhibición del crecimiento inducida por diferentes concentraciones de C o CS combinada con MMC o GEM después de 72 h, usando Calcsyn como software de análisis de datos. La asociación de C o CS con MMC es fuertemente sinérgica cuando se usa un exceso de polisacárido sobre MMC, con valores de IC₅₀ de 0.1 y 0.4 para C y CS respectivamente, lo que indica que el efecto sinérgico de C es mejor que el de CS. Se observó un comportamiento diferente cuando C o CS se combinaron con GEM; en este caso, hubo una interacción sinérgica cuando se usó un exceso de GEM sobre el polisacárido. Operando en proporciones que dan una interacción sinérgica (menos polisacárido que antitumoral), se obtuvieron valores de IC₅₀ de 0.2 y 0.7 para C y CS respectivamente, confirmando una vez más que el efecto sinérgico de C es mejor que el de CS.

La combinación sinérgica de C o CS y GEM se caracterizó por un importante efecto apoptótico que no se observó cuando los ingredientes activos se usaron individualmente, como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14 - Estado celular, evaluado con clasificador celular, de células HT-1376 tratadas durante 48 h con 0.04 µg/mL de C o CS y 0.15 µg/mL de GEM, solo o en una combinación de polisacárido-GEM.

Tratamiento	Estado de la célula			
	viable	necrótica	apoptótica	
			temprana	avanzada
Sin tratar	91±3	5±1	1±1	3±1
C	59±2	28±3	6±1	7±2
CS	68±4	23±2	4±1	5±1
GEM	81±3	16±3	1±1	2±1
C+GEM	16±2	30±2	9±2	45±6
CS+GEM	29±2	27±4	8±1	36±5

Se observó un comportamiento diferente en el caso de combinaciones sinérgicas de C o CS con MMC (exceso de polisacárido a antitumoral). En este caso, como se muestra en la tabla 15, la combinación polisacárido-antitumoral condujo a una necrosis celular extensa, que fue mayor en el caso de la combinación sinérgica C-MMC.

Tabla 15 - Estado celular, evaluado con clasificador celular, de células HT-1376 tratadas durante 48 h con 5.7 µg/mL de C o CS y 1.7 µg/mL de MMC, solo o en una combinación de polisacárido-MMC.

Tratamiento	Estado de la célula			
	viable	necrótica	apoptótica	
			temprana	avanzada
Sin tratar	90±4	7±1	1±1	2±1

C	56±3	41±2	1±1	2±1
CS	62±4	36±2	1±1	1±1
MMC	64±5	33±1	1±1	2±1
C+MMC	36±2	62±3	1±1	1±1
CS+MMC	46±1	51±2	1±1	2±1

El ensayo en su conjunto demuestra que: a) la combinación de antitumoral y C o CS tiene un fuerte efecto sobre la inhibición del crecimiento de células tumorales; b) las condiciones sinérgicas difieren, dependiendo del antitumoral usado; c) el sinergismo polisacárido-GEM conduce principalmente a las células que sufren apoptosis, mientras que el sinergismo polisacárido MMC conduce a las células que sufren necrosis; d) los efectos sinérgicos de C son significativamente mayores que los de CS; e) las asociaciones sinérgicas de C con GEM o MMC pueden representar un enfoque terapéutico prometedor en el campo de los tumores superficiales de vejiga.

Ejemplo 16 - Viscosuplementación y reparación de cartílago

El objetivo del estudio fue evaluar el potencial terapéutico de la combinación de ácido hialurónico y condroitina (HA-C) en la enfermedad de las articulaciones asociada con el daño al componente cartilaginoso de la articulación. El estudio se llevó a cabo en 30 voluntarios que sufrían deterioro severo de la articulación de la rodilla, con daño en el componente cartilaginoso, síntomas inflamatorios en curso evidentes, hinchazón y dolor. Los voluntarios, con edades entre 25 y 45 años, de ambos sexos, fueron asignados al azar en tres grupos de 10; el grupo de control se trató con solución salina, el grupo HA con ácido hialurónico y el grupo HA-C con una mezcla de ácido hialurónico y condroitina.

El tratamiento de viscosuplementación se realizó 3 veces a intervalos de 2 meses inyectando en la articulación 2 mL de una solución estéril, libre de pirógenos, que consiste en una solución salina (0.9% de NaCl) para el grupo de control, una solución de 20 mg/mL de ácido hialurónico 1,200 KDa para el grupo HA y una solución de 20 mg/mL de ácido hialurónico 1,200 KDa + 20 mg/mL de condroitina para el grupo HA-C. Antes y al final del estudio de 6 meses, los voluntarios se sometieron a una radiografía y una resonancia magnética de la articulación. Tres cirujanos ortopédicos evaluaron de forma independiente el desarrollo de los síntomas patológicos (dolor, estado inflamatorio e hinchazón) y la reparación del daño del cartílago a lo largo del tiempo (antes del tratamiento y después de 3 y 6 meses), en una escala de 1 a 5 (donde 1 representa la ausencia de cicatrización, y 5 indica la remisión total de los síntomas patológicos y la reparación completa del daño al tejido cartilaginoso). La tabla 16 muestra los datos finales del estudio. Dichos datos demuestran que, en los tratamientos de viscosuplementación con daño del cartílago, la presencia de condroitina conduce a un excelente nivel de reparación del componente cartilaginoso de la articulación y una mejora general de los síntomas patológicos a lo largo del tiempo.

Tabla 16 - El tratamiento de viscosuplementación se realizó 3 veces a intervalos de 2 meses inyectando en la articulación 2 mL de una solución estéril, libre de pirógenos, que consiste en una solución salina (0.9% de NaCl) para el grupo de control, 20 mg/mL solución de ácido hialurónico 1,200 KDa para el grupo HA y 20 mg/mL de solución de ácido hialurónico 1,200 KDa + 20 mg/mL de condroitina para el grupo HA-C. Tres cirujanos ortopédicos evaluaron de forma independiente el desarrollo de los síntomas patológicos (dolor, estado inflamatorio e hinchazón) y la reparación del daño del cartilago a lo largo del tiempo (antes del tratamiento y después de 3 y 6 meses), en una escala de 1 a 5 (donde 1 representa la ausencia de cicatrización, y 5 indica la remisión total de los síntomas patológicos y la reparación completa del daño al tejido cartilaginoso). Los valores reportados son el promedio de las 3 evaluaciones independientes.

Grupo	Dolor		Inflamación			Hinchazón			Reparación del cartilago			
	Meses											
	0	3	6	0	3	6	0	3	6	0	3	6
Control	1.0±0.1	1.3±0.2	1.3±0.1	1.5±0.2	1.0±0.2	1.4±0.1	1.5±0.2	1.0±0.1	1.8±0.2	1.0±0.1	1.5±0.2	1.6±0.1
HA	1.6±0.2	3.1±0.4	4.0±0.3	1.3±0.2	3.1±0.2	4.1±0.5	1.2±0.1	3.1±0.3	4.20.5	1.0±0.1	1.5±0.2	1.4±0.3
HA-C	1.5±0.1	3.5±0.4	5.0±0.0	1.6±0.2	4.1±0.4	5.0±0.0	1.4±0.2	4.2±0.2	5.0±0.0	1.1±0.1	3.2±0.5	5.0±0.0

Ejemplo 17 - Condroitina en el tratamiento de la cistitis intersticial

- Se reclutaron 10 mujeres de entre 35 y 60 años, con un diagnóstico confirmado de cistitis intersticial no ulcerosa basada en parámetros urodinámicos, clínicos y endoscópicos, esta última con la presencia de petequias hemorrágicas en la cistoscopia con distensión vesical, para el estudio. Los sujetos fueron asignados al azar en 2 grupos de 5 individuos; el primer grupo se trató por instilación en la vejiga a través de un catéter de una solución (40 mL) que contenía 40 mg de ácido hialurónico MW 1.800 KDa (HA) y 40 mg de sulfato de condroitina (CS), y el segundo con una solución (40 mL) que contiene 40 mg de ácido hialurónico MW 1.800 KDa (HA) y 40 mg de condroitina (C). Este tratamiento se repitió semanalmente durante 6 semanas y luego mensualmente durante 5 meses más. Al inicio del tratamiento y al final del estudio, se realizó una cistoscopia con distensión de la vejiga para verificar el estado del tejido epitelial y se tomó una biopsia de la pared de la vejiga para establecer el estado inflamatorio. Antes y 2, 5 y 7 meses después del tratamiento, el urólogo relleno un formulario clínico, de acuerdo con el paciente, para cuantificar la urodinámica (urgencia, frecuencia y nicturia) y la presencia de escozor y dolor en la vejiga. Todos los parámetros se evaluaron en una escala de 0 a 6, donde 0 indica la ausencia de síntomas patológicos. En la tabla 17 se muestran los datos obtenidos.
- La comparación de la cistoscopia con la distensión vesical realizada antes y después del tratamiento demostró una mejor resolución general de la condición patológica de los pacientes en el grupo HA-C que en el grupo HA-CS, un hallazgo que fue confirmado por la evaluación histológica de las biopsias de la pared de la vejiga, que demostró una mejor resolución del procedimiento inflamatorio en el grupo HA-C que el grupo HA-CS. Los datos clínicos reportados en la tabla 11 también son consistentes con esta evaluación, demostrando una resolución más completa y rápida de los síntomas patológicos para el grupo HA-C en términos urodinámicos y con respecto al dolor residual.

Tabla 17: 10 mujeres voluntarias que sufrían de cistitis intersticial no ulcerativa fueron asignadas al azar en 2 grupos de 5 individuos; el primer grupo (HA-C) se trató por instilación en la vejiga, a través de un catéter, de una solución (40 mL) que contenía 40 mg de ácido hialurónico MW 1.800 KDa (HA) y 40 mg de sulfato de condroitina (CS), y el segundo grupo (HA-CS) con una solución (40 mL) que contiene 40 mg de ácido hialurónico MW 1.800 KDa (HA) y 40 mg de condroitina (C). Este tratamiento se repitió semanalmente durante 6 semanas y luego mensualmente durante 5 meses más. Antes y 2, 5 y 7 meses después del tratamiento, el urólogo relleno un formulario clínico, de acuerdo con el paciente, para cuantificar la urodinámica (urgencia, frecuencia y nicturia) y la presencia de escozor y dolor en la vejiga. Todos los parámetros se evaluaron en una escala de 0 a 6, donde 0 indica la ausencia de síntomas patológicos.

Tiempo (meses)	urgencia			frecuencia miccional			nicturia			punzante vejiga			dolor	
	HA-C	HA-CS		HA-C	HA-CS		HA-C	HA-CS		HA-C	HA-CS		HA-C	HA-CS
0	5.7±0.2	5.8±0.3		5.7±0.2	5.9±0.1		5.8±0.2	5.7±0.1		5.9±	5.8±0.2		5.7±0.3	5.7±0.2
2	2.4±0.4	4.4±0.2		2.1±0.3	3.2±0.3		2.0±0.6	3.5±0.3		2.4±0.1	4.3±0.3		1.8±0.2	3.7±0.3
5	1.3±0.1	3.2±0.3		0.9±0.2	2.4±0.4		1.3±0.2	3.1±0.1		0.9±0.1	3.0±0.3		0.7±0.1	2.6±0.1
7	1.1±0.1	2.6±0.3		0.9±0.1	1.9±0.2		1.0±0.1	2.8±0.2		0.5±0.1	2.6±0.2		0.6±0.3	2.1±0.1

Ejemplo 18 - Formulaciones oftálmicas

Se compararon dos preparaciones oftálmicas: una convencional basada en ácido hialurónico y otra basada en condroitina, ambas a la concentración de 3% p/v en solución salina de NaCl a pH 7.4. Las gotas para los ojos se prepararon en envases de dosis única esterilizados en la autoclave.

- 5 El estudio se realizó en 30 voluntarios que padecían ojo seco, a los que se les administraron gotas para los ojos 4 veces al día durante 30 días. Los voluntarios, de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 45 y los 60 años, se asignaron al azar a dos grupos de 15 y se trataron con los dos tipos de gotas para los ojos. Bajo control médico, el estado inflamatorio de la superficie corneal se evaluó al principio y al final del tratamiento, y se registraron las evaluaciones de los pacientes tratados en relación con la tolerabilidad, la duración del efecto de humectación y la alteración visual después de la aplicación. Se usó una escala de 1 a 5 para las evaluaciones clínicas y las evaluaciones de los pacientes, donde 5 representa la resolución óptima de la afección patológica y sus secuelas.

Como se demostró por los resultados experimentales reportados en la tabla 18, las gotas para los ojos basadas en condroitina (C) presentaron los mejores índices de evaluación tanto en la evaluación clínica como en la evaluación subjetiva de los pacientes tratados.

- 15 Tabla 18 - El estudio se realizó en 30 voluntarios de ambos sexos de entre 45 y 60 años, que sufrían de ojo seco. Los voluntarios se asignaron al azar en dos grupos de 15, a los que se administraron gotas para los ojos 4 veces al día durante 30 días. El primer grupo (HA) se trató con gotas para los ojos a base de ácido hialurónico al 3% p/v en solución salina de NaCl a pH 7.4. El segundo grupo (C) se trató con gotas para los ojos en base a condroitina al 3% p/v en solución salina de NaCl a pH 7.4. Las gotas para los ojos se prepararon en un envase de dosis única esterilizado en la autoclave.

Tiempo (días)	Médico		Paciente					
	Inflamación corneal		tolerabilidad		efecto humectante		ausencia de alteración visual	
	HA	C	HA	C	HA	C	HA	C
0	1,0±0,1	1,1±0,2	-	-	-	-	-	-
10	-	-	3,8±0,2	4,7±0,2	4,0±0,2	4,8±0,3	3,5±0,2	4,6±0,2
20	-	-	3,7±0,3	4,5±0,5	4,1±0,3	4,6±0,2	3,2±0,1	4,7±0,1
30	3,5±0,2	4,260,3	3,9±0,3	4,8±0,1	4,4±0,3	4,9±0,1	3,6±0,2	4,8±0,1

- 25 Bajo control médico, se evaluó el estado inflamatorio de la superficie de la córnea al principio y al final del tratamiento, y se registraron las evaluaciones de los pacientes tratados en relación con la tolerabilidad, la duración del efecto de humectación y la alteración visual después de la aplicación. Se usó una escala de 1 a 5 para las evaluaciones clínicas y las evaluaciones de los pacientes, donde 5 representa la resolución óptima de la afección patológica y sus secuelas.

Ejemplo 19 - Efecto protector de la condroitina en soluciones de diálisis intraperitoneal

- 30 El objetivo del estudio fue evaluar el daño peroxidativo en la membrana peritoneal asociado con la presencia de glucosa, condroitina o sulfato de condroitina en los fluidos de diálisis peritoneal. El efecto peroxidativo de los lípidos en el tejido peritoneal después de los tratamientos de diálisis peritoneal repetidos se evaluó usando como modelo experimental ratas Wistar de 8 semanas de edad tratadas con 4 tipos de formulación: a) glucosa 2.5% p/v, sulfato de condroitina MW 20-40 Kda 0.1% p/v, sodio 135.0 mEq/L, magnesio 1.5 mEq/L, calcio 4.0 mEq/L, cloro 105.5 mEq/L, ácido láctico 35.0 mEq/L, pH 7.0-7.3, π solución/ π salina 1.4 -1.6; b) glucosa 2.5% p/v, condroitina MW 20-40 KDa 0.1% p/v, sodio 135.0 mEq/L, magnesio 1.5 mEq/L, calcio 4.0 mEq/L, cloro 105.5 mEq/L, ácido láctico 35.0 mEq/L, pH 7.0-7.3, π solución/ π salina 1.4-1.6; c) sulfato de condroitina MW 20-40 KDa 2.5% p/v, sodio 135.0 mEq/L, magnesio 1.5 mEq/L, calcio 4.0 mEq/L, cloro 105.5 mEq/L, ácido láctico 35.0 mEq/L, pH 7.0-7.3, con la adición de NaCl hasta que la proporción π solución/ π salina estuvo en el intervalo de 1.4-1.6; d) sulfato de condroitina MW 20-40 KDa 2.5% p/v, sodio 135.0 mEq/L, magnesio 1.5 mEq/L, calcio 4.0 mEq/L, cloro 105.5 mEq/L, ácido láctico 35.0 mEq/L, pH 7.0-7.3, con la adición de NaCl hasta que la proporción π solución/ π salina estuvo en el intervalo de 1.4-1.6; se asignaron al azar 40 animales a 4 grupos de 10, y se inyectaron 15 mL de solución en la cavidad peritoneal de cada animal bajo anestesia con éter durante 10 días consecutivos. Al final del estudio, se eliminó el peritoneo de los animales sacrificados y se evaluó cuantitativamente la peroxidación lipídica en el tejido mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA), usando el kit de ensayo OxiSelect TBARS (Cell Biolabs Inc.). La peroxidación lipídica es un mecanismo de daño celular bien conocido. Los peróxidos lipídicos son indicadores inestables de estrés oxidativo de las células que, al descomponerse, forman compuestos reactivos como el malonildialdehído (MDA), el principal

5 marcador de la peroxidación lipídica. El kit usado proporciona un sistema simple y reproducible para analizar la MDA y, por consiguiente, la oxidación de lípidos, en muestras de homogeneizado de tejidos, según la capacidad de la MDA para formar un complejo 1: 2 con ácido tiobarbitúrico (TBARS - Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) que puede ser determinado espectrofotométricamente. El kit contiene un estándar MDA para ser usado como control positivo y para las curvas de calibración. El MDA contenido en las muestras y el estándar MDA se hicieron reaccionar con TBA con una corta incubación a 95 °C, lo que conduce a la formación del complejo TBARS, determinado cuantitativa y espectrofotométricamente por comparación con la curva estándar. Las muestras de tejido peritoneal reciente se lavaron repetidamente con una solución de heparina que contenía PBS para eliminar la hemoglobina, se suspendieron (100 mg/mL) en PBS que contenía una solución 1x de BHT (incluida en el kit para evitar la oxidación adicional de los lípidos durante el procesamiento de muestras), y luego se homogeneizaron en hielo y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos, recogiendo el sobrenadante en el que se analizó el nivel de TBARS. Tomando como 1 el valor de los peróxidos lipídicos/g de tejido en el tratamiento con la solución a) que contiene 2.5% p/v de glucosa y 0.1% p/v de sulfato de condroitina, el valor correspondiente obtenido con la solución b) que contiene 2.5% p/v de glucosa y el 0.1% p/v de condroitina fue de 0.7, mientras que el valor obtenido con la solución c) que contenía el 2.5% p/v de sulfato de condroitina fue de 0.5, y el valor obtenido con la solución d) que contenía el 2.5% p/v de condroitina fue 0.1. Estos datos demuestran que en la diálisis intraperitoneal, la condroitina se puede usar como agente osmótico en lugar de glucosa, con excelentes resultados en términos de protección del tejido peritoneal contra el estrés de la peroxidación lipídica en diálisis sistemática intraperitoneal; sin embargo, un resultado igualmente satisfactorio no se puede obtener usando sulfato de condroitina con características de peso molecular similares.

REIVINDICACIONES

1. Composiciones que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, para uso en la reparación de heridas, para el tratamiento de patologías articulares, oculares, oncológicas, patologías del aparato respiratorio, osteoartritis, cistitis intersticial.
- 5 2. Composiciones que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, para uso en la viscosuplementación articular y la reparación del tejido cartilaginoso en un paciente y para uso en el tratamiento de la enfermedad del ojo seco.
3. Uso no terapéutico de composiciones o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, en el tratamiento de la senescencia cutánea.
- 10 4. Uso de composiciones o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, en la aplicación de lentes de contacto.
5. Uso no terapéutico de composiciones que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, como agente osmótico y protector en soluciones para diálisis intraperitoneal.
- 15 6. Uso *in vitro* de composiciones o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, como andamiaje para el crecimiento de cultivos de células 3D.
7. Uso no terapéutico de composiciones o dispositivos médicos que contienen condroitina no sulfatada, como ingrediente activo, en la biorreavitalización cutánea por medio de microinyecciones intradérmicas.