
Biomarcadores ópticos para el diagnóstico de la osteoartritis utilizando la espectroscopía Raman

Paula Casal Beiroa

Tesis doctoral

2020

Directores: Profesor Francisco Javier Blanco García y la Dra. Joana Cristina Silva Magalhães

Tutor/a: Dra. Joana Cristina Silva Magalhães

Programa de Doctorado en Biotecnología Avanzada



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



El Dr. Francisco Javier Blanco García, Profesor de la Universidad de A Coruña, Especialista en Reumatología en el Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, Director del Grupo de Investigación en Reumatología (GIR) del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y Director Científico del INIBIC, y La Dra. Joana Cristina Silva Magalhães, Investigadora post-doctoral y Coordinadora de la Unidad de Medicina Regenerativa del GIR,

CERTIFICAN:

Que Dña. Paula Casal Beiroa, graduada en Química, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo “Biomarcadores ópticos para el diagnóstico de la osteoartritis utilizando la espectroscopía Raman”. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de doctora en Biotecnología Avanzada.

Fdo. Dra. Joana Cristina Silva Magalhães Fdo. Prof. Francisco Javier Blanco García

Fdo. Paula Casal Beiroa
Doctoranda

A Coruña, 10 de Junio de 2020

A mi madre

*“En cuestiones de ciencia, la autoridad de miles no tiene más valor que el humilde
razonamiento de un único individuo” – Galileo Galilei*

En primer lugar, me gustaría agradecer a todos los donantes, sin los cuales no se podría haber realizado esta Tesis Doctoral.

Seguidamente, quisiera agradecer a mis directores, el Prof. Francisco J. Blanco, y la Dra. Joana Magalhães, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en el Grupo de Investigación en Reumatología bajo su supervisión, y por haberme guiado en todo el proceso.

Gracias al proyecto IBEROS, enmarcado dentro de los Programas Interreg Europa, por haber financiado mi actividad como investigadora durante estos últimos años.

Muchas gracias al Dr. Pío González, coordinador del grupo de Nuevos Materiales de la UVigo, por su orientación en las primeras fases de este proyecto, así como al resto de integrantes de su grupo, Julia, Stefano, Laura, Miriam, Xavi, Fani, Bettiana, Sara... por la buena acogida en cada una de mis visitas en ese tiempo.

De la misma forma, me gustaría agradecer a Ezequiel Vázquez, responsable de la Unidad IR-Raman de la USC, por la formación, el asesoramiento, y por hacer más amenas las horas y horas invertidas en la unidad. También al equipo de la Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística del CHUAC, especialmente a Vanesa Balboa, por su colaboración y estupendo trabajo.

Muchas gracias a todos los compañeros, tanto del CICA como del INIBIC, que me habéis acompañado durante estos años, porque todas vuestras sugerencias y comentarios han contribuido a enriquecer este trabajo. Me gustaría agradecer especialmente a la Dr. Tamara Hermida, por sus buenos consejos, por todo lo que me ha ayudado. Y a la Dra. Elena Fernández Burguera, por estar ahí cuando fue necesario. A las compañeras del Servicio de Histomorfología del GIR, Purificación Filgueira y Noa Goyanes, muchas gracias por vuestra ayuda en transcurso de este trabajo, y por todo lo que me habéis enseñado. A las Dras. Natividad Oreiro y Maite Silva, de la Unidad de Investigación Clínica, por realizar la evaluación radiográfica de los pacientes de este estudio de forma desinteresada. Y cómo no, gracias a mis compañeras del día a día Cris, Paula, More y, aunque por menos tiempo, Carol, Lucía, por ser todo un ejemplo de compañerismo, y hacer más llevaderas tantas horas de trabajo.

Y, por último, y no por ello menos importante, muchas gracias familia, amigos. Por esas buenas palabras, conversaciones y mensajes de apoyo. Por siempre darme ánimos y estar ahí cuando lo necesité. Por entender que por momentos estuviera más ausente y no os dedicara todo el tiempo que merecéis. Cada día que pasa me hacéis darme más cuenta de lo que es realmente importante y por ello... GRACIAS.

Índice

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
LISTADO DE ABREVIATURAS	XIX
RESUMEN	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT	3
1. Introducción.....	7
1.1. Osteoartritis, definición y prevalencia	7
1.1.1. Cartílago articular: principal tejido afectado por la OA	8
1.1.2. Métodos de diagnóstico de severidad y degradación del cartílago	13
1.2. Espectroscopía Raman como herramienta para el diagnóstico	17
1.2.1. Fundamento	17
1.2.2. Datos y análisis del tejido vivo: ventajas y limitaciones.....	20
1.2.3. Aplicación de la Espectroscopía Raman en OA.....	22
1.2.4. Aplicación de la ER en otras enfermedades reumáticas.....	26
1.2.5. Aplicación clínica de la ER en OA	27
2. Hipótesis y justificación.....	31
2.1. Hipótesis.....	31
2.2. Justificación.....	31
3. Objetivos	35
3.1. Objetivo general	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. Material y métodos	39
4.1. Obtención y clasificación radiológica de muestras de cartílago articular.....	39
4.2. Análisis molecular del cartílago articular por espectroscopía Raman.....	41
4.3. Análisis histológico-histoquímico	45

4.3.1.	Inclusión de muestras.....	45
4.3.2.	Tinciones histológicas	45
4.3.3.	Evaluación de degradación de cartílago articular utilizando escala de Mankin modificada.....	48
4.4.	Análisis bioquímico.....	49
4.4.1.	Digestión de tejido para cuantificación de GAGs y colágeno	50
4.4.2.	Cuantificación de GAGs sulfatados	51
4.4.3.	Cuantificación de colágeno total.....	51
4.5.	Análisis estadístico	53
5.	Resultados	59
5.1.	Análisis cualitativo	59
5.1.1.	Caracterización radiológica Grado K-L	59
5.1.2.	Caracterización histológica <i>MS</i>	60
5.1.3.	Caracterización por espectroscopía Raman: análisis cualitativo de cartílago articular procedente de donantes sanos	61
5.1.4.	Caracterización por espectroscopía Raman: análisis cualitativo de cartílago procedentes de donantes sanos y OA, con respecto al grado radiológico K-L.....	63
5.1.5.	Caracterización por espectroscopía Raman: análisis cualitativo de muestras de cartílago procedentes de donantes sanos y OA, con respecto al <i>Mankin Score</i>	71
5.2.	Análisis cuantitativo de los parámetros Raman en cartílago procedente de donantes sanos y artrósicos.....	74
5.2.1.	Análisis cuantitativo de cartílago sano y OA: grado K-L como referencia	74
5.2.2.	Análisis cuantitativo de cartílago sano y OA tomando el Sistema de evaluación Histoquímico-Histomorfológico modificado de Mankin (<i>Mankin Score</i>)	81
5.2.3.	Análisis correlacional.....	91
5.3.	Análisis bioquímico.....	92
5.3.1.	Evaluación de los efectos del láser <i>NIR</i> sobre las muestras.....	92
5.3.3.	Análisis bioquímico de muestras de diferentes rangos de <i>MS</i>	97
5.3.3.	Correlaciones de la cuantificación bioquímica con los parámetros Raman asociados	101

5.4. Identificación de perfiles y establecimiento de un modelo predictivo de severidad de artrosis.....	103
5.4.1. Análisis clúster	103
5.4.2. Modelos de regresión logística: global de las muestras.....	105
5.3.3. Modelos de regresión logística: muestras de cartílago de cabeza femoral .	115
6. Discusión.....	123
6.1. Huella molecular del cartílago articular humano.....	123
6.2. Validación perfil biomarcador frente a escala radiológica (K-L) e histológica (MS)	125
6.3. Análisis bioquímico	132
6.4. Identificación de perfiles y modelos predictivos.....	135
7. Conclusiones	143
8. Bibliografía	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales componentes del cartílago articular hialino (Adaptada de Han <i>et al.</i> , 2011)	8
Figura 2. Distribución de los condrocitos, colágeno de tipo II (Col II) y agregano (AG) en las distintas capas del cartílago articular (Adaptada de Burguera <i>et al.</i> , 2016)	10
Figura 3. Principales cambios estructurales y morfológicos producidos durante el progreso de la OA en el cartílago y hueso subcondral (Adaptada de Bay-Jensen <i>et al.</i> , 2010).	12
Figura 4. Comparación de la anatomía de una rodilla sana (izda) con una rodilla artrósica (dcha) (Adaptada de Yuan <i>et al.</i> , 2014).	13
Figura 5. Técnicas usadas comúnmente para evaluar la severidad articular (Grado K-L y MOAKS) y la degradación del cartílago (<i>Mankin Score</i>). Adaptada de Casal-Beiroa <i>et al.</i> 2020a ..	14
Figura 6. Imágenes representativas de radiografías correspondientes a los diferentes grados de severidad de OA en función del grado K-L (Adaptada de Antony <i>et al.</i> , 2016)	16
Figura 7. Ejemplos de modos vibracionales en estructuras moleculares lineales (molécula CO ₂) y trigonales planas (grupo =CH ₂ orgánico).....	18
Figura 8. Esquema ilustrativo del efecto Raman en una muestra irradiada (Adaptada de Aguiar <i>et al.</i> , 2015).	18
Figura 9. Diagrama del proceso de obtención de biomarcadores ópticos por ER.	22
Figura 10. Huella molecular de cartílago articular humano por ER. Espectro obtenido con un láser de Nd:Yag ($\lambda=1064$ nm) (Adaptada de Casal-Beiroa <i>et al.</i> , 2020b).....	23
Figura 11. Procesamiento de muestras procedentes de cartílago articular humano. A: cabeza femoral procedente de un donante sano; B: cabeza femoral procedente de un paciente artrósico; C: rodilla procedente de donante un artrósico (platillo tibial a la izquierda y fragmentos de cóndilo femoral a la derecha). En cada articulación o región anatómica, se identifica la zona lesionada en rojo y el tejido intacto adyacente en negro. En la parte superior derecha de c) se representa un explante de cartílago con 6 mm de diámetro.	39
Figura 12. Equipo de espectrometría Raman confocal WITec ALPHA300R+ utilizado en este estudio.....	41

Figura 13. Solapamientos de bandas. Imágenes extraídas del software Magic Plot, donde el eje X (A) indica el desplazamiento al que aparecen las bandas, y el eje Y (B) la intensidad de la señal. Cada curva de color representa un desplazamiento en función de su distribución gaussiana. La línea roja discontinua se corresponde con el sumatorio ajustado al perfil del espectro..... 42

Figura 14. Esquema resumen de la metodología empleada en el análisis bioquímico..... 49

Figura 15. Esquema de la metodología empleada para determinar los efectos del láser *NIR* (785 nm) en cartílago..... 50

Figura 16. Recta de calibrado para la cuantificación de GAGs. El eje X representa la cantidad de GAGs (μg) y el eje Y las correspondientes medidas de absorbancia (ABS). 51

Figura 17. Recta de calibrado para la cuantificación de *Hyp*. El eje X representa la cantidad de *Hyp* (μg) y el eje Y las correspondientes medidas de absorbancia (ABS). 52

Figura 18. Cuantificación de *Hyp*, antes y después de la reacción. 53

Figura 19. Imágenes radiográficas representativas de cabeza femoral utilizadas para la graduación de severidad de OA según escala Kellgren-Lawrence (K-L 0 a IV). 59

Figura 20. Imágenes radiográficas representativas de rodilla utilizadas para la graduación de severidad de OA según escala Kellgren-Lawrence (K-L 0 a IV)..... 60

Figura 21. Tinciones realizadas para la evaluación del Mankin Score modificado: Hematoxilina-Eosina (H-E), Safranina-O/Verde Rápido (SO/VR) y Azul de Toluidina (AT) con respecto a los diferentes rangos de degradación (*MS* total: 0-2 a 12+) (Escala: 200 μm). .. 61

Figura 22. Espectro Raman de cartílago articular procedente de cabeza femoral de donantes sanos. Espectro realizado con un láser *NIR* $\lambda=785$ nm, 50 mW, 120 acumulaciones. 62

Figura 23. Espectros Raman de cartílago articular procedentes de cabeza femoral de donantes que presentan diferentes grados radiológicos de Kellgren-Lawrence (K-L: 0-IV). 64

Figura 24. Deconvolución de bandas en la región 910-990 cm^{-1} . Izq: cartílago sano (K-L 0, cabeza femoral); dcha: cartílago OA avanzada (K-L IV, cabeza femoral). 64

Figura 25. Deconvolución de bandas en la región 1060-1100 cm^{-1} . Izq: cartílago sano (K-L 0, cabeza femoral); dcha: cartílago OA avanzada (K-L IV, cabeza femoral). 65

- Figura 26. Deconvolución de bandas en la región 1020-1055 cm^{-1} . Izq: cartílago sano (K-L 0, cabeza femoral); dcha: cartílago OA avanzada (K-L III, cabeza femoral)..... 66
- Figura 27. Espectros Raman de cartílago articular procedentes de cóndilo femoral de donantes que presentan diferentes grados radiológicos de Kellgren-Lawrence (K-L: I-IV). 67
- Figura 28. Deconvolución de bandas en la región 1200-1300 cm^{-1} . Izq: cartílago sano (K-L 0, cabeza femoral); dcha: cartílago OA avanzado (K-L IV, cóndilo femoral). 67
- Figura 29. Espectros Raman de cartílago articular de platillo tibial de diferentes de donantes que presentan diferentes grados radiológicos de Kellgren-Lawrence (K-L: I-IV). 68
- Figura 30. Deconvolución de bandas en la región 1500-1750 cm^{-1} . Izq: muestra de cartílago (K-L I, cóndilo femoral); dcha: muestra OA avanzado (K-L IV, cóndilo femoral)..... 68
- Figura 31. Tinciones de Rojo Alizarina, a diferentes aumentos, de muestras de cartílago procedentes de diferentes zonas anatómicas, cuyo espectro Raman presenta un perfil mineralizado, tomando como control negativo una muestra sana (K-L 0) con ausencia de bandas de mineralización. De izq. a dcha., tejido de cabeza femoral K-L 0 y IV, cóndilo femoral K-L I y IV, y platillo tibial K-L I y IV cuyos espectros presentan un perfil mineralizado. 70
- Figura 32. Tinciones de Von Kossa, a diferentes aumentos, de muestras de cartílago procedentes de diferentes zonas anatómicas, cuyo espectro Raman presenta un perfil mineralizado, tomando como control negativo una muestra sana (K-L 0) con ausencia de bandas de mineralización. De izq. a dcha., tejido de cabeza femoral K-L 0 y IV, cóndilo femoral K-L I y IV, y platillo tibial K-L I y IV cuyos espectros presentan un perfil mineralizado. 70
- Figura 33. Espectros Raman de cartílago articular procedente de cabeza femoral de donantes sanos y artrósicos, en función de diferentes rangos de degradación establecidos para la escala Histológica-Histoquímica de Mankin Score modificada (*MS* total: 0-2 a 12 o superior). 71
- Figura 34. Espectros Raman de cartílago articular procedente de cóndilo femoral de donantes sanos y artrósicos, en función de diferentes rangos de degradación establecidos para la escala Histológica-Histoquímica de Mankin Score modificada (*MS* total: 0-2 a 12 o superior). 72

Figura 35. Espectros Raman de cartílago articular procedente de platillo tibial de donantes sanos y artrósicos, en función de diferentes rangos de degradación establecidos para la escala Histológica-Histoquímica de Mankin Score modificada (*MS* total: 0-2 a 12 o superior).
 73

Figura 36. Ratio de señales correspondientes a los parámetros Raman respecto al grado K-L para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado procedentes de cabeza femoral de donantes sanos y OA. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ 76

Figura 37. Ratio SGAGs ($1063/1004 \text{ cm}^{-1}$) respecto al grado K-L para el conjunto de muestras de cartílago intacto adyacente procedente de la cabeza femoral sana y OA. * $p < 0,05$ 78

Figura 38. Resultados cuantitativos de los parámetros Raman respecto al *MS* total para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado de cabeza femoral. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. 83

Figura 39. Resultados cuantitativos de los parámetros Raman respecto al *MS-SI* para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado de cabeza femoral. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. 85

Figura 40. Resultados cuantitativos de los parámetros Raman respecto al *MS-SII* para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado de cabeza femoral. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. 87

Figura 41. Resultados cuantitativos de los parámetros Raman respecto al *MS-SIII* para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado de cabeza femoral. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$. 88

Figura 42. Tinciones histológicas (hematoxilina-eosina (H-E), safranina-O/verde rápido (SO/VR) y azul de toluidina (AT)) realizada para muestras control (sin exposición a láser, $n=3$) y muestras después de la exposición al láser *NIR* ($\lambda=785 \text{ nm}$, potencia 50 mW, 120 acumulaciones/s, $n=3$) durante 10 minutos. 93

Figura 43. Cuantificación de SGAGs para muestras control (sin exposición a láser, $n=3$) y muestras después de la exposición al láser *NIR* ($\lambda=785 \text{ nm}$, potencia 50 mW, 120 acumulaciones/s, $n=3$) durante 10 minutos. No se encontraron diferencias significativas.. 93

Figura 44. Cuantificación de *Hyp* para muestras control (sin exposición a láser, $n=3$) y muestras después de la exposición al láser *NIR* ($\lambda=785 \text{ nm}$, potencia 50 mW, 120 acumulaciones/s, $n=3$) durante 10 minutos. No se encontraron diferencias significativas.. 93

Figura 45. Análisis cuantitativo respecto al grado K-L. A: del contenido de GAGs sulfatados respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico (SGAGs, TGAGs y PGs).....	94
Figura 46. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados con el grado K-L: resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.).....	95
Figura 47. Análisis cuantitativo respecto al grado K-L. A: del contenido de Hyp respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico (CoID/F y H/Col).....	95
Figura 48. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de <i>Hyp</i> con el grado K-L: resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.).....	96
Figura 49. Análisis cuantitativo respecto al <i>MS</i> . A: del contenido de GAGs sulfatados respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico (SGAGs, TGAGs y PGs).....	97
Figura 50. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados con el <i>MS</i> : resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.).....	98
Figura 51. Análisis cuantitativo respecto al <i>MS-SIII</i> . A: del contenido de GAGs sulfatados respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico (SGAGs, TGAGs y PGs).....	98
Figura 52. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados con el <i>MS-SIII</i> : resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.).....	99
Figura 53. Análisis cuantitativo respecto al <i>MS</i> . A: del contenido de <i>Hyp</i> respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico (CoID/F y H/Col).	100
Figura 54. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de <i>Hyp</i> con el <i>MS</i> : resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.).....	100
Figura 55. Correlaciones obtenidas entre los parámetros SGAGs (izq.), TGAGs (centro) y PGs (dcha.) con la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados normalizados tanto	

respecto al peso húmedo como peso seco. Las gráficas muestran el valor del coeficiente rho de Spearman (r). Se considera que la correlación es estadísticamente significativa cuando $p < 0,5$ 101

Figura 56. Correlaciones obtenidas entre los parámetros ColD/F (izq.) y H/Col (dcha.) con la cuantificación bioquímica de *Hyp* normalizada tanto respecto al peso húmedo como peso seco. Las gráficas muestran el valor del coeficiente rho de Spearman (r). Se considera que la correlación es estadísticamente significativa cuando $p < 0,5$ 102

Figura 57. Curva ROC del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, en función de los parámetros Raman como variables continuas, tomando como variable respuesta el grado K-L. 106

Figura 58. Nomograma resultado del modelo predictivo de severidad de OA tomando como variable respuesta el grado K-L. De la barra correspondiente se extrae, para cada parámetro Raman, una puntuación equivalente en la escala superior (“Puntuación”). La suma de las 3 puntuaciones equivale a una mayor o menor probabilidad de las muestras analizadas a pertenecer a una clasificación de grado K-L III-IV en la escala inferior (“Puntuación total” vs “Riesgo de K-L III-IV”). 107

Figura 59. Curva ROC del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras obtenida en función de los parámetros Raman como variables codificadas, tomando como variable respuesta el grado K-L. 108

Figura 60. Nomograma resultado del modelo predictivo de severidad de OA a partir de parámetros Raman como variables codificadas, tomando como variable respuesta el grado K-L. La figura detalla la puntuación de cada condición (SGAGs < 0,0875; ColD/F > 1,7280 y GMF > 0,4289) según el punto de corte de cada parámetro. 109

Figura 61. Curva ROC del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, en función de los parámetros Raman como variables continuas, tomando como variable respuesta la escala MS. 111

Figura 62. Nomograma resultado del modelo predictivo de severidad de OA tomando como variable respuesta la escala MS. De la barra correspondiente se extrae, para cada parámetro Raman, una puntuación equivalente en la escala superior (“Puntuación”). La suma de las 3 puntuaciones equivale a una mayor o menor probabilidad de las muestras analizadas a pertenecer a una clasificación de MS 9-13 en la escala inferior (“Puntuación total” vs “Riesgo de MS 9-13”). 112

Figura 63. Curva <i>ROC</i> del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras obtenida en función de los parámetros Raman codificados, tomando como variable respuesta el grado <i>MS</i>	113
Figura 64. Nomograma resultado del modelo predictivo de severidad de OA a partir de variables codificadas, tomando como variable respuesta el <i>MS</i> . La figura detalla los valores en puntos de cada condición según el punto de corte de cada parámetro.....	114
Figura 65. Curvas <i>ROC</i> de los modelos para muestras de cartílago de cabeza femoral tomando como variable respuesta el grado K-L. A: modelo de variables continuas. B: modelo de variables codificadas.	117
Figura 66. Curvas <i>ROC</i> de los modelos para muestras de cartílago de cabeza femoral tomando como variable respuesta el <i>MS</i> . A: modelo de variables continuas. B: modelo de variables codificadas.	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales limitaciones del análisis del tejido vivo por ER y adaptaciones para minimizar sus efectos.	21
Tabla 2. Principales bandas Raman presentes en el cartílago articular hialino y sus correspondientes asignaciones	24
Tabla 3. Estudios realizados por espectroscopía Raman para la caracterización de cartílago articular humano OA.....	26
Tabla 4. Escala K-L de clasificación del grado radiológico de OA (Kellgren y Lawrence, 1957)	40
Tabla 5. Descripción global de los pacientes que forman parte del estudio	41
Tabla 6. Propuesta de biomarcadores ópticos de la composición del cartílago artrósico a partir de la espectroscopía Raman	44
Tabla 7. Escala de Mankin modificada (Pascual Garrido <i>et al.</i> , 2009)	48
Tabla 8. Principales asignaciones de las señales obtenidas en el espectro de cartílago procedente de la cabeza femoral de donantes sanos.	63
Tabla 9. Señales encontradas en cartílago procedente de donantes OA.....	69
Tabla 10. Tamaño muestral del estudio cuantitativo de los parámetros Raman respecto al grado K-L.....	74
Tabla 11. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cabeza femoral procedentes de donantes sanos y OA. Hipótesis nula: La distribución del parámetro es la misma entre los diferentes grados K-L.	75
Tabla 12. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartílago OA intacto y adyacente en muestras de cabeza femoral. Hipótesis nula: La distribución del parámetro es la misma entre los diferentes grados K-L.....	77
Tabla 13. Análisis estadístico de las diferencias entre los parámetros Raman en tejido lesionado y el intacto adyacente (Ad) procedente de la cabeza femoral. Valores p de la prueba de Mann-Whitney.	78

Tabla 14. Valores medios y desviaciones estándar para los parámetros Raman descritos, obtenidos en cartílago de cóndilo femoral, tomando como referencia la escala K-L. 79

Tabla 15. Valores medios y desviaciones estándar para los parámetros Raman descritos, obtenidos en cartílago de platillo tibial, tomando como referencia la escala K-L..... 79

Tabla 16. Análisis estadístico de las diferencias entre los parámetros Raman en tejido lesionado y el intacto adyacente (Ad) de cóndilo femoral. Resultados de los valores p de la prueba de Mann-Whitney. 80

Tabla 17. Análisis estadístico de las diferencias entre los parámetros Raman en tejido lesionado y el intacto adyacente (Ad) de platillo tibial. Resultados de los valores p de la prueba de Mann-Whitney. 80

Tabla 18. Resultados de la prueba de Krustal-Wallis para detectar diferencias en los parámetros entre las muestras de cartílago articular de cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial, tomando como referencia la escala K-L..... 80

Tabla 19. Tamaño muestral del estudio cuantitativo de los parámetros Raman respecto a la escala *MS* y sus diferentes subcategorías..... 81

Tabla 20. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartílago sano y OA de cadera respecto al *MS* total. Hipótesis nula: la distribución del parámetro es la misma entre las distintas categorías de *MS* total..... 82

Tabla 21. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartílago sano y OA de cóndilo femoral respecto al *MS-SI*. Hipótesis nula: la distribución del parámetro es la misma entre las distintas categorías de *MS-SI*. 84

Tabla 22. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartílago sano y OA de cadera respecto al *MS-SII*. Hipótesis nula: la distribución del parámetro es la misma entre las distintas categorías de *MS-SII*..... 86

Tabla 23. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartílago sano y OA de cadera respecto al *MS-SIII*. Hipótesis nula: la distribución del parámetro es la misma entre las distintas categorías de *MS-SIII*..... 88

Tabla 24. Valores medios y desviaciones estándar para los parámetros Raman descritos, obtenidos en cartílago de cóndilo femoral, tomando como referencia la escala de *MS*..... 89

Tabla 25. Valores medios y desviaciones estándar para los parámetros Raman descritos, obtenidos en cartílago de platillo tibial, tomando como referencia la escala <i>MS</i>	90
Tabla 26. Resultados de la prueba de Krustal-Wallis para detectar diferencias estadísticamente significativas en los parámetros entre las muestras de cartílago articular de cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial, tomando como referencia la escala <i>MS</i>	90
Tabla 27. Análisis de las correlaciones (coeficiente rho de Spearman) entre los parámetros Raman de cartílago de cabeza femoral con respecto al grado K-L, <i>MS</i> total y <i>subscores</i> . 91	
Tabla 28. Resultados cuantitativos de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados, colágeno total y contenido de agua de los diferentes grados K-L.	96
Tabla 29. Resultados cuantitativos de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados, colágeno total y contenido de agua de los diferentes rangos de <i>MS</i>	101
Tabla 30. Análisis de las correlaciones (coeficiente rho de Spearman) entre los parámetros Raman de cartílago de cabeza femoral con respecto al grado K-L, <i>MS</i> total y <i>subscores</i>	102
Tabla 31. Análisis de las correlaciones (coeficiente rho de Spearman) entre los parámetros Raman de cartílago de cabeza femoral con respecto al grado K-L, <i>MS</i> total y <i>subscores</i>	103
Tabla 32. Perfiles encontrados mediante el análisis clúster por el método k-medias en el global de muestras de cartílago articular.	104
Tabla 33. Valores medios finales de cada perfil derivados del análisis clúster por el método k-medias en el global de muestras de cartílago articular.	104
Tabla 34. Perfiles encontrados mediante el análisis clúster por el método k-medias en cartílago de cabeza femoral.....	104
Tabla 35. Valores medios finales de cada perfil derivados del análisis clúster por el método k-medias en cartílago de cabeza femoral.	105
Tabla 36. Resultados del modelo predictivo mediante modelos multivariados de regresión logística: <i>odds ratio</i> (<i>OR</i>), valores p e intervalos de confianza (<i>IC</i>), para el global de muestras tomando como variable respuesta el grado K-L.....	105

Tabla 37. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, obtenidos a partir de los parámetros Raman como variables continuas, tomando como variable respuesta el grado K-L..... 106

Tabla 38. Resultados del modelo predictivo a partir de los puntos de corte obtenidos mediante modelos multivariados de regresión logística: punto de corte, *odds ratio* (*OR*), valores p e intervalos de confianza (*IC*), para el global de muestras tomando como variable respuesta el grado K-L. 108

Tabla 39. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad, especificidad, VPN, VPP del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, obtenidos a partir de los parámetros Raman como variables codificadas, tomando como variable respuesta el grado K-L..... 109

Tabla 40. Puntuación total y probabilidad de OA severa (K-L III-IV) obtenida según el modelo predictivo para las diferentes permutaciones de las condiciones de cada parámetro. 110

Tabla 41. Resultados del modelo predictivo mediante modelos multivariados de regresión logística: *odds ratio* (*OR*), valores p e intervalos de confianza (*IC*) para el global de muestras, tomando como variable respuesta la escala *MS*..... 111

Tabla 42. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, obtenidos a partir de los parámetros Raman continuos, tomando como variable respuesta la escala *MS*. .. 112

Tabla 43. Resultados del modelo predictivo a partir de los puntos de corte obtenidos mediante modelos multivariados de regresión logística: puntos de corte, *odds ratio* (*OR*), valores p e intervalos de confianza, para el global de muestras tomando como variable respuesta la escala *MS*. 113

Tabla 44. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, obtenidos a partir de los parámetros Raman codificados, tomando como variable respuesta la escala *MS*. 114

Tabla 45. Puntuación total y probabilidad de degradación de cartílago severa (*MS* 9-13) obtenida según el modelo predictivo para las diferentes permutaciones de las condiciones de cada parámetro. 115

Tabla 46. Resultados del modelo predictivo mediante modelos multivariados de regresión logística para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral: <i>odds ratio</i> (OR), valores p e intervalos de confianza (IC), tomando como variable respuesta el grado K-L.	116
Tabla 47. Estimación e intervalos de confianza del <i>AUC</i> , sensibilidad y especificidad del modelo predictivo de severidad OA a partir de variables continuas para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral, obtenidos a partir de los parámetros Raman como variables continuas tomando como variable respuesta el grado K-L.....	116
Tabla 48. Resultados obtenidos al aplicar el modelo de variables codificadas obtenido mediante el global de muestras al subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral: <i>odds ratio</i> (OR), valores p e intervalos de confianza, muestras tomando como variable respuesta el grado K-L.	117
Tabla 49. Estimación e intervalos de confianza del <i>AUC</i> , sensibilidad y especificidad del modelo predictivo de severidad OA a partir de variables codificadas para el subconjunto de muestras de cartílago de cadera femoral, tomando como variable respuesta el grado K-L.	117
Tabla 50. Comparación estadística de los valores <i>AUC</i> de las curvas <i>ROC</i> de los modelos obtenidos a partir de la muestra global y del subconjunto de cabeza femoral, tomando la variable K-L como variable respuesta.	118
Tabla 51. Resultados del modelo predictivo mediante modelos multivariados de regresión logística para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral: <i>odds ratio</i> (OR), valores p e intervalos de confianza (IC), para el global de muestras tomando como variable respuesta la escala <i>MS</i>	118
Tabla 52. Estimación e intervalos de confianza del <i>AUC</i> , sensibilidad y especificidad del modelo predictivo de severidad OA, obtenidos a partir de variables continuas para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral, tomando como variable respuesta el grado <i>MS</i>	119
Tabla 53. Resultados obtenidos al aplicar el modelo de variables codificadas obtenido mediante el global de muestras al subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral: <i>odds ratio</i> (OR), valores p e intervalos de confianza (IC), muestras tomando como variable respuesta la escala <i>MS</i>	119

Tabla 54. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad y especificidad del modelo predictivo de severidad OA obtenido a partir de variables codificadas para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral, tomando como variable respuesta el grado *MS*. 120

Tabla 55. Comparación estadística de los valores *AUC* de las curvas *ROC* de los modelos obtenidos a partir de la muestra global y del subconjunto de cabeza femoral. tomando la variable *MS* como variable respuesta. 120

LISTADO DE ABREVIATURAS

A - área	ER – espectroscopía Raman
ABS - Absorbancia	EE. UU – Estados Unidos
ACR – <i>American College Rheumatology</i>	GAGs – Glucosaminoglicanos
ACL – Ligamento cruzado anterior	Gly – Glicina
AG – agrecano	GMC – Grado de mineralización por carbonato
AINEs – antiinflamatorios no esteroideos	GMF – Grado de mineralización por fosfato
AH – ácido hialurónico	C/H – relación Hueso/Colágeno
AT – Azul de Toluidina	H-E – Hematoxilina-Eosina
AUC – área bajo la curva (siglas del inglés <i>Area under curve</i>)	Hyp - hidroxiprolina
BCP – fosfato cálcico básico (siglas del inglés <i>Basic calcium phosphate</i>)	IMC – Índice de Masa Corporal
C/H – relación Cartílago/Hueso	ICRS - <i>International Cartilage Repair Society</i>
CAEIG – Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia	IL – índice lipídico indirecto
CHUAC – Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña	IL-1β – interleuquina 1 β
Col – colágeno	IR – Infrarrojo
ColID/F – colágeno defectivo/funcional	IT – Ingeniería de tejidos
Col-II – colágeno de tipo II	K-L - Kellgren-Lawrence
CPP – Pirofosfato cálcico	M - Mujer
CPPD – pirofosfato cálcico dihidratado	MEC – Matriz extracelular
CS – condroitín sulfato o sulfato de condroitina	MMPs - Metaloproteasas
DE – desviación estándar	MOAKS - <i>Magnetic Resonance Imaging OsteoArthritis Knee Score</i>
DMAB - dimetilaminobenzaldehído	MS – <i>Mankin Score</i>
DMOADs – <i>Disease-Modifying Osteoarthritis Drugs</i>	MSU – cristales de urato monosódico
EPISER – Estudio Epidemiológico de la Sociedad Española de Reumatología	n – número de muestra
	N.D. – no descrito

Nd:YAG – *Neodymium-doped yttrium aluminium garnet*

NIR – *Near Infrared*

NO – monóxido de nitrógeno

OA – Osteoartritis, artrosis

OR – *odds ratio*

p.h. – peso húmedo

p.s. – peso seco

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PCA – Análisis de componentes principales

PGs – Proteoglicanos

PMMA - polimetilmetacrilato

Pro – prolina

RA – Rojo Alizarina

RM – Resonancia Magnética

ROC – Receiver Operating Characteristic

S/R – relación señal/ruido

SI – *subscore I*

SII – *subscore II*

SIII – *subscore III*

sGAGs – GAGs sulfatados

SGAGs – GAGs sulfatados (parámetro Raman)

SF – líquido sinovial (siglas del inglés *synovial fluid*)

SO – Safranina-O

SO/VR – Safranina-O/Verde Rápido

TGAGs – GAGs totales

TNF- α – factor de necrosis α

V – varón

VK – Von Kossa

VPN – Valor predictivo negativo

VPP – Valor predictivo positivo

WOMAC – *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*

Resumen

RESUMEN

La osteoartritis o artrosis (OA) es la enfermedad reumática más frecuente, caracterizada por la degradación progresiva del cartílago articular, la esclerosis subcondral y la inflamación de la membrana sinovial. Es asintomática en sus primeras fases, y el método de diagnóstico estandarizado en clínica, la radiografía, evalúa cambios en el tejido óseo adyacente al cartílago, limitando el diagnóstico a etapas de la enfermedad de moderadas a severas. La espectroscopía Raman (ER) ha sido descrita como una técnica no destructiva y libre de marcaje para detectar cambios moleculares en tejidos biológicos, generando una huella dactilar molecular del tejido analizado. El objetivo general de esta Tesis Doctoral es evaluar el potencial de la espectroscopía Raman como técnica de diagnóstico de OA, identificando biomarcadores ópticos en un modelo *ex vivo* de cartílago articular humano. Para ello, se obtuvieron espectros Raman de explantes de cartílago humano procedente de cadera o rodilla, con un láser con longitud de onda (λ) de 785 nm, 50 mW, 120 acumulaciones, y una resolución de 4 cm^{-1} . En base a ratios de las principales señales de los espectros obtenidos se constituyó una propuesta de perfil biomarcador, cuyos parámetros se analizaron cuantitativamente tomando como referencia el grado radiológico de Kellgren-Lawrence (K-L), el Sistema de Graduación Histológico-Histoquímico de Mankin (*MS*) y la cuantificación bioquímica de glucosaminoglicanos (GAGs) sulfatados y colágeno. Como resultado, se obtuvo un conjunto de parámetros Raman que están directamente relacionados con eventos que ocurren a nivel molecular durante la progresión de la OA, de los cuales se seleccionaron SGAGs (GAGs sulfatados), ColD/F (Colágeno defectivo/funcional) y GMF (Grado de mineralización por fosfato) para constituir modelos predictivos de la severidad de esta enfermedad. Estos parámetros permitieron la diferenciación de 2 perfiles en las muestras analizadas: un perfil de “baja severidad” (K-L 0-II y *MS* 0-8) y otro de “elevada severidad” (K-L III-IV y *MS* 9-13). Los modelos predictivos constituidos, tomando como variables respuesta tanto el grado K-L como el *MS*, fueron buenos, obteniendo valores de área bajo la curva (*AUC*) superiores a 0,8. Como conclusión general, se demostró que la ER permite diferenciar distintos grados de severidad de OA, mediante el estudio de ratios de señales de la huella molecular del cartílago. Se confirma de esta forma su potencial como herramienta diagnóstica complementaria de la OA.

Palabras clave: osteoartritis, espectroscopía Raman, huella molecular, biomarcadores ópticos, diagnóstico.

RESUMO

A osteoartrite ou artrose (OA) é a enfermidade reumática máis frecuente, caracterizada pola degradación progresiva da cartilaxe articular, a esclerose subcondral e a inflamación da membrana sinovial. É asintomática nas súas primeiras fases, e o método de diagnóstico estandarizado na clínica (radiografía) avalía cambios no tecido óseo adxacente á cartilaxe, limitando o diagnóstico a etapas da enfermidade dende moderadas a severas. A espectroscopía Raman (ER) é descrita como unha técnica non destructiva e libre de marcaxe para detectar cambios moleculares en tecidos biolóxicos, xerando unha pegada dactilar molecular única do tecido analizado. O obxectivo xeral desta Tese Doutoral é avaliar o potencial da espectroscopía Raman como técnica de diagnóstico de OA, identificando biomarcadores ópticos nun modelo *ex vivo* de cartilaxe articular humano. Para isto, obtivéronse os espectros Raman de explantes de cartilaxe humano procedente de cadeira ou nocello en fresco, cun láser de lonxitude de onda (λ) de 785 nm, 50 mW, 120 acumulacións e resolución 4 cm^{-1} . Baseándose nos cocientes das principais sinais dos espectros obtidos, constituíuse unha proposta de perfil biomarcador, do que se analizaron cuantitativamente os diferentes parámetros tomando como referencia o grao radiolóxico de Kellgren-Lawrence (K-L), o Sistema de Graduación Histolóxico-Histoquímico de Mankin (MS) e a cuantificación bioquímica de glucosaminoglicanos (GAGs) sulfatados e coláxeno. Como resultado, obtívose un conxunto de parámetros Raman que están directamente relacionados con eventos que ocorren a nivel molecular durante a OA, dos que se seleccionaron SGAGs (GAGs sulfatados), ColD/F (Coláxeno defectivo/funcional) e GMF (Grao de mineralización por fosfato) para constituir modelos predictivos da severidade desta enfermidade. Estes parámetros seleccionados permitiron a diferenciación de 2 perfís nas mostras analizadas: un perfil de “baixa severidade” (K-L 0-II e MS 0-8) e outro de “elevada severidade” (K-L III-IV e MS 9-13). Os modelos predictivos constituídos, tomando como variables resposta tanto o grao K-L como o MS, foron bos, obtendo valores de área baixo a curva (AUC) superiores a 0,8. Como conclusión xeral, demostrouse que a ER permite diferenciar distintos graos de severidade de OA, mediante o estudo de ratios de sinais da pegada molecular da cartilaxe. Confírmase desta forma o seu potencial como ferramenta diagnóstica complementaria da OA.

Palabras clave: osteoartrite, espectroscopía Raman, pegada molecular, biomarcadores ópticos, diagnóstico.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatic disease, characterized by progressive articular cartilage degradation, subchondral sclerosis and inflammation of the synovial membrane. On its early stages, OA is asymptomatic and its current gold-standard diagnosis (X-Rays) mainly evaluates changes in the cartilage adjacent tissue, the bone, limiting the diagnosis to moderate or advanced stages of the disease. Raman spectroscopy (RS) has been recently described as a label-free, non-destructive tool to detect molecular changes in biological tissues, producing a unique fingerprint. The main objective of this Doctoral Thesis is to evaluate Raman Spectroscopy potential as a diagnostic technique, through the identification of optical biomarkers in an *ex vivo* model of human articular cartilage. To achieve this, Raman spectra of fresh human cartilage explants from hip or knee were obtained, with a NIR laser of wavelength (λ) 785 nm, 50 mW, 120 scans, and a resolution of 4 cm^{-1} . A biomarker profile was proposed based on ratios of the main spectral signals obtained, which were later quantitatively analyzed using as reference the Kellgren-Lawrence (K-L) radiological grade, the Mankin Histological-Histochemical Graduation System (MS) and the biochemical quantification of sulphated glycosaminoglycans (GAGs) and collagen. As a result, a set of Raman parameters that are directly related to events that occur at the molecular level during OA were obtained, from which SGAGs (sulphated GAGs) CoID/F (Defective/functional collagen) and GMF (Phosphate mineralization grade) were selected in order to constitute predictive models of OA severity. Selected parameters allowed the differentiation of 2 profiles in the analysed samples: a “low severity” profile (K-L 0-II y MS 0-8) and another one of “high severity” (K-L III-IV y MS 9-13). The constituted predictive models, taking both K-L grade and MS as response variable, were considered good models, obtaining values of the area under curve (AUC) values greater than 0.8. As a general conclusion, RS allowed the differentiation of OA severity grades, by analysing signals ratios of cartilage molecular fingerprint. This fact confirms its potential as a complementary diagnostic tool for OA.

Key words: osteoarthritis, Raman spectroscopy, molecular fingerprint, optical biomarkers, diagnosis.

Introducción

1. Introducción

1.1. Osteoartritis, definición y prevalencia

La osteoartritis o artrosis (OA) es una enfermedad crónica asociada con el desequilibrio en la actividad metabólica de los condrocitos, células que constituyen el cartílago articular. Su definición más amplia y recientemente, revisada por un grupo de expertos miembros de la Sociedad Internacional de la Investigación en Osteoartritis (por sus siglas en inglés, OARSI), la caracteriza como un “trastorno que afecta a las articulaciones móviles, caracterizado por el estrés celular y la degradación de la matriz extracelular, iniciada por micro y macro lesiones, que activan respuestas de reparación maladaptativas. La enfermedad se manifiesta primero como un trastorno molecular seguido de alteraciones anatómicas y/o fisiológicas, que pueden culminar en síntomas clínicos caracterizados por dolor articular, crepitación y deformación de la articulación, y pérdida de movilidad en las fases más avanzada” (Kraus *et al.*, 2015).

La OA es un desorden multifactorial principalmente asociado a la edad, afectando al 50% de personas mayores de 65 años, pero también a la obesidad, dieta, sedentarismo, o a una alta actividad deportiva y lesiones previas (Musumeci *et al.*, 2015).

A nivel nacional, según datos del *Estudio de la prevalencia de las enfermedades reumáticas* (EPISER) realizado en 2016, la OA presenta una prevalencia mucho mayor en comparación con otras enfermedades reumáticas. Un 5,2% de la población adulta española sufre OA de cadera, un 7,9% OA de manos, y un 13,9% OA de rodilla, afectando en un mayor porcentaje a mujeres (EPISER 2016).

Actualmente, la OA no tiene cura, y su tratamiento se basa en el control de peso, en el establecimiento de rutinas de ejercicio moderado o bien en el suministro de analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) o fármacos paliativos, denominados por sus siglas en inglés DMOADs (*Disease-Modifying Osteoarthritis Drugs*), destinados a frenar su avance o a reducir el dolor o inflamación (Karsdal *et al.*, 2016). En fases más severas, se procede al reemplazo protésico.

La principal problemática del diagnóstico de esta enfermedad es que es asintomática en sus primeras fases (Kraus *et al.*, 2015), por lo que su diagnóstico se realiza de forma tardía. Debido a los diferentes fenotipos de la enfermedad y variabilidad en la progresión entre los pacientes, no todos los tratamientos disponibles son eficaces en cada caso. Estas limitaciones a la hora de encontrar un tratamiento apropiado, y los riesgos de discapacidad del paciente en fases avanzadas, hacen cobrar importancia a la búsqueda de estrategias para su diagnóstico temprano. Diferentes biomarcadores emergentes, como son los

bioquímicos, son en la actualidad una herramienta prometedora, con una mayor sensibilidad que las técnicas de imagen, y podrían facilitar una detección temprana de lesiones articulares y su progresión (Lourido *et al.*, 2017).

1.1.1. Cartílago articular: principal tejido afectado por la OA

El principal tejido afectado en la OA es el cartílago articular, un tipo de cartílago hialino que reviste los extremos de los huesos de las articulaciones, y cuya función principal es la amortiguación de las cargas cíclicas que se producen con el movimiento habitual de las mismas (Bhosale *et al.*, 2008). Se trata de un tejido conectivo formado por una distribución de células altamente especializadas, los condrocitos (Fox *et al.*, 2009), embebidas en una matriz extracelular (MEC), la cual, debido al conjunto de su composición bioquímica y estructura, es responsable de sus propiedades viscoelásticas (Buckwalter *et al.*, 2005).

1.1.1.1. Composición y estructura del cartílago articular sano

El cartílago articular está compuesto por un único tipo celular, los condrocitos, la MEC, compuesta principalmente por proteínas colagenosas y proteoglicanos, y un elevado porcentaje de agua (Figura 1). A continuación, se describen detalladamente sus principales constituyentes:

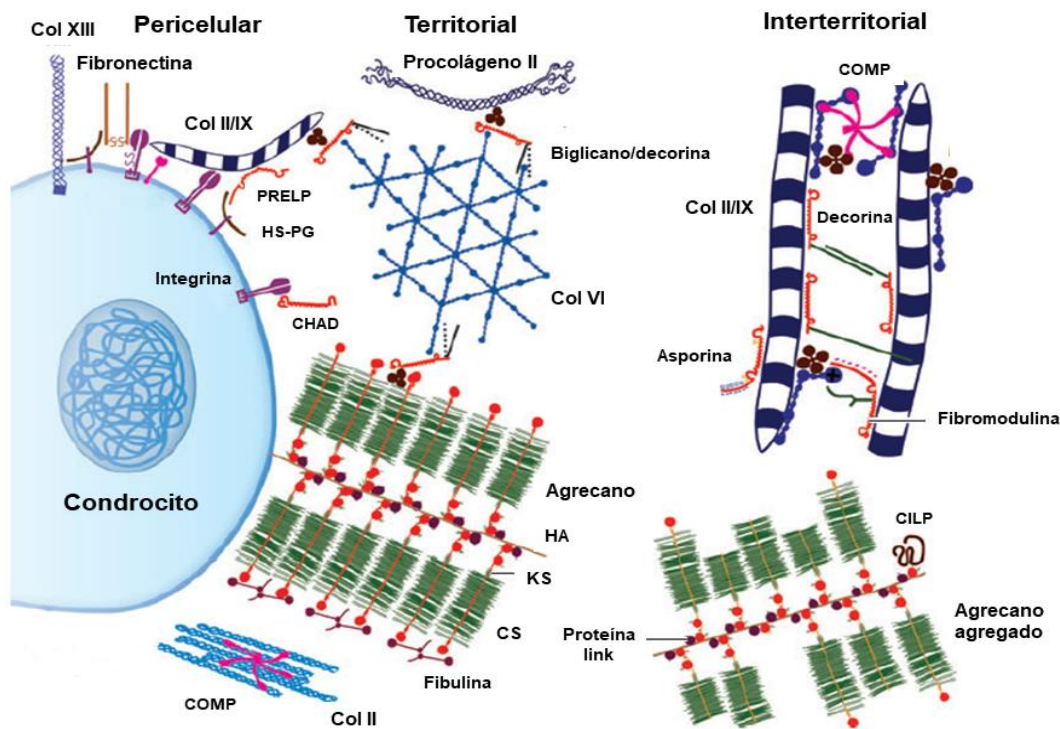


Figura 1. Principales componentes del cartílago articular hialino (Adaptada de Han *et al.*, 2011).

- **Condrocitos:** células especializadas y metabólicamente activas que desempeñan su función en el desarrollo, mantenimiento y reparación de la MEC. El contenido celular del cartílago varía entre un 1 y 5% de su peso húmedo, siendo su distribución, tamaño y morfología diferente entre las distintas regiones anatómicas del tejido (Han *et al.*, 2011). Conforman, junto a un microentorno pericelular rico en ácido hialurónico y proteoglicanos, los condrones, considerados las principales unidades funcionales y metabólicas del cartílago hialino (Poole, 1997; Zhang, 2015).

- **Agua:** el cartílago articular es un tejido altamente hidratado, del cual entre el 65 y el 80% de su peso húmedo corresponde al agua. El grado de hidratación del tejido varía en función de la edad y de las diferentes articulaciones (McDevitt, 1973; Bhosale *et al.*, 2008). El agua es la principal responsable del transporte de nutrientes y lubricación del tejido, y configura la mayor parte de la fase fluida responsable de sus propiedades viscoelásticas (Bhosale *et al.*, 2008).

- **MEC:** formada por productos de síntesis de los condrocitos, configura un medio rico en proteínas y proteoglicanos que protege a las células frente al daño mecánico, manteniendo su forma y fenotipo. Tiene como función adicional la transducción de señales celulares (Guilak, 2006), la regulación del transporte de macromoléculas de nueva síntesis o excreción celular, y es el soporte de almacenamiento de factores de crecimiento (Buckwalter *et al.*, 2005). Su composición bioquímica está formada principalmente por:

- **Colágeno de tipo II (Col-II):** constituye entre el 90-95% de las proteínas colagenosas del cartílago, lo que supone un 10-20% del tejido húmedo y entre un 45-50% de su peso seco (Bhosale *et al.*, 2008; Ansari *et al.*, 2019). Está formado principalmente por glicina (*Gly*), prolina (*Pro*) e hidroxiprolina (*Hyp*) que estabilizan su estructura de hélice α . Estas cadenas se enrollan en una hélice triple (Responde *et al.*, 2007). Esta molécula se asocia con otros colágenos fibrilares como Col-IX y Col-XI (Han *et al.*, 2011) para formar una red compacta de fibras colagenosas con alta resistencia a las fuerzas de tensión y tracción (Fox *et al.*, 2009).
- **Proteoglicanos (PGs):** macromoléculas que constan de un núcleo proteico que enlaza con cadenas de glucosaminoglicanos (GAGs) unidas covalentemente. Estas cadenas configuran centros de unión con cadenas de ácido hialurónico (AH), formando grandes agregados proteicos (Fox *et al.*, 2009). Constituyen el 10-15% del peso total del cartílago. La subunidad de PGs más abundante es el agregcano (AG), compuesto principalmente por cadenas de monosacáridos sulfatados, de los cuales el mayoritario es el condroitín sulfato (CS), y proteínas de unión al AH (Mort *et al.*, 2016). La importancia de los GAGs en los PGs viene dada por la funcionalidad de los grupos cargados negativamente (OSO_3^- y COO^-) que permiten mantener un equilibrio con la fase fluida electrolítica. La

presencia de estos grupos es la responsable de las propiedades viscoelásticas del cartílago y su resistencia a la compresión (Bhosale *et al.*, 2008).

- Otras proteínas colagenosas: el cartílago presenta otros tipos de colágeno, como el de tipo VI, en zonas pericelulares (Poole, 1997) y el de tipo III, IX y XI, responsables de estabilizar la red de Col-II. En la zona calcificada, que corresponde a la transición entre el cartílago y el hueso, los condrocitos son hipertróficos y producen colágeno de tipo X (Ansari *et al.*, 2019).
- Proteínas no colagenosas: otros compuestos proteicos presentes en el cartílago son la decorina, biglicano o la fibromodulina, (Knudson *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2011) estructuras que actúan como reguladoras de la actividad celular y transductores de señales (Buckwalter, *et al.*, 2005) y la lubricina, proteína involucrada en la lubricación y protección del tejido (Rhee *et al.*, 2005).
- Lípidos: el cartílago articular contiene una cantidad pequeña de lípidos, inferior al 1%, relacionada principalmente con las membranas celulares y el entorno pericelular (McDevitt, 1973; Mansfield *et al.*, 2017).

El cartílago articular tiene una estructura heterogénea organizada en cuatro zonas o estratos en profundidad, identificadas en función de la distribución de los componentes de la MEC y morfología, tamaño, orientación y actividad metabólica de los condrocitos (Figura 2).

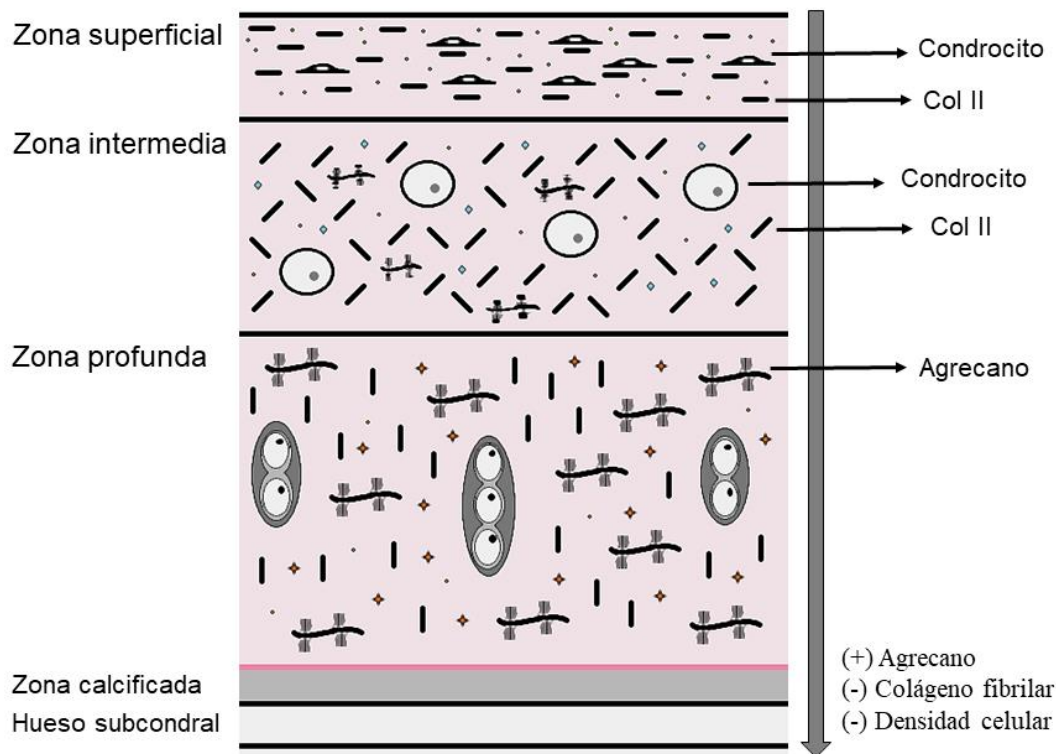


Figura 2. Distribución de los condrocitos, colágeno de tipo II (Col-II) y agregano (AG) en las distintas capas del cartílago articular (Adaptada de Burguera *et al.*, 2016).

- Zona superficial. Es la región anatómica del cartílago con mayor densidad de condrocitos (Quinn *et al.*, 2013). En esta zona los condrocitos tienen menor tamaño, una morfología alargada, y están alineados paralelamente a la superficie (Fox *et al.*, 2009; Ansari *et al.*, 2019). Las fibras de colágeno en la zona superficial son de menor diámetro con respecto a las otras capas y están dispuestas paralelas a la superficie de forma muy compacta. El colágeno es el componente mayoritario de la MEC en esta zona, suponiendo un porcentaje mayor al 85% de peso seco (Responte *et al.*, 2007) mientras que contiene alrededor de un 15% de proteoglicanos. La capa superficial sirve de filtro, impidiendo el paso de macromoléculas externas (Bhosale *et al.*, 2008) y aísla al resto de estructuras del sistema inmune y posibles respuestas inflamatorias (Buckwalter *et al.*, 2005).

- Zona intermedia o de transición. Constituye una región anatómica y funcional de transición entre la zona superficial y las más profundas. En esta zona hay una menor densidad celular y los condrocitos son más redondeados. En ella, las fibras de colágeno son más gruesas que en la capa superficial y ya no están dispuestas de forma paralela. Adicionalmente, la zona de transición presenta un contenido en proteoglicanos mayor que la superficial (25%) (Ansari *et al.*, 2019).

- Zona profunda o radial. En la zona profunda los condrocitos son más grandes, esféricos y están organizados en columnas verticales que se alinean paralelas a las fibras de colágeno, ambas perpendiculares a la superficie (Fox *et al.*, 2009). La densidad celular es menor a la de las zonas superficial e intermedia (Quinn *et al.*, 2013). El contenido de PGs en esta zona es de en torno al 20%.

- Zona calcificada. La zona calcificada es la zona de transición entre el tejido cartilaginoso y hueso. Supone un anclaje de las fibras de colágeno de la zona profunda al hueso subcondral (Ansari *et al.*, 2019). Contiene un número reducido de células de mayor tamaño que en el resto de las zonas y una actividad metabólica muy baja. Los condrocitos de esta zona presentan un fenotipo hipertrófico y sintetizan colágeno de tipo X (Bhosale *et al.*, 2008).

1.1.1.2. Cambios en el cartílago articular durante el proceso artrósico

Como se ha mencionado anteriormente, la osteoartritis es una enfermedad crónica asociada con el desequilibrio en la actividad metabólica de los condrocitos, el deterioro del cartílago articular y la pérdida de su composición, estructura y función normal. Se pueden diferenciar diferentes fases de progresión (muy temprana, temprana, moderada, tardía y final) en función de los cambios estructurales y morfológicos en el cartílago y hueso subcondral, reflejados en la figura 3 (Bay-Jensen *et al.*, 2010).

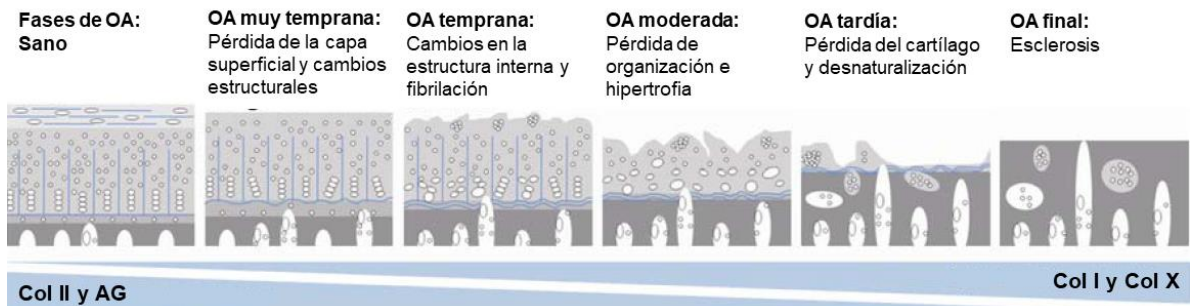


Figura 3. Principales cambios estructurales y morfológicos producidos durante la progresión de la OA en el cartílago y hueso subcondral (Adaptada de Bay-Jensen *et al.*, 2010).

Los principales cambios en el cartílago OA son debidos inicialmente a cambios en el metabolismo celular y alteraciones en los perfiles de expresión genética de los condrocitos (Guilak, 2000), que conducen a la destrucción y pérdida de funcionalidad del tejido. Las células en este punto tienden a proliferar o producir clones para compensar los daños e incrementar la actividad de síntesis, resultando en un mayor contenido celular organizado en clústeres, pero sin resultar esto en una reparación eficiente del cartílago. En cuanto al fenotipo, estos condrocitos no expresan AG ni Col-II, si no que sintetizan otros tipos de colágeno como el I, III y V, y X, en caso de hipertrofia (Aigner y McKenna, 2002). El colágeno VI, limitado a zonas pericelulares, se extiende a la matriz interterritorial. Este cambio en el entorno pericelular podría ser el responsable de la reorganización de los condrocitos en los clústeres típicos del cartílago OA (Pearle *et al.*, 2005). Así mismo, se produce secuencialmente la apoptosis o autofagia celular, provocadas por la ausencia de una MEC estable y funcional, necesaria para la supervivencia de los condrocitos (Hwang *et al.*, 2015).

Durante la enfermedad se produce a nivel bioquímico la pérdida de PGs, dada la carencia en expresión de AG, y se pierde la densidad de las fibras de colágeno, lo que afecta tanto al tamaño de poro como a los procesos de entrada y difusión de macromoléculas a través de la estructura (DiDomenico *et al.*, 2019). La red de colágeno se ve afectada por un aumento de enlaces químicos y alteraciones en su estructura fibrilar, produciendo un aumento de su rigidez y fragilidad (Rýgllová *et al.*, 2017).

En la degradación del cartílago están involucradas diversas metaloproteasas (MMPs). La presencia de proteasas y citoquinas propias de procesos inflamatorios contribuye a la manutención deficiente de la MEC, viéndose la función celular afectada (Hoff *et al.*, 2013; Maldonado y Nam, 2013). Otros factores que contribuyen a desencadenar procesos catabólicos en los condrocitos son la interleuquina 1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y niveles elevados de óxido nítrico (NO) en la articulación (Maldonado y Nam, 2013).

Debido a los cambios producidos, el tejido cartilaginoso osteoarttrítico reduce su capacidad de distribuir y amortiguar las cargas, lo que conduce a la fibrilación y formación de fisuras (Silver *et al.*, 2002). El cambio principal en cuanto a estructura se traduce en la pérdida de tejido en forma de láminas por escisión, al perder elasticidad el cartílago, y la exposición de las fibras colagenosas orientadas de forma aleatoria, lo que provoca lesiones verticales y profundas.

Al producirse estos cambios en la estructura, el tejido se vuelve más permeable. Esto hace que aumente su contenido de agua hasta el 90% y que el tejido se vuelva vulnerable a procesos de inflamación y a daños mecánicos (Buckwalter *et al.*, 2005; Bhosale *et al.*, 2008). Se ocasionan colateralmente daños secundarios en los tejidos adyacentes y en el conjunto de la articulación, por lo que comúnmente se tiene en cuenta para el diagnóstico a la articulación en su conjunto como órgano afectado (Figura 4).

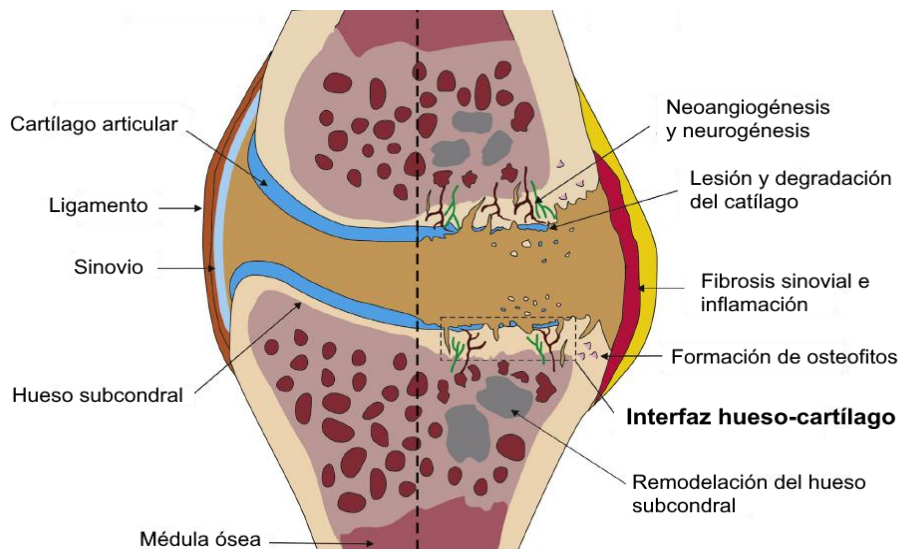


Figura 4. Comparación de la anatomía de una rodilla sana (izda.) con una rodilla artrósica (dcha.) (Adaptada de Yuan *et al.*, 2014).

Macroscópicamente, el cartílago OA es más amarillento y rugoso en su superficie ya en fases tempranas, y se produce pérdida de la matriz en las fases más avanzadas, donde el hueso subcondral queda expuesto (Aigner y McKenna, 2002).

1.1.2. Métodos de diagnóstico de severidad y degradación del cartílago

Actualmente, los principales métodos de diagnóstico en clínica están basados en la sintomatología complementada con análisis de imagen, mediante la realización de radiografías (rayos X) o resonancias magnéticas (RM), ambas técnicas estandarizadas.

Durante las primeras fases, la OA es asintomática, y los pacientes acuden a consulta cuando presentan características por encima del umbral subclínico (Kraus *et al.*, 2015) lo que representa una limitación para su diagnóstico temprano.

Una vez realizada la revisión de la historia clínica del paciente, examen físico y radiografía el diagnóstico se realiza comúnmente siguiendo los criterios de la *American College Rheumatology (ACR)* (Altman *et al.*, 1986, Altman *et al.*, 1991), específicos para cada una de las posibles articulaciones afectadas: rodilla, cadera o manos. Una de las escalas utilizadas para evaluación de los síntomas y restricciones en el movimiento es la escala de *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC)*. La escala *WOMAC* evalúa el estado de salud de los pacientes con OA de rodilla o cadera según su sintomatología, valorando tres parámetros, dolor, rigidez y funcionalidad física en función de 5, 2 y 17 preguntas, respectivamente (McConnell *et al.*, 2001). Aunque este cuestionario es un acercamiento útil al estado del paciente, presenta una serie de limitaciones, como la subjetividad en la medida de parámetros como son el dolor, que además puede no estar relacionado con la severidad de las anomalías estructurales (Nieminen *et al.*, 2019).

La figura 5 muestra los principales métodos de evaluar la severidad de OA.

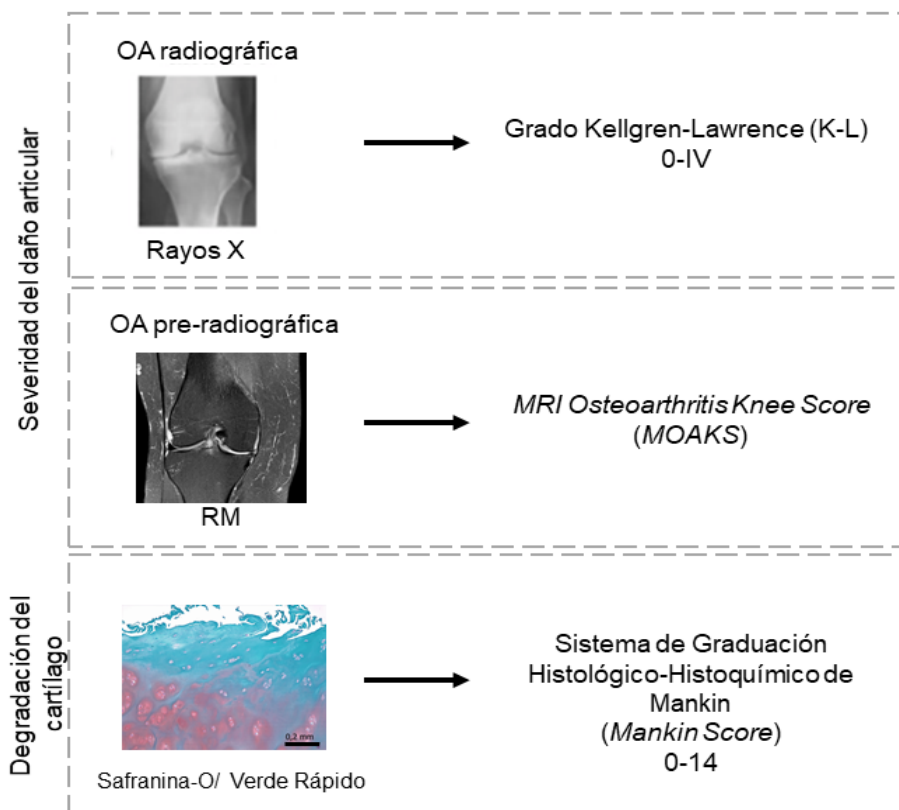


Figura 5. Técnicas usadas comúnmente para evaluar la severidad articular (Grado K-L y MOAKS) y la degradación del cartilago (*Mankin Score*) (Imagen adaptada de Casal-Beiroa *et al.*, 2020a).

La severidad de la OA puede ser clasificada, en función de su grado radiológico, utilizando la escala de Kellgren-Lawrence (K-L) (Kellgren y Lawrence, 1957), aunque la radiografía no permite la detección de cambios en cartílago, si no que se fundamenta en cambios en el hueso adyacente (Braun y Gold, 2012). Por otro lado, la RM permite la visualización pre-radiográfica de cambios en múltiples tejidos, incluyendo el cartílago, para la cual existe una definición de OA basada en RM (Hunter *et al.*, 2011). Otros sistemas de caracterización de cartílago, como el Sistema Histológico-Histoquímico de Mankin o escala *Mankin Score (MS)* (Mankin *et al.*, 1971) y versiones modificadas (Pascual Garrido *et al.*, 2009) son comúnmente empleados para la evaluación de la degradación del cartílago en las diferentes fases de la OA (Figura 5).

1.1.2.1. Diagnóstico radiológico: escala de Kellgren y Lawrence

La determinación del grado radiológico es el método de diagnóstico de OA no invasivo más simple, económico y extendido en la clínica (Hayashi *et al.*, 2016). Para el diagnóstico, se utiliza la escala de graduación de K-L, que clasifica la severidad de la enfermedad en 5 niveles o grados del 0 al IV (Kellgren y Lawrence, 1957). Esta metodología se aplica en función de la morfología del tejido óseo de la articulación, teniendo en cuenta parámetros como el estrechamiento del espacio articular, presencia de osteofitos, esclerosis y deformidad de los extremos de los huesos en fases avanzadas.

La figura 6 muestra un ejemplo de cada grado de severidad de OA de rodilla según esta escala. El grado I se corresponde con una posible reducción del espacio articular y presencia dudosa de osteofitos. El II, con una leve osteofitosis en los extremos de la articulación. En el grado III se observa un mayor estrechamiento del espacio articular con respecto a los anteriores grados, presencia de osteofitos, esclerosis y leve deformación en los extremos de la articulación. Por último, el grado IV, más severo, se corresponde con una gran reducción del espacio articular, osteofitosis, esclerosis y una marcada deformación en la superficie ósea. Diferencias similares pueden ser encontradas en otras articulaciones (Altman y Gold, 2007). La principal limitación de la radiografía como método diagnóstico temprano es que no ofrece una imagen de la morfología o estructura del cartílago por lo que no permite obtener información acerca del estado, integridad o composición del cartílago articular. Es además un método subjetivo dependiente del observador.

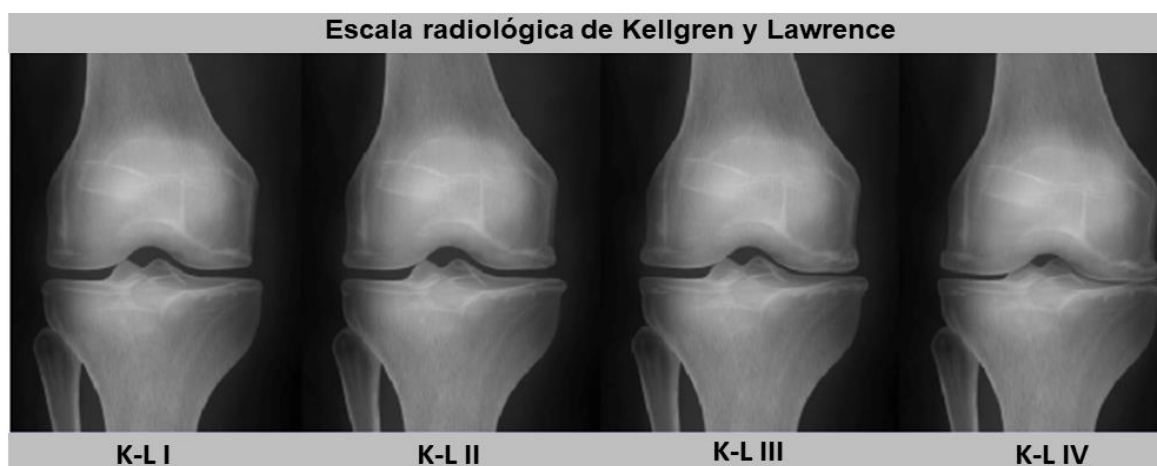


Figura 6. Imágenes representativas de radiografías correspondientes a los diferentes grados de severidad de OA en función del grado K-L (Adaptada de Antony *et al.*, 2016).

1.1.2.2. Diagnóstico por resonancia magnética: **MOAKS**

Las técnicas de imagen por RM se basan en como la magnetización de un tejido cambia tras la aplicación de pulsos de radiofrecuencia, en función de tiempos de relajación T1 y T2. En el caso concreto del cartílago, articular el T2 está asociado con el colágeno e hidratación del tejido (Lüssea *et al.*, 2000; Soellner *et al.*, 2017; Noguerol *et al.*, 2019) de forma que la presencia de daño articular (menor densidad de fibras de colágeno, mayor asimilación de agua) se asocia a tiempos T2 más altos. Por otro lado, los valores de T1 están relacionados con el contenido de PGs, ya que éstos dependen del intercambio de iones con las cargas negativas de la MEC, siendo los valores de T1 más cortos cuanto mayor concentración de carga negativa.

Esta técnica presenta ventajas respecto a otras técnicas de imagen como son los rayos-X. El mapeo basado en resonancia magnética permite obtener una imagen de la morfología de la articulación por completo, y se pueden monitorizar cambios en el conjunto de los tejidos que la integran, proporcionando una gran información de valor diagnóstico (Hayashi *et al.*, 2016). Es reconocida como una herramienta útil para la detección de cambios en las articulaciones de adultos asintomáticos, y, por tanto, como potencial técnica de diagnóstico de OA temprana (Beattie *et al.*, 2005; Guymer *et al.*, 2007; Pappas *et al.*, 2016; Nagai *et al.*, 2018).

Sin embargo, la RM no se utiliza en la clínica de manera rutinaria, pues una realización sistemática en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes supone un coste más elevado y una mayor complejidad de análisis que la radiografía (Pereira *et al.*, 2014). Además, utiliza comúnmente agentes de contraste basados en gadolinio que pueden presentar efectos tóxicos (Ramalho *et al.*, 2016) y está contraindicada para pacientes con dispositivos médicos o prótesis metálicas.

Actualmente, se encuentran validadas escalas para la caracterización de la OA en rodilla (*Magnetic Resonance Imaging OsteoArthritis Knee Score, MOAKS*) (Peterfy *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2011), mano (Haugen *et al.*, 2011) o cadera (Roemer *et al.*, 2011).

1.1.2.3. Sistema de Graduación Histológico-Histoquímico de Mankin (Mankin Score)

La principal técnica de caracterización de la degradación de cartílago es el *Mankin Score (MS)* o sus escalas modificadas (Mankin *et al.*, 1971; Pascual Garrido *et al.*, 2009). Este método histológico se basa en la observación de tinciones histológicas de Safranina-O o Safranina-O/Verde Rápido, para la evaluación de tres parámetros, clasificados a través de *subscores*, considerando *subscore I (SI)* – defectos en la estructura (0-7); *subscore II (SII)* – anomalías celulares (0-2) y *subscore III (SIII)* – tinción de la matriz (0-4), que suman una clasificación total de *MS*: 0-13. Este método se propuso originariamente para evaluar la degradación de cartílago, y es, a día de hoy, ampliamente utilizado en investigación, permitiendo la evaluación de la degradación, reparación o regeneración en modelos de cartílago OA (Pauli *et al.*, 2012).

El Sistema de Graduación Mankin (Mankin *et al.*, 1971) se creó basándose en muestras de degradación avanzada, por lo que puede presentar limitaciones a la hora de caracterizar OA de leve a moderada, presentando cierta variabilidad, sobre todo en parámetros relacionados con la celularidad o la intensidad de tinción por Safranina-O (Ostergaard *et al.*, 1999; Pauli *et al.*, 2012). También es una técnica subjetiva al observador.

1.2. Espectroscopía Raman como herramienta para el diagnóstico

1.2.1. Fundamento

La ER se fundamenta en la dispersión fotónica inelástica que se produce cuando una luz monocromática incide en una molécula y los fotones se dispersan en función de la interacción del haz de luz con la muestra irradiada. Este fenómeno se llama “efecto Raman” en honor a Chandrasekhara Venkata Raman, premio Nobel de Física en 1930 por el descubrimiento de este principio.

Las moléculas que constituyen la materia se encuentran en constante movimiento. Las dispersiones Raman que se producen en el haz de luz son debidos a los movimientos que se producen en los enlaces de las moléculas incididas, produciendo desplazamientos en la longitud de onda (λ), característicos según tipo de enlace, modos de rotación o vibración y su entorno químico (Figura 7) (Bougeard *et al.*, 1995).

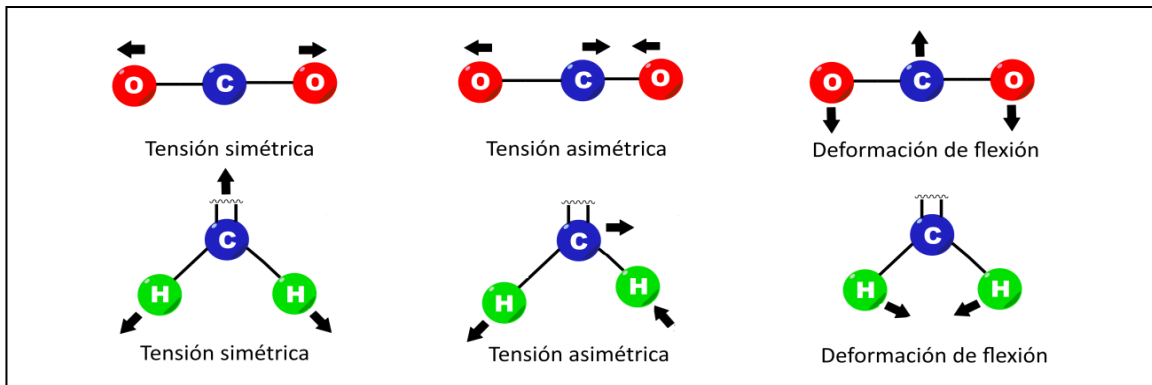


Figura 7. Ejemplos de modos vibracionales en estructuras moleculares lineales (molécula CO₂) y trigonales planas (grupo =CH₂ orgánico).

La figura 8 muestra un esquema representativo del efecto Raman. Al irradiar una muestra, ya sea un material sintético, tejido biológico o disolución, con un láser a una determinada longitud de onda, se produce la excitación de los electrones de enlace, llevando a la molécula a un nivel energético virtual mayor que al basal. Tras la excitación, se produce la relajación de la molécula desde el nivel de energía excitado a niveles inferiores, liberando energía que hace variar la frecuencia de los fotones emitidos respecto a los incididos (Aguiar *et al.*, 2015). Esta interacción de los fotones con la nube electrónica de enlace puede dar lugar a 3 tipos de fenómenos o dispersiones, representados en los diagramas correspondientes en la figura 8.

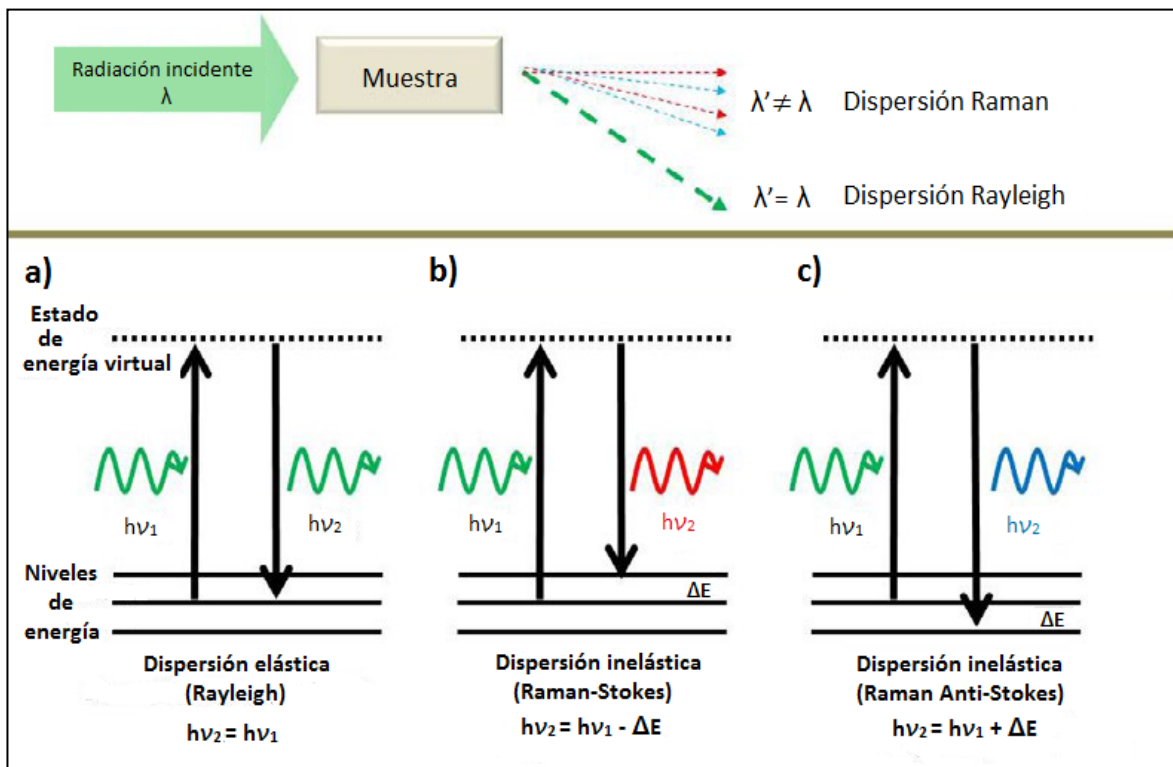


Figura 8. Esquema ilustrativo del efecto Raman en una muestra irradiada (Adaptada de Aguilar *et al.*, 2015).

La mayor parte de la radiación incidida se dispersa de forma elástica, de forma que el estado energético final de la molécula es igual al inicial (Figura 8.a) y la variación de la frecuencia de los fotones emitidos respecto a los incididos es igual a 0 ($\Delta\nu=0$). Esta dispersión recibe el nombre de dispersión Rayleigh y se trata del tránsito de energía más probable, al suponer la vuelta al estado energético molecular basal y de mayor estabilidad.

Las figuras 8.b y 8.c representan los diagramas energéticos de las posibles dispersiones inelásticas, o dispersiones Raman. En el caso b, la molécula vuelve a un nivel energético superior al inicial, y se dispersa por tanto una menor energía que aquella con la que se incidió la muestra. La absorción de energía produce la disminución de frecuencia de los fotones emitidos con respecto a los incididos inicialmente, lo que se traduce en una $\Delta\nu>0$. Esta es la llamada dispersión “*Raman Stokes*”. En el caso c, se representa la situación contraria, la llamada dispersión “*Raman Anti-Stokes*”, en la que se dispersa más energía de la incidida y por tanto la frecuencia de los fotones emitidos es mayor a los incididos inicialmente en la muestra ($\Delta\nu<0$). Éste último es el tránsito de menor probabilidad, al no ser favorable que una molécula disminuya su estado de energía por debajo de su nivel de estabilización.

Las diferentes dispersiones que se producen al irradiar una determinada muestra se registran en forma de un espectro Raman en el que aparecen pulsos o señales según el desplazamiento de la frecuencia de fotones incidida con respecto a la reflejada. La dispersión Rayleigh produce un pulso o señal a $\Delta\nu=0$ al ser registrada, lo que no aporta información acerca de la composición de la muestra. Al ser esta señal mucho más intensa que las registradas a partir de dispersiones inelásticas de menor probabilidad, usualmente los equipos Raman incluyen filtros que eliminan su contribución. Las variaciones o desplazamientos producto de las dispersiones inelásticas se registran de forma que aparecen picos o bandas a ese desplazamiento de frecuencia concreto, medido en cm^{-1} , configurando una “huella dactilar” característica de cada molécula, material o tejido analizado. Estas señales son las llamadas bandas *Raman Stokes* y *Anti-Stokes* (Gautam *et al.*, 2015).

Las bandas *Stokes* aparecen con un desplazamiento positivo al corresponderse con la dispersión a una menor frecuencia que la radiación incidida. De forma simétrica, las bandas *Anti-Stokes*, aparecen a valores negativos de desplazamiento, siendo estas mucho menos intensas al ser provocadas por transitos energéticos muy poco probables. Debido a esta diferencia de intensidades entre las bandas *Raman Stokes* y *Anti-Stokes*, para el análisis de muestras por espectroscopía Raman se suelen utilizar las *Stokes*, por su mayor intensidad, y por tanto facilidad de análisis por su mejor relación señal/ruido (S/R).

1.2.2. Datos y análisis del tejido vivo: ventajas y limitaciones

La ER es una técnica muy versátil que, por sus características, tiene aplicaciones en el análisis de gran variedad de muestras, ya sean materiales inorgánicos, tejidos biológicos o disoluciones moleculares, y sobre un volumen muestral pequeño (Pelletier, 2003).

Entre sus principales ventajas, se encuentran la ausencia de contacto con la muestra, y que la presencia de agua no interfiere de forma apreciable en los resultados en un amplio rango del espectro (Aguiar *et al.*, 2015). Las muestras pueden ser medidas en fresco, sin necesidad de su pretratamiento o alteración, aunque también se pueden emplear diversos pretratamientos de fijación o inclusión, como la parafina, formalina, polimetilmetacrilato (PMMA) o *cryomatrix* (Kunstar *et al.*, 2012; Gamsjaeger *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2015), cuyas señales son conocidas y fáciles de identificar y discernir de las bandas características de los tejidos biológicos. Los espectros obtenidos comúnmente se pre-procesan, corrigiendo la línea base o normalizándolos (Pelletier, 2003; Ryabchykov *et al.*, 2019). Las muestras se pueden clasificar en función de los datos obtenidos mediante métodos estadísticos tomando como referencia, en diagnóstico, escalas de referencia *gold-standard*. Con frecuencia estos resultados se validan mediante pruebas bioquímicas (Richardson *et al.*, 2015; Albro *et al.*, 2018).

Para el análisis de tejido biológico, las condiciones de medida se han tenido que adaptar a este tipo de muestras, que presentan características peculiares con respecto a los materiales inorgánicos que pueden suponer limitaciones (Tabla 1). En primer lugar, la mayoría de los tejidos biológicos presentan autofluorescencia en mayor o menor medida y esto puede alterar la línea base del espectro. Este efecto se puede corregir mediante la aplicación de algoritmos matemáticos o mediante la utilización de fuentes de radiación de longitudes de onda más elevadas y de menor energía, como son los láseres de infrarrojo cercano (láseres *NIR*, 785, 830 o 1064 nm), pues estas longitudes de onda se encuentran normalmente fuera del rango de absorbancia de las matrices biológicas típicas y minimizan los efectos de la fluorescencia (Asher y Johnson, 1984; Cordero *et al.*, 2018; Ryabchykov *et al.*, 2019). Los tránsitos energéticos que se producen al irradiar un tejido con estos láseres producen intensidades más débiles que en el caso de otros materiales o mediante el uso de fuentes de radiación de mayor energía. Es por esto por lo que es necesario, para el estudio de estas matrices biológicas, detectores de elevada eficiencia cuántica que minimicen el ruido de lectura, y que al mismo tiempo estén refrigerados para que los resultados no se vean alterados por las diferencias de temperatura. La intensidad se puede aumentar, o bien aumentando la potencia de láser, o el tiempo de exposición, teniendo en cuenta los posibles efectos fototóxicos de la radiación prolongada. La exposición prolongada al láser puede tener

efectos nocivos sobre las células, deshidratar parcialmente el tejido o producir quemaduras (Butler *et al.*, 2016).

Dadas estas limitaciones es necesario, por tanto, establecer protocolos estandarizados para que éstas sean minimizadas, ya que tanto la fluorescencia como la débil intensidad de señal son factores inherentes a la mayor parte de las muestras biológicas, y esto afecta a la calidad espectral y a la sensibilidad (Esmonde-White *et al.*, 2014). Además, la presencia de irregularidades en la superficie de la muestra puede producir fluctuaciones en la intensidad, lo que supone una limitación a la hora de la comparación entre espectros. Por este motivo es necesaria la aplicación de métodos de normalización de forma previa al análisis (Ryabchykov *et al.*, 2019).

Tabla 1. Principales limitaciones del análisis del tejido vivo por ER y adaptaciones para minimizar sus efectos.

Limitaciones	Soluciones
Autofluorescencia del tejido	- Empleo de láseres <i>NIR</i> ($\lambda = 785, 830$ o 1064 nm)
Obtención de señales débiles	- Aumento de la potencia de medida del láser - Empleo de detectores de alta eficiencia cuántica
Baja relación señal/ruido (S/R)	- Aumento de la potencia de medida del láser - Empleo de detectores de alta eficiencia cuántica con buenos sistemas de refrigeración
Posibles efectos fototóxicos	- Optimización de la potencia de medida - Minimización del tiempo de exposición al láser
Variabilidad en la intensidad	- Pre-procesado con estrategias de normalización

La espectroscopía Raman (ER) es una herramienta emergente en el estudio de patologías en el ámbito de la biomedicina. En las últimas 2 décadas, el número de estudios que utilizan técnicas de ER para caracterizar tejido biológico se ha visto incrementado progresivamente, llegando a descubrirse potenciales aplicaciones en diagnóstico e investigación biomédica (Cordero *et al.*, 2018). Son ejemplos de estas aplicaciones, el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares (Dochow *et al.*, 2016), enfermedades inflamatorias (Bi *et al.*, 2011; Pence *et al.*, 2017) y detección de tejido tumoral en mucosa oral (Valdés *et al.*, 2014), pulmón (Magee *et al.*, 2009; McGregor *et al.*, 2017), mama (Abramczyk *et al.*, 2012), colon (Bergholt *et al.*, 2015) vejiga y próstata (Crow *et al.*, 2005), cerebro (Kirsch *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2017) y piel (Lui *et al.*, 2012; Patil *et al.*, 2011). También se han encontrado aplicaciones en la detección precoz de caries mediante el estudio del esmalte dental (Coello *et al.*, 2015).

Esta herramienta podría suponer una mejora en el diagnóstico de varias enfermedades musculoesqueléticas, como es el caso de la OA, mediante la definición de biomarcadores ópticos (Kumar *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2015) (Figura 9).

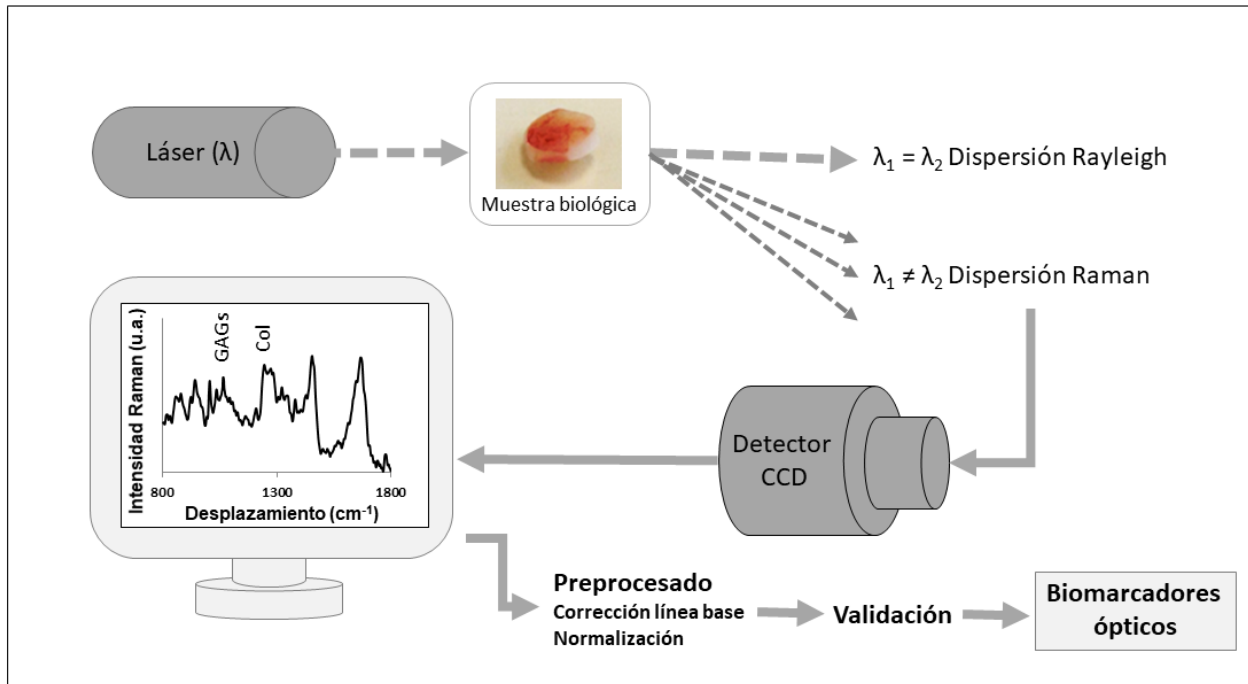


Figura 9. Diagrama del proceso de obtención de biomarcadores ópticos por ER.

1.2.3. Aplicación de la Espectroscopía Raman en OA

1.2.3.1. ER en la caracterización del cartílago articular hialino

Como ya se comentó anteriormente, el cartílago articular es un tejido constituido por condrocitos, embebidos en una MEC. Debido a la composición rica en proteínas de la matriz, el espectro Raman es complejo, y predominan las bandas relacionadas con estos componentes, como ocurre con otros tejidos biológicos.

La figura 10 muestra un ejemplo de huella molecular de cartílago humano, cuyas bandas y asignaciones están detalladas en la tabla 2. Las principales bandas Raman asociadas a las proteínas son aquellas relacionadas con la prolina (*Pro*) a desplazamientos de 856-8 y 920-2 cm⁻¹, hidroxiprolina (*Hyp*) a 875-80 cm⁻¹ (Lim *et al.*, 2011), fenilalanina (*Phe*) a 1001-4 cm⁻¹ (Esmonde-White *et al.*, 2011; Kunstar *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2015), un doblete de señales relacionado con el colágeno y su estructura secundaria relativa a desplazamientos de 1245-1270 cm⁻¹ (amida III) (Takahashi *et al.*, 2014) y una banda inespecífica de proteínas 1630-1675 cm⁻¹ (amida I) (Esmonde-White *et al.*, 2011; Kunstar *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2015).

Adicionalmente, el espectro del cartílago muestra otras bandas relacionadas con los PGs, como la banda a $1060\text{-}4\text{ cm}^{-1}$, relacionada con la presencia de GAGs sulfatados como el condroitín sulfato (Lim *et al.*, 2011; Esmonde-White *et al.*, 2011; Kunstar *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2015; Gamsjaeger *et al.*, 2014) y la banda a $1039\text{-}42\text{ cm}^{-1}$, relacionada con la presencia del anillo piranosa (Lim *et al.*, 2011), estructura presente en todos los GAGs. Otra banda relacionada con los PGs es la que aparece a un desplazamiento de $1375\text{-}80\text{ cm}^{-1}$, identificada como una alternativa a la señal $1060\text{-}4\text{ cm}^{-1}$, en caso de que el cartílago esté mineralizado, donde la aparición de bandas en la región $1070\text{-}90\text{ cm}^{-1}$ puede ocasionar interferencias a la hora del análisis (Gamsjaeger *et al.*, 2014). Finalmente, Mansfield y Winlove (Mansfield y Winlove, 2017) estudiaron la distribución de lípidos en el cartílago, identificando dos regiones del espectro asociadas a este componente, una banda en torno a $1441\text{-}50\text{ cm}^{-1}$ y la región $2845\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$.

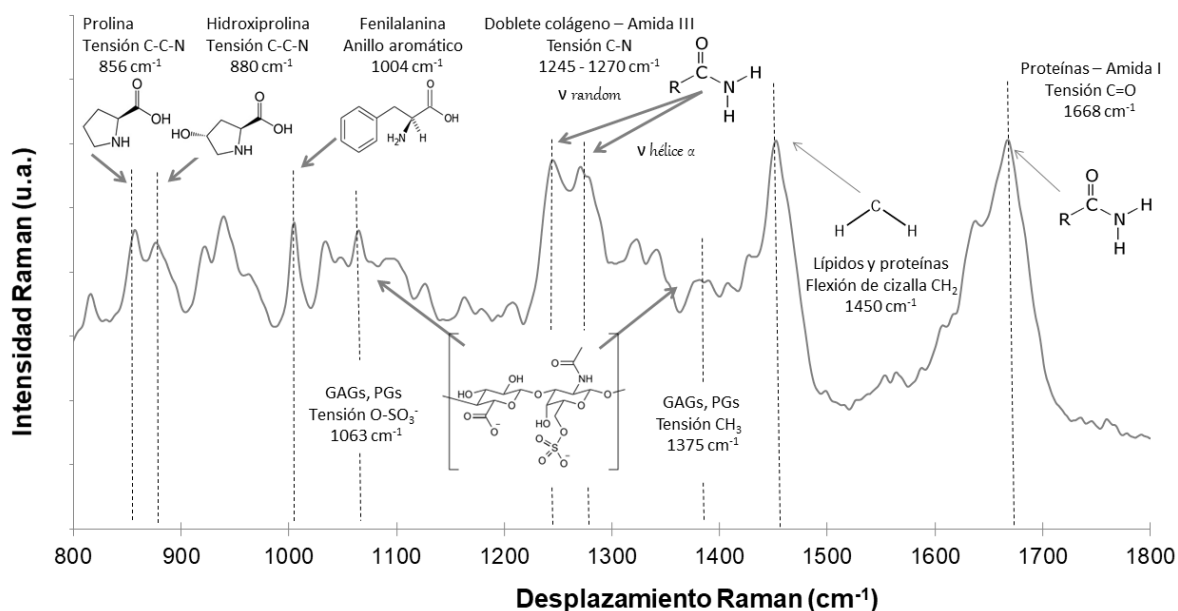


Figura 10. Huella molecular de cartílago articular humano por ER. Espectro obtenido con un láser de Nd:YAG ($\lambda=1064\text{ nm}$) (Adaptada de Casal-Beiroa *et al.*, 2020b).

Por otra parte, la ER también ha sido explorada para el estudio de las diferentes zonas del cartílago, aunque los resultados publicados hasta el momento se realizaron en modelos animales. Bonifacio *et al.* analizaron cartílago articular porcino en su orientación transversal, pudiendo diferenciar mediante los espectros obtenidos las diferentes capas superficial, intermedia y profunda, mediante el mapeado de intensidades obtenidas de señales relacionadas con las fibras de colágeno, como la amida III (Bonifacio *et al.*, 2010). Se destaca adicionalmente la aportación de un estudio de Bergholt *et al.* en secciones transversales de cartílago, utilizando un modelo bovino y realizando su análisis mediante un método de imagen por ER, que permitió redefinir la estructura clásica del cartílago de cuatro zonas diferenciadas a seis zonas, en función de gradientes en la composición de colágeno, GAGs

y agua, determinados también por mapeado Raman (Bergholt *et al.*, 2016). Estos resultados fueron posteriormente confirmados con ensayos bioquímicos (Albro *et al.*, 2018).

Tabla 2. Principales bandas Raman presentes en el cartílago articular hialino y sus correspondientes asignaciones

Desplazamiento (cm ⁻¹)	Asignación	Componente molecular	Referencias (primer autor, año)
850-880 856-8 875-80	Tensión C-C - <i>Pro</i> (C-C-N) - <i>Hyp</i> (HO-C-C-N)	Colágeno	Lim, 2011; Richardson, 2015; Bergholt, 2016
920-8	<i>Pro</i> C-C	Colágeno	Esmonde-White, 2011; Richardson, 2015
932-41 932-938 937-941	- Tensión simétrica Tensión C-C C-O-C enlace α1-4 glucosídico	Proteínas GAGs	Movasaghi, 2007; Esmonde- White, 2008; Lim, 2011 Movasaghi, 2007; Lim, 2011; Kunstar, 2012; Richardson, 2015
1001-4	Phe, tensión del anillo aromático	Proteínas	Esmonde-White, 2011; Kunstar, 2012; Richardson, 2015
1039-42	Anillo piranosa, tensión C-O-C	GAGs	Lim, 2011
1060-4	O-SO ₃ ⁻ , tensión simétrica	GAGs sulfatados, PGs	Esmonde-White, 2011; Lim, 2011; Kunstar, 2012; Gamsjaeger, 2014; Kumar, 2015
1126-70	Tensión C-C ₆ H ₅	Carbohidratos, GAGs	Lim, 2011
1230-1280 1238-45 1260-70	Amida III – tensión C-N - Cadena desordenada - Cadena hélice α	Colágeno - Defectivo - Funcional	Lim et, 2011; Buchwald, 2012; Gamsjaeger, 2014; Richardson, 2015; Takahashi, 2014; Kumar et, 2015;
1370 1375-80	COO ⁻ tensión simétrica CH ₃ tensión simétrica	HA, GAGs, PGs GAGs, PGs	Esmonde-White, 2008 Gamsjaeger, 2014
1439	=CH ₂ deformación	Lípidos	Esmonde-White, 2011; Buchwald, 2012
1441-60	CH ₂ flexión de cizalla	Lípidos y proteínas (contenido orgánico)	Esmonde-White, 2011; Richardson, 2015; Mansfield, 2017
1630-1690 1645-55 1660-70 1665-75	Amida I - C=O tensión hélice α - C=O tensión cadena desordenada - C=O tensión lámina β	Colágeno y otras proteínas	Esmonde-White, 2011; Kunstar, 2012; Buchwald, 2012; Richardson, 2015;
1654-7	C=C, tensión simétrica	Lípidos	Esmonde-White, 2011
1745	C=O, tensión simétrica	Lípidos	Esmonde-White, 2011
2845-980 2845 2850 2980	CH ₂ tensión simétrica (saturado) tensión simétrica (insaturado)	Lípidos	Mansfield, 2017
2930	tensión asimétrica CH ₃ tensión simétrica	Lípidos y proteínas	Mansfield, 2017

1.2.3.2. ER en la caracterización del cartílago articular hialino deteriorado o artrósico

A partir de 2011 en adelante, se realizaron varios estudios de la evaluación del cartílago degradado por ER, los cuales se encuentran resumidos en la tabla 3.

El primer estudio acerca del cartílago articular humano dañado (Esmonde-White *et al.*, 2011) describe las diferencias encontradas en las principales bandas Raman descritas en cartílago sano y erosionado (958, 1063, y 1070 cm^{-1}), así como se establecieron ratios indicativos de la degradación del tejido, como los llamados *cartilage-to-bone ratio* (1063/958) y *mineralization ratio* (958/920) que podrían estar relacionados con procesos de mineralización que ocurren en el tejido a nivel molecular durante la progresión de la OA.

En cuanto a los efectos de las cargas mecánicas en el tejido, que juegan un papel importante durante la progresión de la enfermedad, Lim *et al.* (Lim *et al.*, 2011) estudiaron los cambios en cartílago sano por efecto de diferentes cargas utilizando un modelo animal de cerdo. Las bandas relacionadas con GAGs descendieron en los grupos sometidos a impactos respecto al control, indicando un descenso en el nivel de PGs del tejido, confirmado por análisis histomorfológico.

Tras esto, otros autores utilizaron la ER para el estudio de cartílago OA mediante análisis multivariable o cuantificando ratios de señales como el colágeno defectivo/funcional (1245/1270) o el contenido relativo de GAGs sulfatados (1064/1004) (Takahashi *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2015), encontrando diferencias entre el cartílago sano y el artrósico. Takahashi *et al.*, correlacionaron el ratio 1245/1270 con la escala patológica de Collins, que evalúa la pérdida de integridad superficial del cartílago debidas a la edad y a la OA (Takahashi *et al.*, 2014). Posteriormente, un nuevo estudio mostró la elevada eficiencia de la ER (85%) para la predicción de los diferentes grados en el sistema de la Sociedad Internacional de la Reparación del Cartílago (International Cartilage Repair Society System, ICRS), mediante análisis de componentes principales (PCA) y cuantificación de los ratios 1064/1004 y 1245/1270 (Kumar *et al.*, 2015).

Otros estudios de cartílago más recientes se han centrado en el contenido de agua para determinar diferencias en su funcionalidad y propiedades mecánicas por daños relacionados con la edad (Unal *et al.*, 2019). Se encontró mediante ensayos realizados con esta técnica, un mayor contenido de agua en el grupo de cartílago de donantes de mayor edad respecto al grupo más joven. Estos resultados se

correlacionaron positivamente con los resultados obtenidos por métodos gravimétricos, como la permeabilidad del tejido y o el módulo compresivo intrínseco del tejido. Los autores subrayan por este motivo el potencial de las sondas Raman como método mínimamente invasivo para monitorizar la calidad del cartílago articular durante artroscopias.

Tabla 3. Estudios realizados por espectroscopía Raman para la caracterización de cartílago articular humano OA.

Origen de la muestra	Edad, sexo y tamaño muestral (n)	Bandas estudiadas (cm ⁻¹)	Raman	Láser, longitud de onda(λ) y potencia (P)	Incidencia láser	Referencia (Primer autor, año)
Cartílago de rodilla Tejido de referencia: cartílago y hueso subcondral de brazo	N.D. N.D. N.D.	1070, 1063, 958, 920 Referencia: 1002	ER de fibra óptica	Near IR λ= 785 nm P= 10 mW	Superficial	Esmonde- White, 2011
Cartílago de fémur fetal	20 semanas, N.D., N.D.	937, 954, 1001, 1062, 1448, 1656, 1576	MicroER confocal	Kr-ion λ= 647 nm P= N.D.	Superficial Transversal	Kunstar, 2012
Cartílago articular*	N.D., N.D.					
Cartílago de rodilla procedente de reemplazo articular	82-84 años mujer, n=1	1241/1269	MicroER	Kr-ion λ= 647 nm P= 35 mW	Superficial	Takahashi, 2014
Cartílago sano y OA	N.D., N.D. n=1 vs n=1	1665, 1451, 1245, 1004, 940, 816, 922, 857	MicroER	Argon λ= 514 nm P= 25 mW	Transversal	Richardson, 2015
Cartílago con o sin lesión***	N.D., N.D., n=59 vs n=48					
Cartílago de grados ICRS I, II y III	N.D., N.D., n=27	1245-70, 1064 Referencia: 1004	MicroER confocal	He-Ne λ= 632 nm P= 8 mW	Superficial	Kumar, 2015
Cóndilo femoral lateral y medial y surco patelofemoral	21-65 años, hombre n=18	3200/2940, 3250/2940, 3450/2940, 3520/2940	ER	Near IR λ= 785 nm P = 25 mW	Superficial	Unal, 2019

Modelos animales usados como referencia en los estudios: * bovino; ** pavo, *** rata. Datos sin información: N.D.: no descrito.

1.2.4. Aplicación de la ER en otras enfermedades reumáticas

A parte del potencial diagnóstico para detectar el daño patológico en el cartílago articular debido a la OA, la ER presenta aplicaciones en la detección de otras enfermedades reumáticas (Carvalho *et al.*, 2011; Hosu *et al.*, 2019) u otras enfermedades raras que afectan al tejido cartilaginoso como la ocrónosis (Taylor *et al.*, 2019).

Por otro lado, mediante el análisis del líquido sinovial (SF), la ER ha mostrado su potencial para la detección de gota, artritis por depósitos de pirofosfato cálcico dihidratado (CPPD) y calcificaciones ectópicas, al confirmar la presencia de cristales de urato de monosódico (MSU) y pirofosfato (CPPD) por sus bandas Raman (631 cm⁻¹ y 1050 cm⁻¹, respectivamente) (Li *et al.*, 2014; Abhishek *et al.*, 2015). También ha sido empleada para analizar la tendinitis calcificante (Chiou *et al.*, 2009).

1.2.5. Aplicación clínica de la ER en la OA

Debido a especificidad de la ER a nivel molecular, esta técnica podría constituir un método rápido y económico de diagnóstico y monitorización de los pacientes. En los últimos años, se han desarrollado métodos y equipamiento que permiten el análisis *in vivo*, incorporando un sistema de sondas al equipamiento Raman, que es químicamente inerte y no tóxico para el organismo (Esmonde-White *et al.*, 2011).

La más ampliamente usada, por su pequeño diámetro, flexibilidad mecánica, y bajo coste respecto a otras opciones, es la sonda de fibra óptica (Latka *et al.*, 2013). Las propiedades de la fibra óptica hacen que esta sonda sea la más apropiada, al facilitar el posicionamiento del sensor en regiones del cuerpo de difícil acceso, además de permitir el acoplamiento de la espectroscopía Raman a endoscopios médicos estándar. Además, la insensibilidad de la fibra óptica a campos magnéticos hace al sistema apropiado para el acoplamiento con otras técnicas como la RM.

Actualmente se están realizando pruebas para monitorizar cambios en tejidos articulares, como el hueso, en un ensayo clínico orientado al diagnóstico de la osteoporosis, la OA y la osteogénesis imperfecta (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT02814591). La fibra óptica permite además el acoplamiento del equipo a dispositivos de artroscopía para el análisis *in vivo* intraarticular, de igual forma que se han desarrollado equipos similares basados en tecnología infrarroja (IR) (Sarin *et al.*, 2018). Todos estos estudios previos allanan el camino para la adaptación clínica de la fibra óptica acoplada a equipos de ER como herramienta complementaria en la detección de cambios moleculares en el cartílago u otros tejidos articulares.

Hipótesis y justificación

2. Hipótesis y justificación

2.1. Hipótesis

La espectroscopía Raman es capaz de detectar cambios degenerativos en cartílago derivado de articulaciones evaluadas radiológica o histológicamente. Presenta, por tanto, potencial para el diagnóstico de OA y caracterización de la degradación del cartílago articular mediante el establecimiento de un perfil de biomarcadores ópticos.

2.2. Justificación

La OA es una enfermedad que supone desafíos para el médico tratante y que genera un fuerte impacto socioeconómico por su elevada prevalencia (Kraus *et al.*, 2015; Musumeci *et al.*, 2015). Dadas las limitaciones de las técnicas convencionales en el diagnóstico de la OA, y la creciente prevalencia de esta enfermedad en la población, resulta de interés disponer de técnicas de caracterización poco invasivas, y que a su vez sean capaces de detectar daños o cambios a nivel molecular ya en estadios tempranos de la enfermedad.

Como técnica de diagnóstico, la ER podría ser útil a la hora de detectar cambios a nivel molecular en el cartílago (Esmonde-White *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2015), pudiendo constituirse, a partir de las bandas Raman, un perfil biomarcador relacionado con estos principales cambios. De llegarse a validar este perfil biomarcador, la ER podría emplearse como técnica mínimamente invasiva de diagnóstico de OA, incluso si no se aprecian lesiones o cambios morfológicos en la articulación mediante el uso de otras técnicas, aportando información acerca del propio tejido cartilaginoso, a diferencia del método convencional más empleado en clínica, el grado radiológico K-L (Kellgren y Lawrence, 1957).

Los equipamientos de ER son compatibles con sondas de fibra óptica (Esmonde-White *et al.*, 2011; Latka *et al.*, 2013), por lo que existe la posibilidad de su adaptación al entorno clínico y al análisis *in vivo*. Supondría, además, una mayor rapidez en la práctica clínica que la RM, sin necesidad de utilizar agentes de contraste nocivos (Pereira *et al.*, 2014; Ramalho *et al.*, 2016). Adicionalmente, la ER podría emplearse como técnica descriptiva de caracterización de tejido utilizada en investigación básica, como ya se utiliza en algunas áreas como ingeniería de tejidos, para evaluar la calidad de cartílago neoformado (Bergholt *et al.*, 2017).

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo general:

Analizar el potencial de la espectroscopía Raman para el diagnóstico de la osteoartritis en un modelo *ex vivo* de cartílago articular humano derivado de muestras de cadera y rodilla de donantes sanos o pacientes artrósicos.

3.2. Objetivos específicos

Objetivo 1: Estudio de la huella molecular del cartílago articular sano y artrósico, estableciendo parámetros Raman o señales que puedan definir un potencial biomarcador.

Objetivo 2: Análisis de las diferencias cuantitativas de los parámetros Raman propuestos como perfil biomarcador entre el cartílago articular sano y artrósico.

Objetivo 3: Correlacionar los parámetros Raman propuestos con la composición bioquímica del cartílago articular sano y artrósico.

Objetivo 4: Definir perfiles de degradación del tejido utilizando parámetros Raman propuestos que permitan identificar los grados de severidad de la osteoartritis y establecer modelos predictivos.

Material y métodos

4. Material y métodos

4.1. Obtención y clasificación radiológica de muestras de cartílago articular

La obtención de las muestras de cartílago articular se realizó mediante biopsia de cartílago humano procedente de cadera y rodilla, articulaciones recogidas de descartes anatómicos por terapias de reemplazo articular o de miembros extraídos por amputación debida a otras patologías. El procesamiento de las muestras se realizó en las 24-72 horas posteriores a cada cirugía.

Cada pieza anatómica de cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial se lavó con suero salino y se cortó con un bisturí de forma paralela a la orientación del cartílago y a ras del hueso subcondral, teniendo en cuenta dos tipos de zonas, una macroscópicamente representativa de lesión y otra macroscópicamente representativa de cartílago intacto y adyacente a la lesión, como se indica en la figura 11. Posteriormente, de las muestras representativas de cada zona, se obtuvieron por duplicado, explantes de cartílago de 6 mm de diámetro y grosor variable (1-4 mm), en función del donante y articulación, con un sacabocados (*Biopsy Punch* 6 mm, Kai medical, Japón). Uno de los explantes se utilizó para su análisis por ER y análisis bioquímico y el otro para su evaluación histomorfológica, como se detalla en los apartados correspondientes de la metodología.

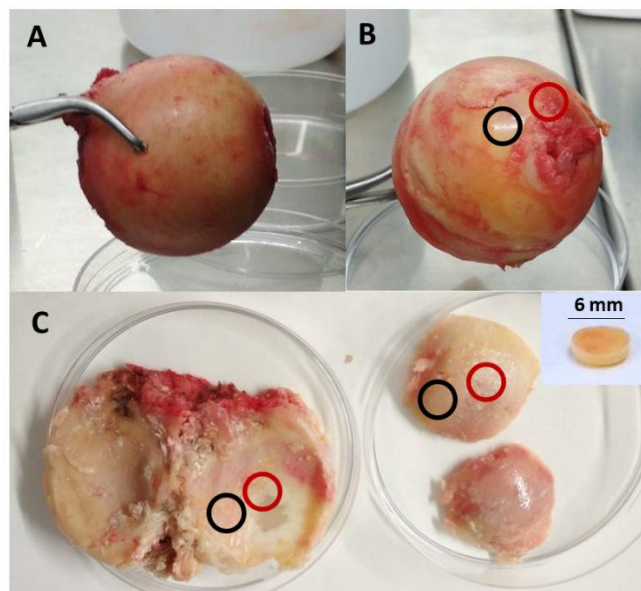


Figura 11. Procesamiento de muestras procedentes de cartílago articular humano. A: cabeza femoral procedente de un donante sano; B: cabeza femoral procedente de un paciente artrósico; C: rodilla procedente de un paciente artrósico (platillo tibial a la izquierda y fragmentos de cóndilo femoral a la derecha). En cada articulación o región anatómica, se identifica la zona lesionada en rojo y el tejido intacto adyacente en negro. En la parte superior derecha de c) se representa un explante de cartílago con 6 mm de diámetro.

El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta realizar los análisis pertinentes.

Se procedió a la clasificación radiológica de la artrosis de rodilla o cadera en los diferentes donantes a partir de las radiografías disponibles en su historial clínico, empleando la escala K-L (0-IV) (Tabla 4) (Kellgren y Lawrence, 1957), utilizando la disponibilidad de radiografía como parámetro de inclusión en el estudio. Por lo tanto, se excluyeron aquellas muestras procedentes de pacientes que carecieran de radiografía de esa articulación en su historial médico, imposibilitando la clasificación de esta a través de la escala K-L. La descripción de los pacientes que forman parte del estudio se detalla en la tabla 5.

Tabla 4. Escala K-L de clasificación del grado radiológico de OA (Kellgren y Lawrence, 1957)

Grado 0: Normal
Aspecto normal de la articulación
Grado I: Dudoso
Dudoso estrechamiento del espacio articular Posible osteofitosis
Grado II: Leve
Posible estrechamiento del espacio articular Presencia osteofitos
Grado III: Moderado
Estrechamiento del espacio articular Osteofitosis moderada múltiple Leve esclerosis Posible deformidad de los extremos de los huesos
Grado IV: Grave
Marcado estrechamiento del espacio articular Abundante osteofitosis y esclerosis

Las biopsias de cartílago humano descritas forman parte de la Colección de muestras para la investigación de enfermedades reumatológicas, autorizada por el Comité Autonómico de Ética da Investigación (CAEIG) (2013/107) y registrada en el Registro Nacional de Biobancos, Sección de Colecciones, con el Código de Registro C.0000424. Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes donantes de las muestras, según la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica, y se garantizó la confidencialidad de los datos identificativos de dichos pacientes, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. El estudio descrito en esta tesis fue aprobado por el CAEIG con el Código de Registro 2018/268.

Tabla 5. Descripción global de los pacientes que forman parte del estudio.

Donantes		Global		Cabeza femoral		Cóndilo femoral + Platillo tibial	
Demografía							
Sexo	Mujeres (M)	n = 42	60,9 %	n = 27	57,4 %	n = 15	68,2 %
	Varones (V)	n = 27	39,1 %	n = 20	42,6 %	n = 7	31,8 %
Edad	Rango	42-94 años		42-94 años		52-83 años	
	Media \pm DE	71 \pm 10 años		72 \pm 12 años		71 \pm 7 años	
Diagnóstico							
Grado radiológico (K-L)	Sano (K-L 0)	n = 6		n = 6		n = 0	
	OA (K-L I-IV)	n = 69		n = 47		n = 22	

4.2. Análisis molecular del cartílago articular por espectroscopía Raman

El análisis de las muestras de cartílago articular por ER se realizó mediante la obtención de espectros empleando un microscopio Raman confocal WITec ALPHA300R+ (WITec *focus innovations*, Alemania) (Figura 12), equipado con un láser de infrarrojo cercano (NIR) de $\lambda=785$ nm, y un sistema de detección compuesto por un detector *CCD back-illuminated* enfriado por Peltier. Todos los componentes y parámetros se controlaron con el software de espectroscopía WITec Project FIVE 5.0.

**Figura 12.** Equipo de espectrometría Raman confocal WITec ALPHA300R+ utilizado en este estudio.

Inmediatamente antes de la medición, se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y se realizaron las medidas sobre la capa superficial del tejido cartilaginoso. Previamente, se optimizaron las condiciones de análisis teniendo en cuenta las

características del tejido, en función de pruebas ensayo-error a partir de una muestra sana (K-L 0) y otra OA (K-L II). La longitud de onda elegida fue la de 785 nm, al observar grandes alteraciones en la línea base del espectro a longitudes más bajas, producto de los efectos de la autofluorescencia provocados por los condrocitos, descritos por otros autores (Butler *et al.*, 2016). Se optimizaron otros parámetros, como la potencia, tiempo de adquisición y número de acumulaciones, con el objetivo de maximizar la relación S/R en el espectro y minimizar el tiempo de exposición de la muestra al láser. Finalmente, las condiciones seleccionadas fueron una potencia de 50 mW, 120 acumulaciones, y tiempo de adquisición de 1 segundo.

Análisis cuantitativo – Biomarcadores ópticos

Para la interpretación de cada espectro, se realizó la corrección de la línea base de las bandas Raman en la región de 800-1800 cm^{-1} y posteriormente, para la obtención de los valores cuantitativos de área (A) para cada pico, se realizó la integración de las señales Raman-Stokes en función de una distribución gaussiana. Este análisis se realizó usando el software MagicPlot 2.7 (Magic Plot Systems, LLC).

Ya que el cartílago, al igual otros tejidos biológicos, representa una matriz compleja, se previó la ocurrencia de diferentes solapamientos de señales, por lo que, a través del software indicado, se realizó el ajuste del sumatorio de las señales al perfil del espectro para su cuantificación, como en el ejemplo indicado en la figura 13.

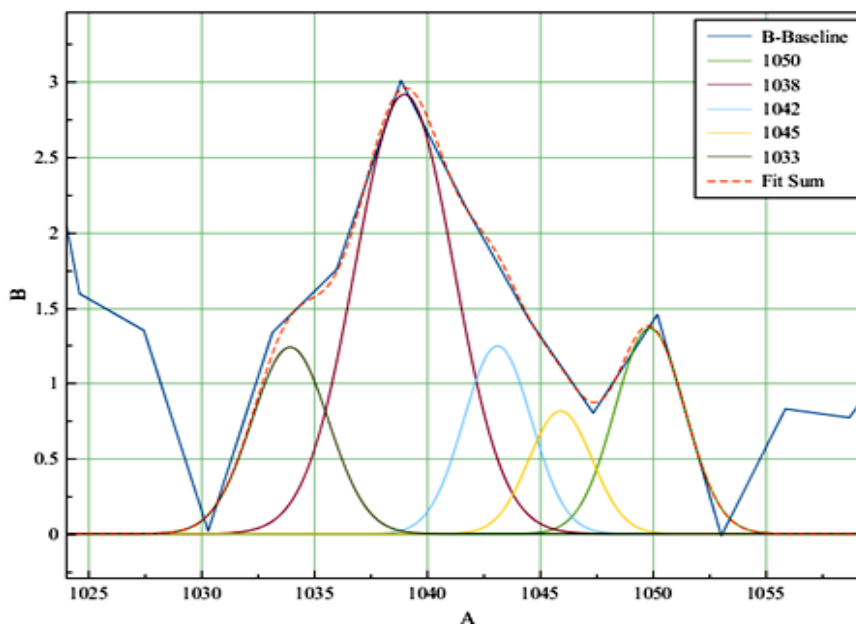


Figura 13. Solapamientos de bandas. Imágenes extraídas del software MagicPlot 2.7, donde el eje X (A) indica el desplazamiento al que aparecen las bandas, y el eje Y (B) la intensidad de la señal. Cada curva de color representa un desplazamiento en función de su distribución gaussiana. La línea roja discontinua se corresponde con el sumatorio ajustado al perfil del espectro.

Una de las limitaciones de los láseres *NIR* para el análisis de tejido biológico, es la obtención de intensidades muy bajas. Además, las fluctuaciones en intensidad de un espectro a otro debido a las irregularidades de las muestras pueden generar desviaciones y requerir normalización (Butler *et al.*, 2016). Por estos motivos, en lugar de trabajar con valores absolutos, se propuso el estudio de los espectros obtenidos en función de diferentes ratios de áreas de pico, para evaluar las alteraciones moleculares en el cartílago durante la progresión de la OA.

Con base en diferentes referencias consultadas, se propusieron una serie de biomarcadores ópticos, con el fin de estimar alteraciones conocidas en tejidos de la articulación incluyendo disminución del contenido de GAGs, desorganización del colágeno o la mineralización de la matriz. Para ello, se tomó la banda a 1004 cm^{-1} como banda de normalización, dado a que se corresponde con el anillo aromático de la fenilalanina (*Phenylalanine, Phe*), aminoácido de estructura química muy estable, y que se mantiene constante en este tejido. Este pico fue descrito previamente por otros autores para este propósito (Esmonde-White *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2015).

En la tabla 6 se recopilan los biomarcadores propuestos y correspondientes ratios para evaluar la composición química del cartílago sano y artrósico y que se detallan a continuación:

a) relacionados con alteraciones en el contenido de GAGs: ratio $1063/1004\text{ cm}^{-1}$ como indicativo del contenido de GAGs sulfatados (SGAGs) y $1039-42/1004\text{ cm}^{-1}$ como indicativo de los GAGs totales (TGAGs) (Lim *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2015). Adicionalmente, por posibles interferencias causadas por la mineralización del tejido, se propuso el ratio $1375/1004\text{ cm}^{-1}$, como alternativo indicativo de PGs (PGs) (Gamsjaeger *et al.*, 2014).

b) relacionados con alteraciones en el colágeno: se tomó el ratio $1245/1270\text{ cm}^{-1}$ como medida de la desorganización de la molécula, estableciendo la proporción de colágeno de cadena con estructura aleatoria o desordenada con respecto a la cadena con estructura de hélice- α (Takahashi *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015), es decir, del colágeno defectivo respecto al funcional (CoD/F);

c) relacionados con la mineralización, como los que se corresponden con los ratios normalizados $960/1004\text{ cm}^{-1}$, $1050/1004\text{ cm}^{-1}$ y $1070/1004\text{ cm}^{-1}$, relacionados con la presencia de grupos fosfato (GMF), depósitos de pirofosfato cálcico dihidratado (CPPD) o apatita carbonatada (GMC). Además, se establecieron como marcadores indirectos

de mineralización, el ratio $960/920\text{ cm}^{-1}$, como indicativo de la fracción de mineralización del tejido respecto a la matriz colagenosa (H/Col) y el ratio $1063/960\text{ cm}^{-1}$, como indicativo de la matriz de proteoglicanos funcional respecto a la mineralizada no funcional (C/H) (Esmonde-White et al., 2011).

d) Adicionalmente, se propuso un parámetro indicativo de componentes minoritarios como son los lípidos, mediante el ratio de señales inespecíficas $1450/1670\text{ cm}^{-1}$, que se configura calculando la relación entre una señal inespecífica de lípidos y proteínas, normalizada respecto a una señal indicativa de las proteínas totales (índice lipídico indirecto - IL) no descrito anteriormente en la literatura revisada con respeto a tejidos cartilagosos.

Tabla 6. Propuesta de biomarcadores ópticos de la composición del cartílago artrósico a partir de la espectroscopía Raman.

Biomarcador Óptico	Componente molecular/evento asociado	Abreviatura	Definición
960/1004 cm^{-1}	Mineralización por fosfato	GMF	Grado de mineralización relacionado con la presencia de los grupos fosfato de la hidroxiapatita
960/920 cm^{-1}	Hueso/Colágeno	H/Col	Relación entre el tejido mineralizado y la matriz colagenosa
1039-42/1004 cm^{-1}	GAGs totales	TGAGs	Glicosaminoglicanos totales (anillo piranosa)
1050/1004 cm^{-1}	CPPD	CPPD	Depósitos de pirofosfato cálcico
1063/1004 cm^{-1}	GAGs sulfatados	SGAGs	GAGs sulfatados (grupo sulfato)
1063/960 cm^{-1}	Cartílago/hueso	C/H	Relación entre la matriz cartilaginosa (GAGs) y el tejido mineralizado
1070/1004 cm^{-1}	Mineralización por carbonato	GMC	Grado de mineralización relacionado con la presencia de los grupos carbonato de la hidroxiapatita carbonatada
1245/1270 cm^{-1}	Colágeno defectivo/funcional	ColD/F	Relación entre el colágeno de cadena desorganizada (defectivo) y de estructura ordenada de hélice α (funcional)
1375/1004 cm^{-1}	Proteoglicanos	PGs	Contenido de proteoglicanos
1450/1670 cm^{-1}	Índice lipídico indirecto	IL	Relación entre la señal inespecífica de lípidos y proteínas, normalizada respecto a la cantidad total de proteínas

Se utilizó como señal de normalización la banda de la fenilalanina (*Phe*) (1004 cm^{-1}).

4.3. Análisis histológico-histoquímico

4.3.1. Inclusión de muestras

Los explantes de cartílago destinados al análisis histológico se incluyeron en parafina para su posterior evaluación histológica. Para ello, se fijaron los explantes de cartílago en fresco en formaldehído 3,7-4% (Panreac AppliChem, Alemania) durante toda la noche. Tras la fijación, se lavaron con agua destilada y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado, Panreac AppliChem, Alemania), finalizando en una inmersión en xileno (Panreac AppliChem, Alemania), en un procesador de tejidos para infiltración STP 120 (Myr, España). Este proceso se realizó con cada muestra de tejido emplazada en un casete para microbiopsia (Labolan, España).

Para la inclusión, se utilizó parafina en lentes (Histotec® Pastilles, Merck, Alemania). Para la obtención de parafina fluida, se calentó a 57-60°C utilizando un centro de inclusión de tejidos Leica EG 1120 (Leica, Alemania). En un molde metálico para casetes (Labolan, España) por cada muestra, se vertió un fondo de parafina líquida, se colocó el casete con la muestra contenida en la orientación adecuada, se rellenó de nuevo con parafina y se dejó solidificar en refrigeración. Los bloques se almacenaron a temperatura ambiente.

A partir de los bloques de parafina, se realizaron cortes de 4 µm de grosor, con un microtomo de rotación Leica RM 2255 (Leica, Alemania). Los cortes se vertieron sobre un baño de flotación (Leica HI 1210, Leica, Alemania) y estos se adhirieron sobre portaobjetos de vidrio tratado (SUPERFROST PLUS®, Thermo Scientific, EE. UU). Los cortes se secaron durante 24h, a 37°C, en estufa.

4.3.2. Tinciones histológicas

Antes de realizar las tinciones, se desparafinaron y rehidrataron los cortes para permitir su coloración. Para ello, se colocaron los portaobjetos en gradillas de cristal aptas para cubetas de tinción, y se introdujeron en una estufa a 60°C (IDL AI36, Labolan, España) en intervalos de 10 min, para la fusión parcial de la parafina. Posteriormente, se realizaron las siguientes inmersiones: 5 min en xileno (Panreac AppliChem, Alemania) para completa desparafinación; 5 min en etanol absoluto (Panreac AppliChem, Alemania) como primer paso de hidratación; 5 min en etanol 96° preparado desde etanol absoluto como segundo paso de hidratación y 5 min en agua destilada para su completa hidratación.

Tras la desparafinación e hidratación, se realizaron las tinciones correspondientes para evaluar la degradación del cartílago histoquímica e histomorfológicamente. Los cortes fueron examinados con un microscopio Leica DM 2000 LED (Leica, Alemania), tomando fotografías a magnificaciones de 4x, 10x y 20x.

a) Hematoxilina-Eosina (H-E)

La hematoxilina es un compuesto catiónico/básico, que tiene afinidad por las estructuras ácidas (basófilas). Tiñe de color morado/violáceo estructuras celulares ácidas como son los núcleos celulares, tras ser oxidada a hemateína, compuesto de este color. La eosina es un colorante ácido de color rosado, que tiñe sustancias afines básicas (acidófilas), como el citoplasma celular. La combinación hematoxilina-eosina permite evaluar la degradación del cartílago en términos de anomalías celulares, además de permitir estudiar defectos o fisuras en su estructura.

La tinción se realizó mediante inmersión en Hematoxilina de Harris comercial (Bio-Optica, Italia) durante 5 min. Se realizó un aclarado, y posteriormente se sumergieron los portaobjetos en eosina acuosa 0,7 ‰, preparada a partir del reactivo comercial sólido (Panreac, EE. UU), por 5 min. Tras la tinción, los cortes se deshidrataron realizando dos pases en etanol 96°C y realizando una inmersión de 5 min en etanol absoluto y posteriormente en xileno. Los portaobjetos se montaron con medio de montaje DPX (Leica Biosystems, Países Bajos).

b) Safranina O/Verde rápido (SO/VR)

La safranina-O es un colorante catiónico que se asocia con estructuras químicas aniónicas. En cartílago, tiene afinidad por estructuras como los grupos carboxilo del AH o los grupos sulfato de los GAGs, principales componentes del cartílago articular funcional. El verde rápido se trata de un colorante inespecífico de color verde, que tiñe tanto la matriz proteica del cartílago como el hueso subcondral. La combinación de estas dos tinciones en el análisis de cartílago permite un contraste diferenciado de las regiones anatómicas del tejido que presentan mayor cantidad de GAGs y AH, teñidas en rojo anaranjado, con respecto a las regiones de matriz más rica en proteínas colagenosas, teñidas en verde. La intensidad o ausencia de tinción por safranina-O constituye otro parámetro en el análisis de la degradación del cartílago articular, relacionando la reducción de coloración anaranjada con una reducción de PGs en la matriz. Esta técnica se utiliza tanto para la observación de defectos en la estructura como para valorar las alteraciones en la cantidad de PGs en la MEC durante la progresión de la OA.

La tinción SO/VR se realizó por inmersión en safranina-O alcohólica durante 30 min. La solución de safranina-O utilizada fue preparada mediante una dilución 1:10 en etanol 50° a partir de una disolución stock 33 g/L en etanol 50° preparada a partir del reactivo comercial sólido (Sigma-Aldrich, Alemania). Tras un aclarado, se tiñó con verde rápido, realizando 3 pases breves. El verde rápido se preparó diluyendo 1 g de reactivo sólido (Sigma Aldrich, Alemania) en 100 mL de agua acética 0,5%. Tras esta tinción se realizó la deshidratación con etanol absoluto, xileno, y se montaron los portaobjetos con medio DPX.

c) Azul de toluidina (AT)

El azul de toluidina es un colorante catiónico (básico) metacromático con afinidad similar a la safranina-O. Este colorante es de color azul intenso, pero vira a una tonalidad más rosada ante compuestos aniónicos, tiñendo la MEC, rica en proteoglicanos, de color morado. Esta técnica se usa como confirmación de la safranina-O, para evaluar alteraciones en los PGs en la MEC del cartílago. La tinción se realizó por inmersión de las muestras en una disolución de Azul de Toluidina (Merck, Alemania) 0,2% en tampón acetato-acético pH 4.2 por 5 min, y posterior pase en un tampón acetato-acético pH 4.2. Las muestras se deshidrataron y montaron de forma análoga a las tinciones de H-E.

d) Rojo Alizarina (RA)

El rojo alizarina es un colorante utilizado para la detección de cristales o depósitos de calcio, que se colorean de un color rojo muy intenso. La tinción se realizó por inmersión en solución acuosa 20 g/L de Rojo Alizarina (Panreac AppliChem, Alemania) durante 5 min, con pases posteriores en acetona, acetona:etanol 1:1, y fijación en xileno. El montaje se realizó con medio DPX.

e) Von Kossa (VK)

La tinción *Von Kossa* es usada para la detección indirecta de la mineralización. Se fundamenta en la sustitución de iones calcio presentes en la muestra por iones plata por acción de la radiación ultravioleta y posterior visualización de la plata, como regiones del tejido coloreadas de negro, gris o marrón. Para la realización de esta tinción, se empleó un kit *Von Kossa* (ab150687, Abcam, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El primer paso consistió en una incubación en la solución de nitrato de plata al 5% por 60 min expuesto a luz ultravioleta, y posterior incubación en la solución de tiosulfato de sodio al 5%, por 3 min. Seguidamente, los portaobjetos se enjuagaron con agua corriente y realizando dos pases en agua destilada de forma posterior. Una vez enjuagados, se incubaron en el reactivo *Nuclear Fast Red*, por 5 min. Se realizó un

nuevo enjuague en agua, seguido de la deshidratación en alcohol absoluto y montaje con DPX.

4.3.3. Evaluación de degradación de cartílago articular utilizando escala de Mankin modificada

La degradación del cartílago fue evaluada de acuerdo con la escala de Graduación Histológica-Histoquímica de Mankin modificada (Pascual Garrido *et al.*, 2009). Por simplificación se mantendrán las siglas *MS* en el marco de esta tesis. La clasificación de las muestras según su *MS* se realizó mediante la evaluación de las tinciones de Hematoxilina-Eosina (H-E), según la metodología indicada, además de las de Safranina-O/Verde Rápido (SO/VR) y Azul de Toluidina (AT), considerando *subscore* I (SI) – defectos en la estructura (0-7); *subscore* II (SII) – anormalidades celulares (0-2) y *subscore* III (SIII) – tinción de la matriz (0-4), los cuales suman un total de *MS*: 0-13 (Tabla 7). La tinción de H-E fue empleada para evaluar la estructura del tejido y celularidad, asociados a los *subscores* I y II, mientras que las tinciones de SO/VR y AT se utilizaron para evaluar la presencia de GAGs en la matriz, asociada al *subscore* III.

Tabla 7. Escala de Mankin modificada (Pascual Garrido *et al.*, 2009)

Parámetro	Grado
I. Defectos en la estructura	
Normal	0
Irregularidades en la zona superficial	1
Ausencia de zona superficial	2
Superficie irregular	3
Hendiduras en la capa intermedia (transición)	4
Ligera desorganización	5
Hendiduras en la zona profunda	6
Completa desorganización de la estructura	7
II. Anormalidades celulares	
Normal	0
Hipocelularidad	1
Presencia de clones	2
III. Tinción de la matriz	
Normal	0
Reducción en la zona de transición	1
Reducción en la matriz de las zonas intermedia a profunda	2
Reducción en la matriz territorial, presencia de tinción en la interterritorial	3
Reducción en ambas matrices territorial e interterritorial	4
MS Total	13

4.4. Análisis bioquímico

La metodología para el análisis bioquímico (GAGs sulfatados y colágeno total) de las muestras de cartílago articular fue adaptada de Kafienah y Sims, (Kafienah y Sims, 2004) y Hoeman *et al.*, (Hoemann *et al.*, 2002) en función de las cantidades e instrucciones detalladas por el fabricante de cada kit comercial empleado. Esta metodología se encuentra resumida en la figura 14.

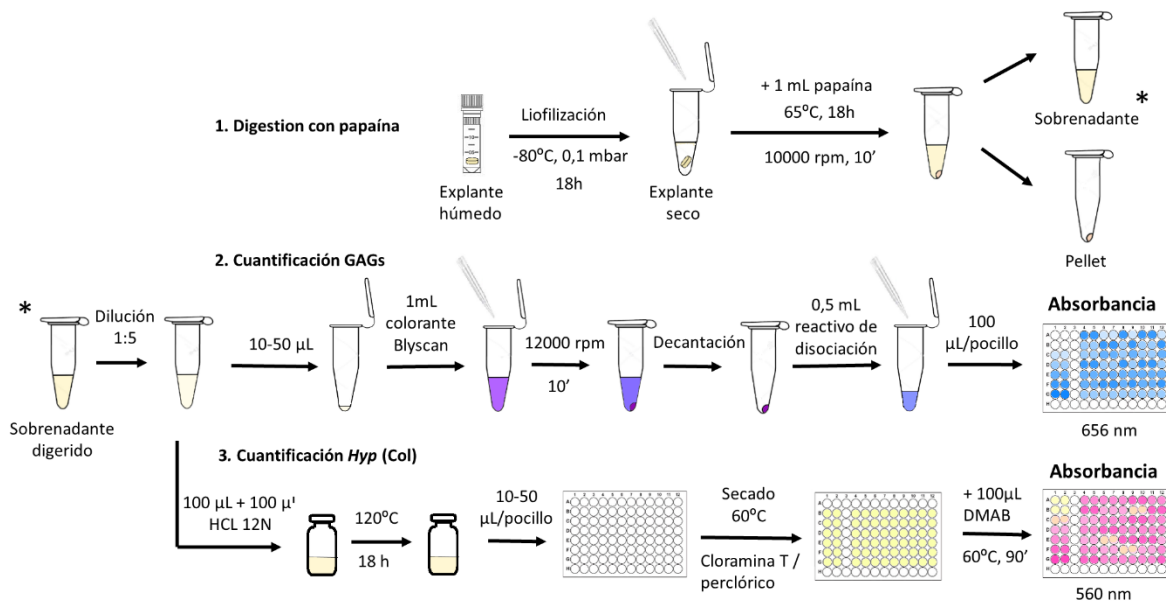


Figura 14. Esquema resumen de la metodología empleada en el análisis bioquímico.

Para este estudio se utilizaron explantes de cartílago del subconjunto de muestras de cabeza femoral en los cuales se realizaron previamente los análisis por espectroscopia Raman, preservándose los explantes a -80°C hasta el momento del análisis.

Por esto, se realizó previamente una evaluación de los posibles efectos del láser *NIR*, para garantizar que la exposición al laser no afecta la integridad del tejido y a los parámetros a determinar en este apartado, tal como se detalla en la figura 15. Para la evaluación de estos efectos se seleccionaron 3 muestras de cartílago de cabeza femoral procedentes de 3 donantes sanos ($n=9$). Una muestra por donante fue empleada para el análisis histológico previo (H-E, SO/FG y AT) y otro para la cuantificación bioquímica (sGAGs e *Hyp*), ambos tomados como referencia. La tercera muestra fue sometida a un tiempo de exposición al láser *NIR* ($\lambda=785\text{ nm}$) de 10 minutos, tras el cual se avaluó histológicamente y se realizaron los ensayos bioquímicos tal como se detallan en esta metodología (apartados 4.4.1, 4.4.2 y 4.4.3).

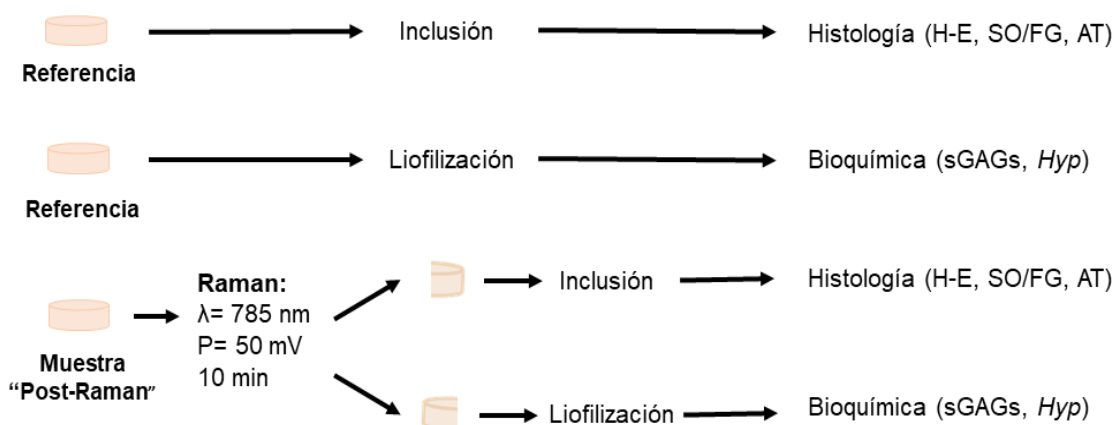


Figura 15. Esquema de la metodología empleada para determinar los efectos del láser *NIR* ($\lambda=785$ nm) en cartílago.

4.4.1. Digestión de tejido para cuantificación de sGAGs y colágeno

Las muestras de cartílago almacenadas a -80°C se liofilizaron durante 18h, en un liofilizador Telstar, Cryodos (Telstar, España), a condiciones estandarizadas de -80°C y 0,1 mbar. Una vez secas y pesadas las muestras (determinación del peso seco), se introdujeron en tubos Eppendorf de 1,5 mL (Eppendorf, España) para su digestión. El peso húmedo se determinó directamente cuando se recogieron los explantes post-cirugía, tal como se indica en el apartado 4.1 de esta metodología.

El medio de digestión se preparó a partir de una disolución 0,2 M de tampón fosfato $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 6,4, preparado a partir de los reactivos sólidos anhidros (Sigma-Aldrich, Alemania) y agua estéril (BD, España). Por cada 50 mL de tampón fosfato se añadieron 400 mg de acetato de sodio (Merck, Alemania), 200 mg de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético, Sigma-Aldrich, Alemania), y 40 mg de cisteína-ácido clorhídrico Cys-HCl (L-cisteína HCL monohidrato, Sigma-Aldrich, Alemania). Una vez todos los componentes estuvieron disueltos, se añadieron 250 μL de suspensión de papaína 21 mg/mL (Sigma-Aldrich, Alemania) y se almacenó a 4°C .

Se añadió a cada muestra, 1 mL de medio de digestión. La digestión se realizó a 65°C , durante 18h, en termobloque (*Dry Bath* D1301-130V, Single block + D1105A, Labnet, EE.UU). Pasado ese tiempo, los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm, durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido de esta forma contiene los GAGs y colágeno. Se almacenó a -80°C hasta la realización de los ensayos.

4.4.2. Cuantificación de GAGs sulfatados

Para la cuantificación de GAGs sulfatados (sGAGs) se empleó el kit comercial *Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay* (Biocolor, España). Para ello, se añadieron en un tubo de microcentrífuga, 10-100 μL del digerido de papaína o dilución (dilución 1:5 o 1:10). A cada tubo se añadió 1 mL del reactivo colorante de Blyscan y se agitaron por inversión en intervalos de 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 12.000 rpm, durante 10 minutos. El precipitado obtenido de esta forma contiene los sGAGs complejados con el colorante. Se decantó el sobrenadante, se añadieron 500 μL del agente de disociación facilitado en el kit y se resuspendió el precipitado en un vórtex, hasta total disolución, obteniendo una única fase de coloración azul directamente proporcional al contenido de sGAGs. De la misma forma que las muestras a medir, se prepararon los patrones de calibrado, añadiendo en tubos de microcentrífuga de 0 a 5 μg de sGAGs, a partir del estándar de referencia de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ incluido en el kit. De esta forma se obtuvieron curvas de calibrado como la mostrada en la figura 16.

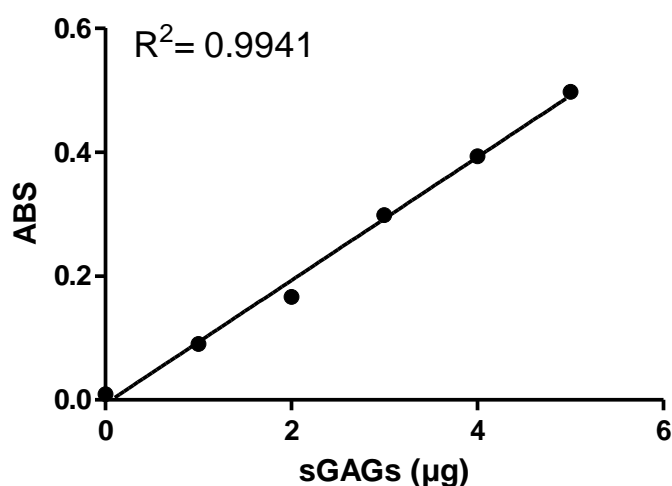


Figura 16. Recta de calibrado para la cuantificación de sGAGs. El eje X representa la cantidad de sGAGs (μg) y el eje Y las correspondientes medidas de absorbancia (ABS).

Se cargó una placa de 96 pocillos (Microtitre Plate 96-well/Flat Bottom, Thermo Scientific, UK) con 100 μL /pocillo para cada muestra y patrón de calibrado, por duplicado. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 656 nm en un lector de placas, Sinergy HTX (BioTeK, EE.UU).

4.4.3. Cuantificación de colágeno total

La cuantificación del colágeno se realizó de forma indirecta, empleando un kit de cuantificación de hidroxiprolina (*Hyp*) (Sigma-Aldrich, Alemania).

En primer lugar, se realizó la hidrólisis ácida del digerido de papaína, añadiendo HCl concentrado al 37% (Panreac AppliChem, Alemania) a razón de 1:1 en volumen, en viales de vidrio borosilicatado (Lab Logistics Group, Alemania) con tapones sellados con teflón (Lab Logistics Group, Alemania).

La hidrólisis se realizó a 120°C, durante 18h, en termobloque (Labnetlink, China). Tras la hidrólisis, se cargó en una placa de 96 pocillos, un volumen de 10-50 µL de cada muestra, por duplicado. Para realizar la curva de calibrado, se añadieron cantidades crecientes de una dilución 1:10 preparada a partir del estándar de *Hyp* (1 mg/mL), generando una curva de 0 a 1 µg (Figura 17). El contenido de los pocillos se evaporó a 60°C, en estufa de desecación.

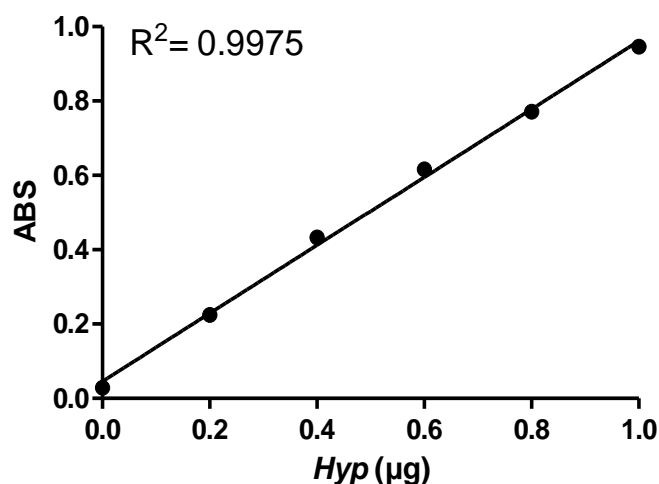


Figura 17. Recta de calibrado para la cuantificación de *Hyp*. El eje X representa la cantidad de *Hyp* (µg) y el eje Y las correspondientes medidas de absorbancia (ABS).

Para realizar las reacciones fue necesario preparar previamente los reactivos:

- Mezcla Cloramina T/tampón de oxidación: se preparó añadiendo 94 µL del tampón de oxidación incluido en el kit y 6 µL de Cloramina T por cada pocillo a analizar.
- Disolución de dimetilaminobenzaldehído (*DMAB*): se preparó añadiendo 50 µL de *DMAB* y 50 µL de la solución perclórico/isopropanol incluida en el kit.

Una vez secos los pocillos, se añadieron 100 µL de la mezcla Cloramina T/tampón de oxidación y se incubó 5 minutos, a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadieron 100 µL de la disolución de *DMAB* y se incubaron a 60°C, durante 90 min, sellando la placa con Parafilm. La intensidad de coloración rosada obtenida es

proporcional al contenido de *Hyp* (Figura 18). La absorbancia fue medida en lector de placas Sinergy HTX (BioTek, EE. UU) a una longitud de onda de 560 nm.

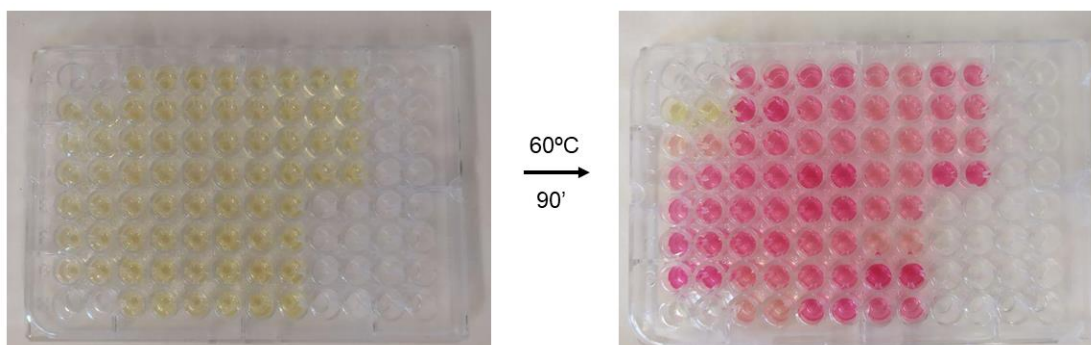


Figura 18. Ensayo de cuantificación de *Hyp*, antes y después de la reacción.

4.5. Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos, se utilizó el software estadístico R (3.5.3). El número de muestra n para cada análisis se detalla en el correspondiente apartado de los resultados.

Análisis cuantitativo

Para el análisis cuantitativo de los resultados, se calcularon las medias y desviaciones estándar (DE) de cada parámetro/ratio del perfil biomarcador propuesto, calculado en base a las áreas de banda.

Para detectar si existen diferencias significativas entre los parámetros calculados, se tomaron como referencia tanto los diferentes grados K-L, como el *MS* total y sus correspondientes subcategorías (*MS-SI*, *MS-SII*, *MS-SIII*).

Se realizaron pruebas de Krustal-Wallis entre los valores obtenidos para cada parámetro Raman, para los diferentes subconjuntos de muestras (cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial – lesión y adyacente) con el fin de detectar diferencias significativas entre los diferentes grupos de las escalas de referencia empleadas (grado K-L, *MS*), considerando existencia de significancia cuando $p < 0,05$.

La significancia entre categorías 2 a 2 se calculó en función del número de muestras aplicando el ajuste de Bonferroni. En vías de determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre tejido lesionado y el intacto adyacente a la lesión, se realizaron pruebas no paramétricas de Mann Whitney para cada parámetro Raman y grado K-L o rango de *MS*.

Se determinaron las correlaciones existentes entre los parámetros Raman estudiados y las escalas de referencia utilizadas, mediante el cálculo de coeficientes *rho* de Spearman. Las correlaciones se consideraron significativas (pendiente estadísticamente distinta a cero) cuando $p < 0,05$.

Análisis bioquímico

El estudio de correlaciones entre el contenido de sGAGs y Col total para el subconjunto de muestras de cartílago procedente de cabeza femoral (zona macroscópica – lesión) tanto con el aumento de la severidad de la OA (K-L) o degradación del cartílago (*MS*), como con los parámetros Raman (SGAGs, TGAGs, PGs, ColD/F y H/Col), se realizó mediante el cálculo de coeficientes *rho* de Spearman. Las correlaciones se consideraron significativas (pendiente estadísticamente distinta a cero) cuando $p < 0,05$.

Análisis clúster

Se realizó un análisis de clústeres, tanto para el global de muestras (cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial - zona lesión macroscópica) como el subconjunto de muestras de cabeza femoral, aplicando el método de partición mediante *k-means* para identificar aquellos pacientes con patrones similares de manifestación de artrosis, y por lo tanto identificar perfiles diferenciados de severidad de OA, en función a las variables correspondientes a los parámetros Raman seleccionados (SGAGs, ColD/F, GMF).

El método comienza con *k* grupos, entre los cuales los pacientes se mueven en iteraciones con el objetivo de minimizar la variabilidad dentro de los grupos y maximizar la variabilidad entre grupos. Se utilizó la distancia euclidiana como medida de similitud entre los diferentes perfiles. Se empleó una gráfica de las sumas de cuadrados totales dentro de los grupos frente al número de grupos como criterio para elegir el número de *k* óptimo (método del codo). Como resultado, se ejecutó el análisis de clúster para $k=2$ grupos, tanto para el global de muestras, como para el subconjunto de muestras de cabeza femoral. Finalmente, se evaluó el grado de severidad de OA según el grado K-L y según el *MS* de los diferentes perfiles determinados.

Modelos predictivos

Se establecieron modelos predictivos de severidad de OA mediante modelos de regresión logística multivariados, tomando como variable respuesta el diagnóstico de

OA severa. Se definió como OA severa un valor igual o superior a III en el grado K-L (K-L \geq III vs <III) y una puntuación igual o superior a 9 en el MS (MS \geq 9-13 vs <9).

Se calcularon los *odds ratio* (OR) para cada variable (parámetros Raman SGAGs, CoID/F, GMF, edad y sexo), que permiten estudiar el impacto de cada variable en la predicción de la severidad de OA, considerando que un parámetro repercute de forma significativa en la predicción cuando $p < 0,05$.

Para discretizar los parámetros Raman (SGAGs, CoID/F y GMF), se utilizaron modelos de regresión logística univariados para cada parámetro. Los puntos de corte se determinaron mediante el índice de Youden tras evaluar la capacidad predictiva de cada parámetro mediante curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*), utilizando como variable respuesta la severidad de OA. Para constituir los modelos predictivos frente al grado K-L o MS, se emplearon, por tanto, los parámetros Raman (SGAGs, CoID/F y GMF) tanto como variables continuas como dicotómicas o codificadas, teniendo en cuenta los puntos de corte determinados.

Se evaluó la capacidad predictiva de cada modelo mediante curvas ROC, aportando el área bajo la curva (*Area Under Curve, AUC*) y los valores de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN), con sus correspondientes intervalos de confianza (IC) al 95%. Se consideraron “buenos” los modelos con un área bajo la curva entre 0,7 y 0,8, “muy buenos” cuando el $AUC = 0,8-0,9$, y “excelentes” cuando $AUC > 0,9$. Valores de AUC de 0,5 indican ausencia de valor predictivo (Lasko *et al.*, 2005; Fawcett, 2006).

En base a los modelos predictivos descritos, se construyeron los correspondientes nomogramas y se establecieron puntuaciones o *scores*, relacionados con una mayor o menor severidad de OA en función del grado K-L o MS.

Resultados

5. Resultados

5.1. Análisis cualitativo

En primer lugar, y para la realización de análisis tanto cualitativo como cuantitativo posterior, se realizó el análisis y caracterización de la severidad y degradación de las muestras de cartílago en función de las dos escalas de referencia utilizadas en el estudio.

5.1.1. Caracterización radiológica Grado K-L

Las figuras 19 y 20 presentan radiografías representativas de los distintos grados K-L en las dos articulaciones de este estudio: cadera (cabeza femoral - Figura 19) y rodilla (cóndilo femoral y platillo tibial – Figura 20). El grado K-L 0 se corresponde con la morfología normal de ambas articulaciones. En las radiografías de grado I se puede observar, tanto en cadera como rodilla, un leve o dudoso estrechamiento del espacio articular y presencia de pequeños osteofitos. En las radiografías de grado K-L II se aprecian un mayor tamaño de osteofitos, esclerosis y el estrechamiento del espacio articular. Todos estos fenómenos están más acentuados en las radiografías de pacientes K-L III, en las que se observa un mayor estrechamiento del espacio articular que en grados anteriores. Por último, en pacientes con OA más severa (K-L IV), ambas articulaciones presentan deformidad, y se puede observar el contacto hueso-hueso.



Figura 19. Imágenes radiográficas representativas de cabeza femoral utilizadas para la graduación de severidad de OA según escala Kellgren-Lawrence (K-L 0 a IV).

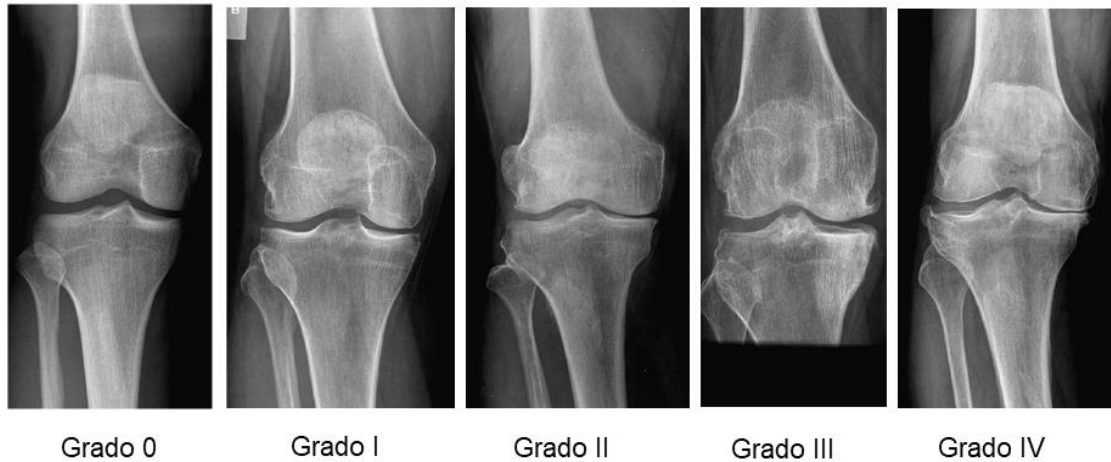


Figura 20. Imágenes radiográficas representativas de rodilla utilizadas para la graduación de severidad de OA según escala Kellgren-Lawrence (K-L 0 a IV).

5.1.2. Caracterización histológica MS

Se realizaron las tinciones y caracterización histológica de las muestras según la escala *Mankin Score* modificada, que se agruparon para análisis posteriores, en los rangos 0-2 (ausencia de lesión) 3-5 (lesión leve), 6-8 (lesión moderada), 9-11 (lesión severa) y 12 o superiores (lesión muy severa), de forma análoga a la referida por Acebes *et al.* (Acebes *et al.*, 2009). La figura 21 muestra ejemplos de las tinciones realizadas en cartílago en los diferentes rangos de degradación establecidos.

En función de los diferentes grupos de MS, se pueden observar una superficie regular y una tinción de proteoglicanos intensa en las muestras en el rango 0-2, irregularidades leves en la superficie y ligera pérdida de proteoglicanos en las muestras de MS 3-5, lesiones hacia la capa intermedia y una mayor reducción de tinción por Safranina-O en las muestras de MS 6-8, y lesiones más profundas y reducción notoria de proteoglicanos en las muestras de MS 9-11. En las muestras de mayor degradación (MS 12+) se observa una completa desorganización de la estructura y una reducción severa de la tinción de proteoglicanos. Las muestras de degradación superior a 6 comúnmente presentan anomalías celulares como hipocelularidad o presencia de clones (Figura 21).

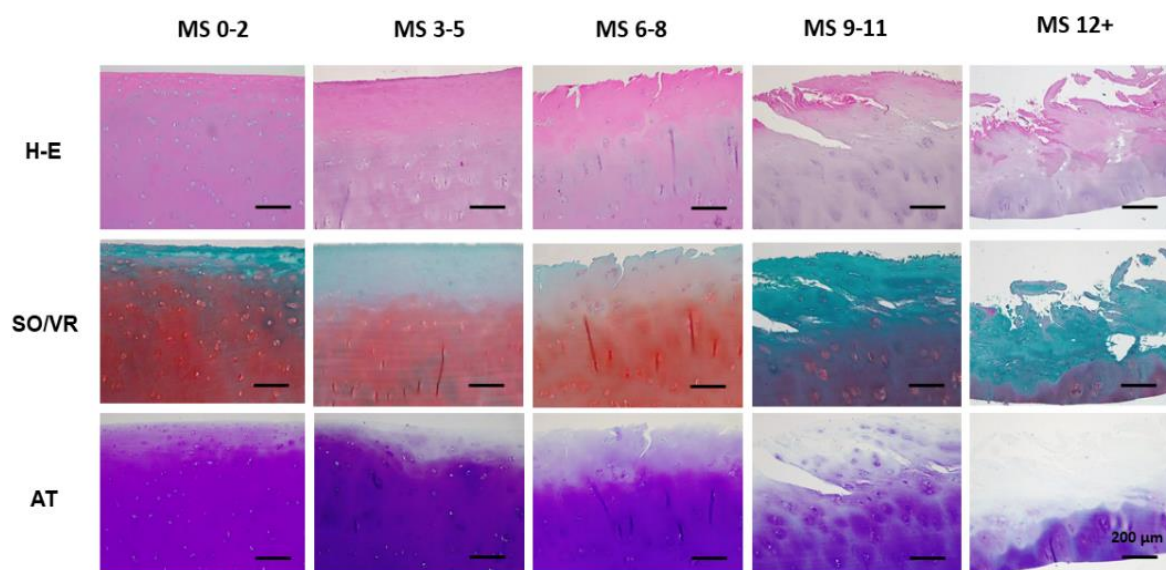


Figura 21. Tinciones realizadas para la evaluación del Mankin Score modificado: Hematoxilina-Eosina (H-E), Safranina-O/Verde Rápido (SO/VR) y Azul de Toluidina (AT) con respecto a los diferentes rangos de degradación (MS total: 0-2 a 12+) (Escala: 200 μm).

5.1.3. Caracterización por espectroscopía Raman: análisis cualitativo de cartílago articular procedente de donantes sanos

Para la caracterización molecular del cartílago articular humano por espectroscopía Raman se tomaron como referencia muestras de cartílago procedentes de donantes sanos con ausencia de lesión macroscópica y que presentaban un valor de 0 en la escala radiológica K-L.

La figura 22 representa un espectro Raman obtenido para el cartílago articular de cabeza femoral sana, en la que se señalaron las diferentes bandas, en la región de 800-1800 cm^{-1} , de acuerdo con los antecedentes encontrados y otras publicaciones genéricas, referentes a desplazamientos Raman tabulados (Tabla 2 - introducción).

Las principales señales identificadas, fueron las obtenidas a desplazamientos: 850-880 cm^{-1} , correspondientes a la tensión de enlace C-C del anillo de los aminoácidos prolina e hidroxiprolina; 920-8, correspondiente a la tensión C-C de la prolina (*Pro*); 940 cm^{-1} , correspondiente tanto a la tensión simétrica del enlace O-glucosídico como a la tensión del C-C proteico; 1004 cm^{-1} , señal correspondiente con la tensión del anillo aromático del aminoácido fenilalanina (*Phe*), posteriormente utilizada para la normalización de diferentes señales debido a la estabilidad de su señal (Esmonde-White *et al.*, 2011; Kunstar *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2015); 1042 cm^{-1} , señal asignada a la tensión C-O-C, del anillo piranosa de los GAGs (Lim *et al.*, 2011); 1063 cm^{-1} , señal asignada a la tensión simétrica de O-SO₃⁻ de los GAGs sulfatados (Esmonde-White *et*

al., 2011; Lim *et al.*, 2011; Kunstar *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015); 1245 cm^{-1} y 1270 cm^{-1} , señales correspondientes a la tensión C-N de la amida III del colágeno y su estructura en cadena desorganizada o estructurada en hélice α , respectivamente (Takahashi *et al.*, 2014; Richardson *et al.*, 2015); 1375 cm^{-1} , correspondiente a la tensión simétrica del grupo CH_3 , relacionada con los PGs (Gamsjaeger *et al.*, 2014); 1450 cm^{-1} , señal correspondiente a modos vibracionales de deformación $\delta(\text{CH}_2)$ de los lípidos y proteínas (Esmonde-White *et al.*, 2011; Richardson *et al.*, 2015) y 1670 cm^{-1} , señal asignada a la tensión C=O de la amida I presente en el colágeno y otras proteínas (Esmonde-White *et al.*, 2011; Kunstar *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2015).

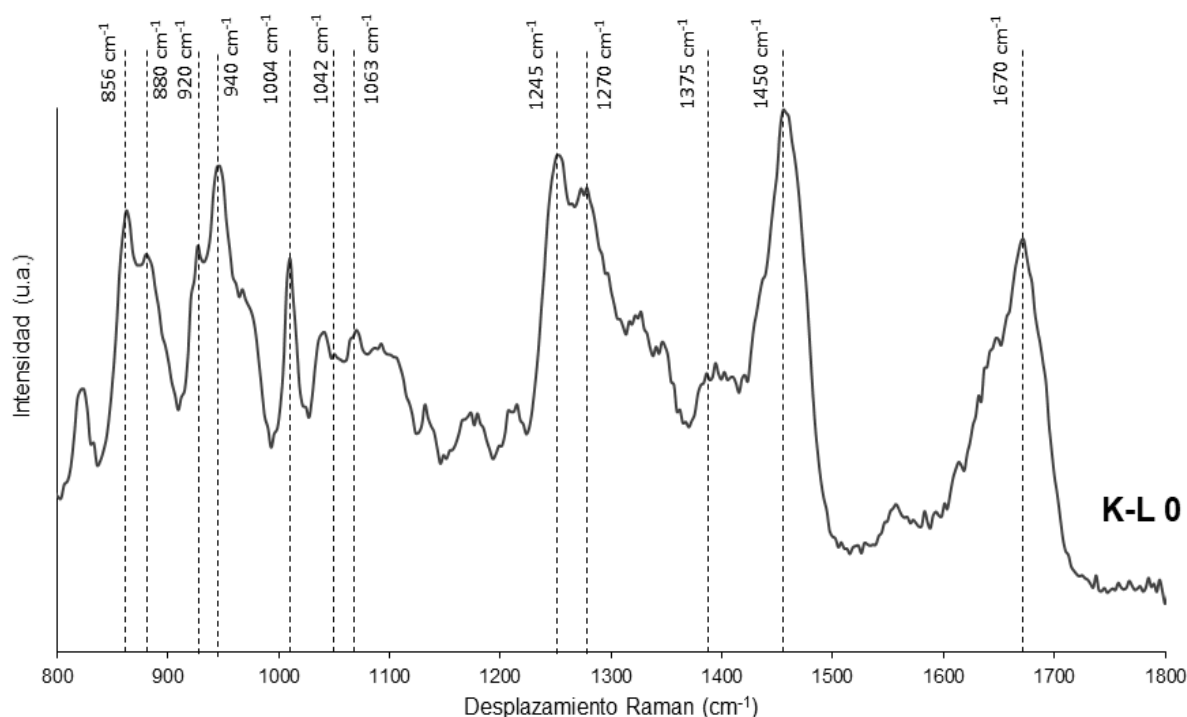


Figura 22. Espectro Raman de cartílago articular procedente de cabeza femoral de donantes sanos. Espectro realizado con un láser NIR $\lambda=785$ nm, 50 mW, 120 acumulaciones.

Las diferentes bandas Raman-Stokes obtenidas constituyen, por lo tanto, la huella molecular del cartílago articular humano procedente de la cabeza femoral. Sus asignaciones se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Principales asignaciones de las señales obtenidas en el espectro de cartílago procedente de la cabeza femoral de donantes sanos.

Desplazamiento (cm ⁻¹)	Tipo de enlace/molécula asignada	Componente	Referencias (primer autor, año)
850-880 856-8 875-80	Tensión C-C proteico <i>Pro</i> (C-C-N) <i>Hyp</i> (HO-C-C-N)	Colágeno	Socrates, 2005; Lim, 2011; Richardson, 2015
920-8	Tensión C-C <i>Pro</i>	Colágeno	Esmonde-White, 2011; Richardson, 2015
932-941 932-938 937-941	Tensión simétrica C-C proteico C-O-C enlace α1-4 glucosídico	Proteínas GAGs	Movasaghi, 2007; Lim, 2011; Kunstar, 2012; Richardson, 2015
1004	Tensión anillo aromático Fenilalanina (Phe)	Proteínas	Esmonde-White., 2011; Kunstar, 2012; Richardson 2015
1039-42	Tensión C-O-C Anillo piranosa	GAGs	Socrates, 2005; Lim, 2011; Casal-Beiroa., 2019
1060-4	O-SO ₃ ⁻ tensión simétrica	GAGs sulfatados, PGs	Esmonde-White , 2011; Lim, 2011; Kunstar, 2012; Gamsjaeger, 2014; Kumar, 2015; Casal Beiroa, 2018; Casal-Beiroa, 2020c
1230-1280 1245 1270	Amida III – Tensión C-N - Cadena desordenada - Cadena ordenada	Colágeno - Defectivo - Funcional	Socrates, 2005; Lim, 2011; Gamsjaeger, 2014; Takahashi, 2014; Kumar, 2015; Richardson, 2015; Casal Beiroa, 2018; Casal-Beiroa, 2019; Casal-Beiroa, 2020c
1375-80	Tensión simétrica CH ₃ (entorno carbonilo)	GAGs, PGs	Gamsjaeger, 2014
1441-60	Flexión CH ₂	Lípidos y proteínas	Esmonde-White, 2011; Richardson, 2015
1630-1690 1645-55 1660-70 1665-75	Amida I - Tensión C=O α- hélice - Tensión C=O cadena desordenada - Tensión C=O lámina β	Colágeno y otras proteínas	Socrates, 2005; Esmonde-White, 2011; Kunstar, 2012; Richardson, 2015

5.1.4. Caracterización por espectroscopía Raman: análisis cualitativo de cartílago procedentes de donantes sanos y OA, con respecto al grado radiológico K-L

Para el análisis cualitativo del cartílago artrósico, se representaron los espectros Raman correspondientes a muestras procedentes de cabeza femoral y rodilla (cóndilo femoral y platillo tibial) de donantes con diferentes grados radiológicos de OA (K-L: 0-IV), remarcando las señales en las que se perciben diferencias cualitativas, como se muestra en las figuras 23, 27 y 29, respectivamente.

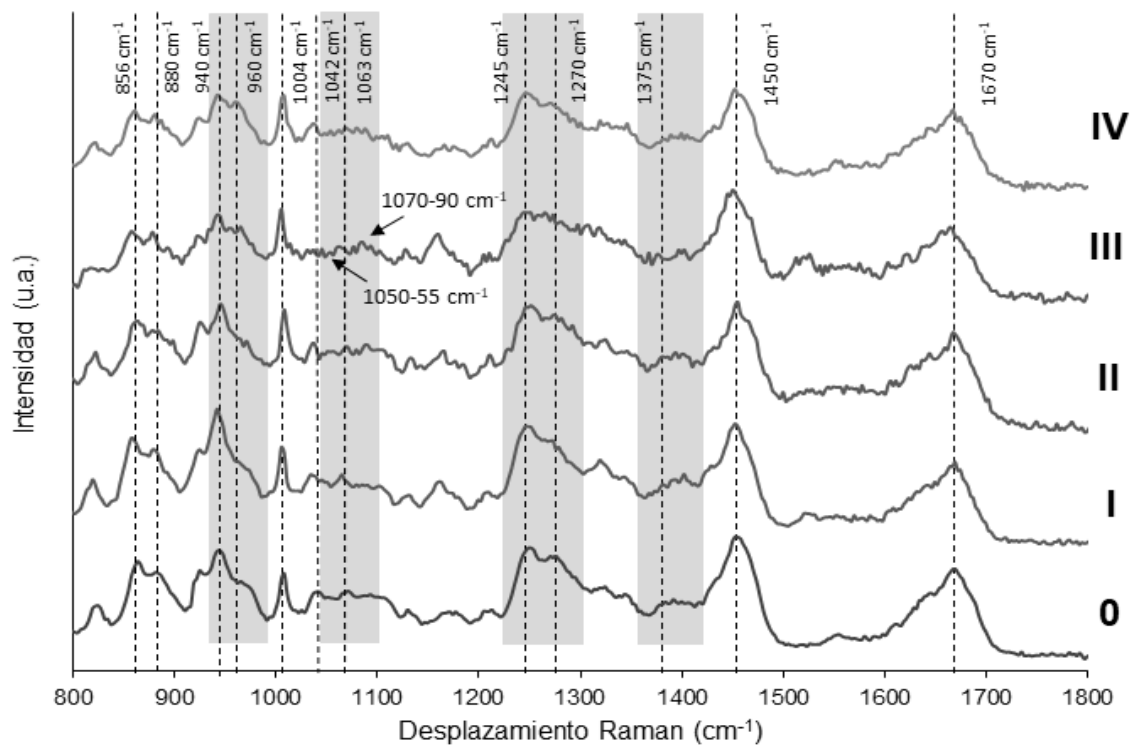


Figura 23. Espectros Raman de cartílago articular procedentes de cabeza femoral de donantes que presentan diferentes grados radiológicos de Kellgren-Lawrence (K-L: 0-IV).

En los espectros Raman de cartílago de cabeza femoral, se observó el aumento en intensidad de la señal a 960 cm^{-1} en los grados más avanzados (K-L III y K-L IV) correspondiente a la tensión simétrica de los grupos PO_4^{3-} que conforman la hidroxiapatita presente en tejidos mineralizados o calcificados propios de cartílago hipertrófico (Kunstar *et al.*, 2012). Esta señal no aparece exclusivamente en las muestras de grado avanzado, aunque si de forma mayoritaria (Figura 24).

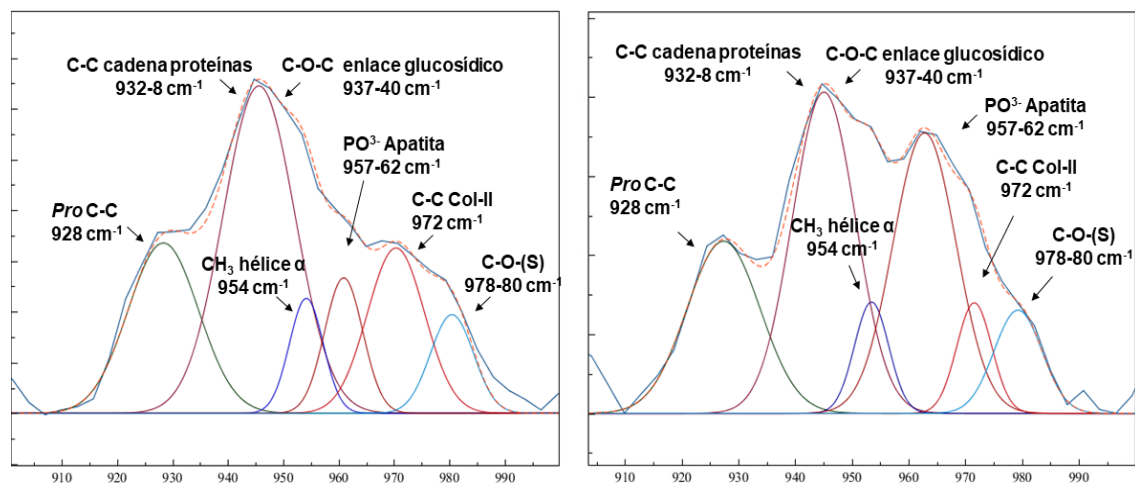


Figura 24. Deconvolución de bandas en la región $910\text{-}990\text{ cm}^{-1}$. Izq: cartílago sano (K-L 0, cabeza femoral); dcha: cartílago OA avanzada (K-L IV, cabeza femoral).

Al mismo tiempo, se observa un descenso de la banda a 940 cm^{-1} , así como un leve desplazamiento hacia números de onda más bajos. Esto puede ser debido a un descenso de PGs, el cual hace disminuir la contribución a la señal del grupo C-O-C del enlace glucosídico ($937\text{-}941\text{ cm}^{-1}$) siendo la contribución de la tensión de C-C de la cadena proteica ($932\text{-}938\text{ cm}^{-1}$) la mayoritaria en grados avanzados.

En cuanto a las señales específicas relacionadas con el contenido de proteoglicanos, se remarcan en la figura 23 las correspondientes a los desplazamientos de 1063 y 1375 cm^{-1} . La señal asignada a la tensión simétrica de O-SO_3^- de los GAGs sulfatados (1063 cm^{-1}), se observó en muestras de grado radiológico bajo (K-L 0-I), produciéndose una disminución de la intensidad de ésta con el aumento del grado radiológico de OA. En grados avanzados (K-L II-IV), se pierde la intensidad de la señal de tal forma que se solapa en algunos casos con señales colindantes.

En algunas de las muestras aparecen bandas a desplazamientos en el rango de $1070\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$ (Tabla 9) relacionados con la presencia de compuestos carbonatados en el tejido, solapándose con la banda de 1063 cm^{-1} (Figura 25).

Estas señales están relacionadas con el carbonato tipo-B correspondiente a la apatita carbonatada ($1070\text{-}3\text{ cm}^{-1}$), con residuos de carbonato en torno a las fibras de colágeno (1082 cm^{-1}), o con el carbonato de calcio (1090 cm^{-1}) (Awonusi *et al.*, 2007; Movasaghi *et al.*, 2007; Esmonde-White *et al.*, 2011; Buchwald *et al.*, 2012; Gamsjaeger *et al.*, 2014).

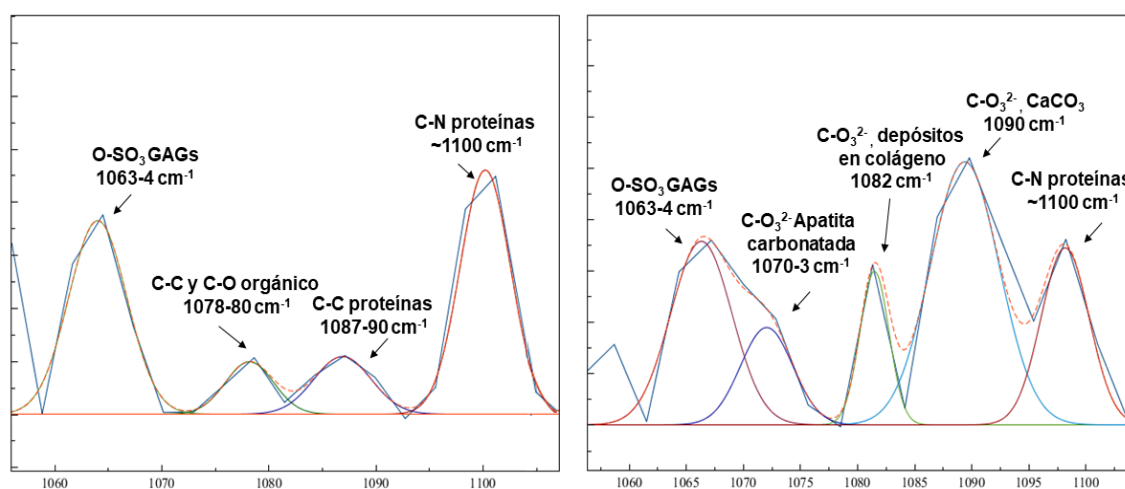


Figura 25. Deconvolución de bandas en la región $1060\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$. Izq: cartílago sano (K-L 0, cabeza femoral); dcha: cartílago OA avanzada (K-L IV, cabeza femoral).

Es por la aparición de esta señal a $1070-3\text{ cm}^{-1}$ por lo que otros autores propusieron como alternativa, aquella señal situada a un desplazamiento de $1375-80\text{ cm}^{-1}$ (Gamsjaeger *et al.*, 2014) encontrando una buena correlación entre ésta y la de 1063 cm^{-1} . Al analizar esta segunda señal de PGs, se observó su descenso genérico en los espectros de cartílago OA. De forma adicional, en algunas de las muestras, se aprecia una señal a 1050 cm^{-1} , correspondiente a la tensión simétrica P-O-P, relacionada con la presencia de cristales de pirofosfato cálcico dihidrato (por sus siglas en inglés, *CPPD*) (figura 26).

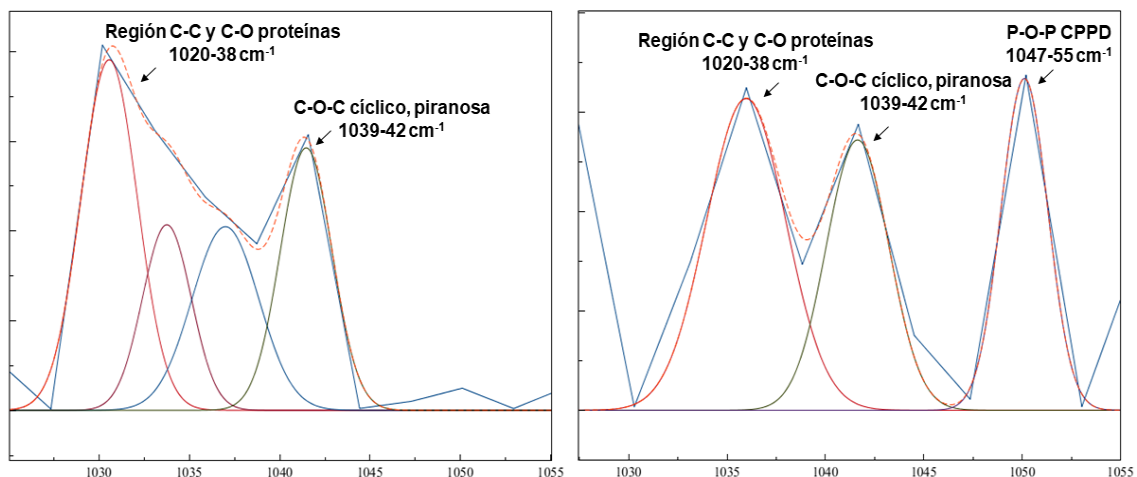


Figura 26. Deconvolución de bandas en la región $1020-1055\text{ cm}^{-1}$. Izq: cartílago sano (K-L 0, cabeza femoral); dcha: cartílago OA avanzada (K-L III, cabeza femoral).

Por último, se resalta en la figura 23 el doblete de señales a desplazamientos $1245-1270\text{ cm}^{-1}$, indicativo de la estructura secundaria relativa de las fibras de colágeno. En general, este doblete pierde definición en los espectros de cartílago de OA avanzada, pudiendo deberse esto al desplazamiento de la señal del colágeno de hélice- α (1270 cm^{-1}), hacia el colágeno de cadena desorganizada (1245 cm^{-1}).

De forma análoga al análisis de los espectros de cartílago de cabeza femoral, se detectaron en cartílago procedente de cóndilo femoral (Figura 27), la presencia de señales de componentes minerales (960 , 1050 cm^{-1} y $1070-90\text{ cm}^{-1}$), el descenso en la intensidad o enmascaramiento de las señales relacionadas con los PGs (1063 y 1375 cm^{-1}), y la pérdida de definición del doblete colágeno desordenado/hélice- α en grados más avanzados (Figura 28). Estos resultados se reprodujeron tanto para los espectros de cóndilo femoral (Figura 27) como los de platillo tibial (Figura 29), siendo la principal diferencia entre ambas regiones anatómicas de la rodilla, la observación de una mayor

mineralización en las muestras de cóndilo femoral respecto a las de platillo tibial (Figuras 27 y 29).

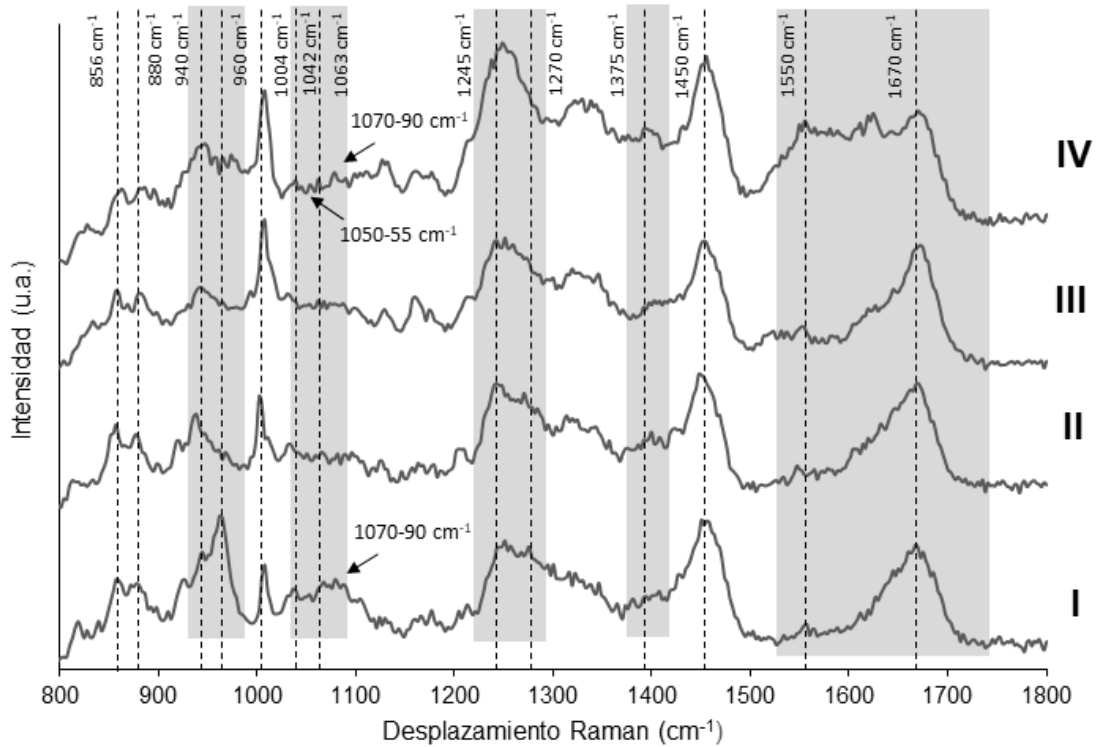


Figura 27. Espectros Raman de cartílago articular procedentes de cóndilo femoral de donantes que presentan diferentes grados radiológicos de Kellgren-Lawrence (K-L: I-IV).

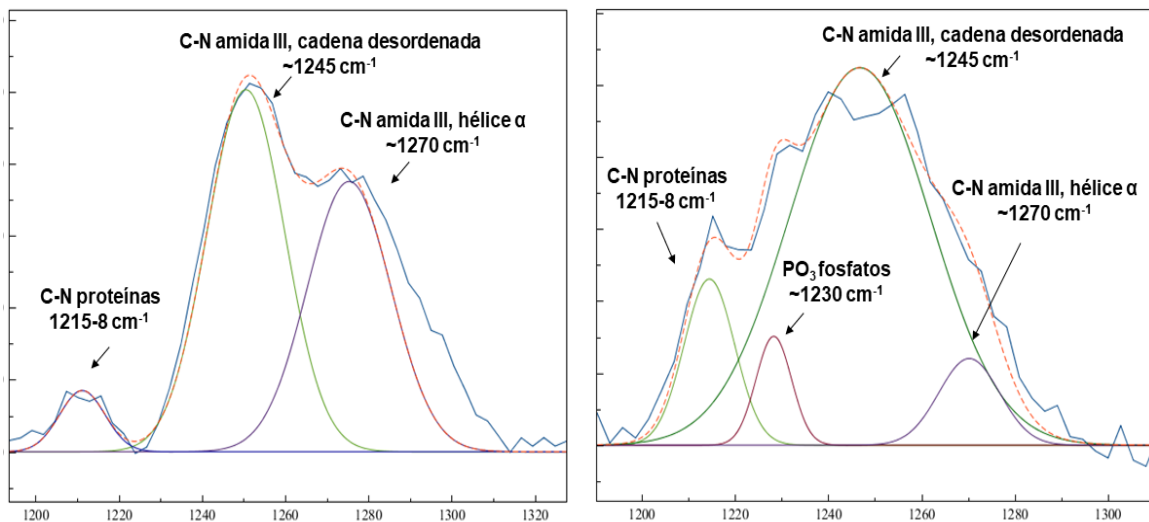


Figura 28. Deconvolución de bandas en la región $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$. Izq: cartílago sano (K-L 0, cabeza femoral); dcha: cartílago OA avanzado (K-L IV, cóndilo femoral).

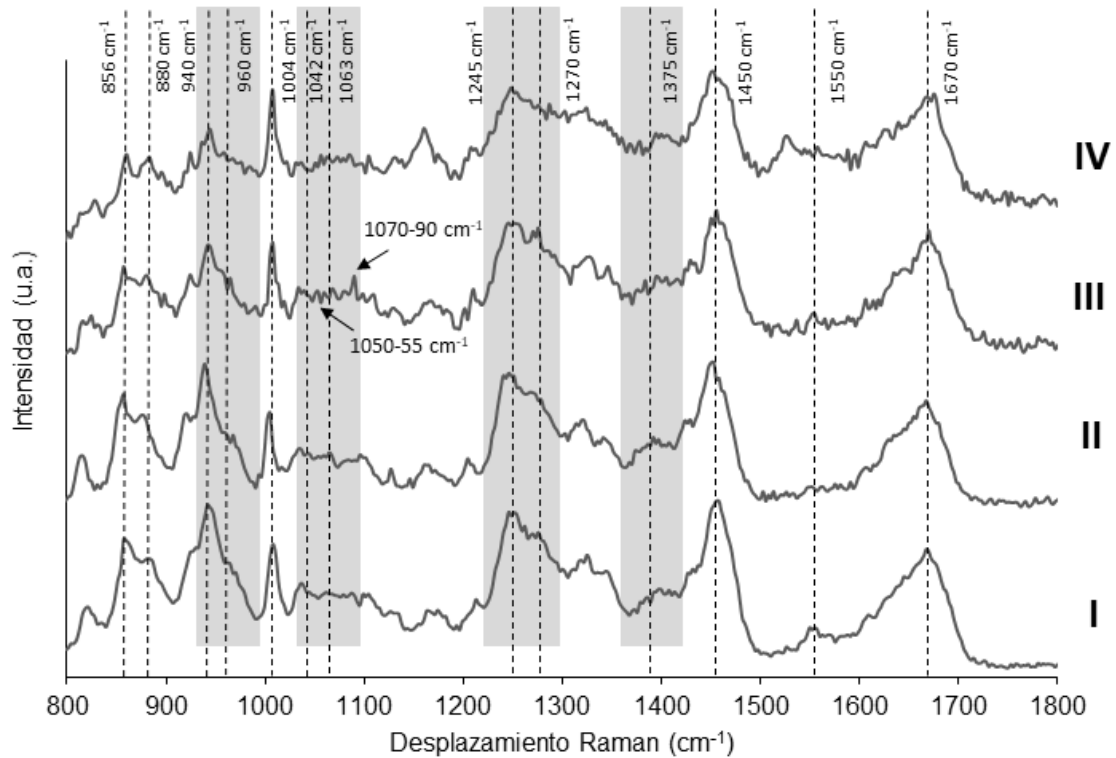


Figura 29. Espectros Raman de cartilago articular de platillo tibial de diferentes de donantes que presentan diferentes grados radiológicos de Kellgren-Lawrence (K-L: I-IV).

En algunas de las muestras de grado avanzado, se observa la aparición de una señal a un desplazamiento de 1550 cm^{-1} , cuya asignación se corresponde con enlaces N-H y C-N de la amida II (Figura 30).

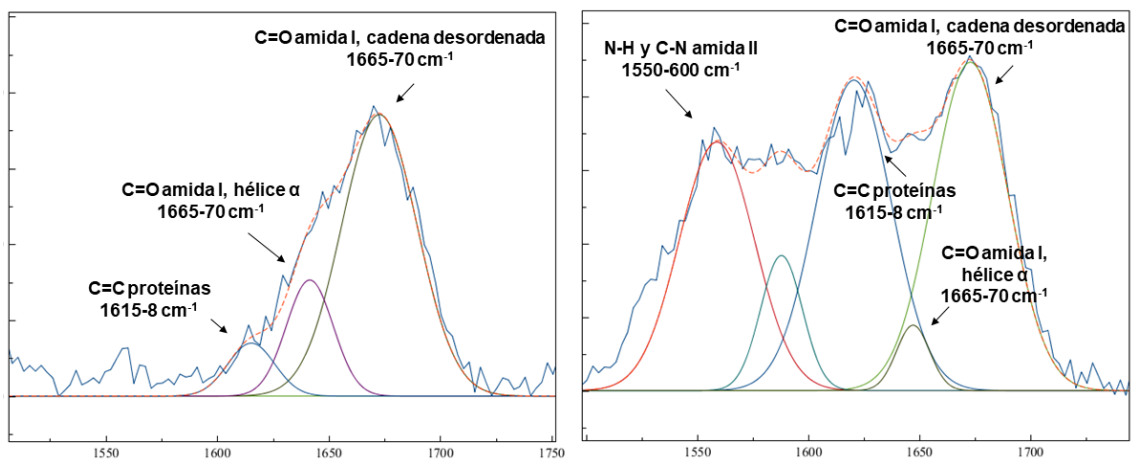


Figura 30. Deconvolución de bandas en la región $1500\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$. Izq: muestra de cartilago (K-L I, cóndilo femoral); dcha: muestra OA avanzado (K-L IV, cóndilo femoral).

Del análisis cualitativo del tejido procedentes de donantes OA se extrajeron, por lo tanto, nuevas señales, que no se habían observado previamente en el tejido sano. Estas nuevas asignaciones se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Señales encontradas en cartílago procedente de donantes OA.

Desplazamiento (cm^{-1})	Asignación	Componente	Tejido	Referencias (primer autor, año)
954-62	PO_4^{3-} , tensión simétrica Apatita	Fosfato	Cartílago mineralizado y hueso subcondral	Esmonde-White, 2011; Lim, 2011; Kunstar, 2012; Buchwald, 2012; Khan, 2013; Casal- Beiroa, 2018; Casal- Beiroa, 2019; Casal- Beiroa, 2020c
1047-55	P-O-P tensión simétrica	CPPD	Cartílago con depósitos de pirofosfato cálcico	Levillain, 2015, Socrates, 2005
1070-90 1070-3 1080-2 1090	CO_3^{2-} , tensión asimétrica Apatita carbonatada (Carbonato tipo B) Residuos de carbonato en colágeno, carbonato amorfo Carbonato de calcio	Carbonato	Cartílago mineralizado	Gunasekaran, 2006; Gamsgaejer, 2014, Esmonde-White, 2011; Wang, 2012; Buchwald, 2012; Awonusi, 2007; Movasaghi, 2007; Socrates, 2005.
1550-600	Amida II Deformación N-H y C-N	Proteínas	Cartílago degradado	West, 2004; Socrates, 2005; Movasaghi, 2007

Para confirmar la mineralización del tejido artrósico, se procedió a un análisis histológico de las muestras en las cuales se detectaron previamente las señales representativas de este proceso (960 cm^{-1} , $1047-50 \text{ cm}^{-1}$ y $1070-90 \text{ cm}^{-1}$), utilizando las técnicas de rojo de alizarina y Von Kossa.

La figura 31 presenta tinciones de rojo alizarina de muestras de cartílago correspondientes a las 3 regiones anatómicas (cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial) las cuales presentaban un perfil de mineralización en su espectro, utilizando como control negativo una muestra de cartílago de cabeza femoral sano (K-L 0) en las que se verificó la ausencia de señales de mineralización.

Como se puede observar, en el caso de la cabeza femoral, el cartílago K-L 0 fue negativo y en el caso de K-L IV, se detectó la presencia de depósitos de sales cálcicas, en la capa profunda del cartílago y en la superficie. En lo que respecta a las muestras

de cartílago de rodilla, a pesar de que el diagnóstico radiológico de la muestra de OA leve que se dispone sea K-L I, esta presenta un perfil molecular Raman de tejido mineralizado, que se pudo confirmar histológicamente, tanto en el cóndilo femoral como en el platillo tibial. En este caso también se observa un aumento de la mineralización del tejido, más pronunciada en la muestra de cóndilo femoral y que afecta a las capas superficiales e intermedias del tejido.

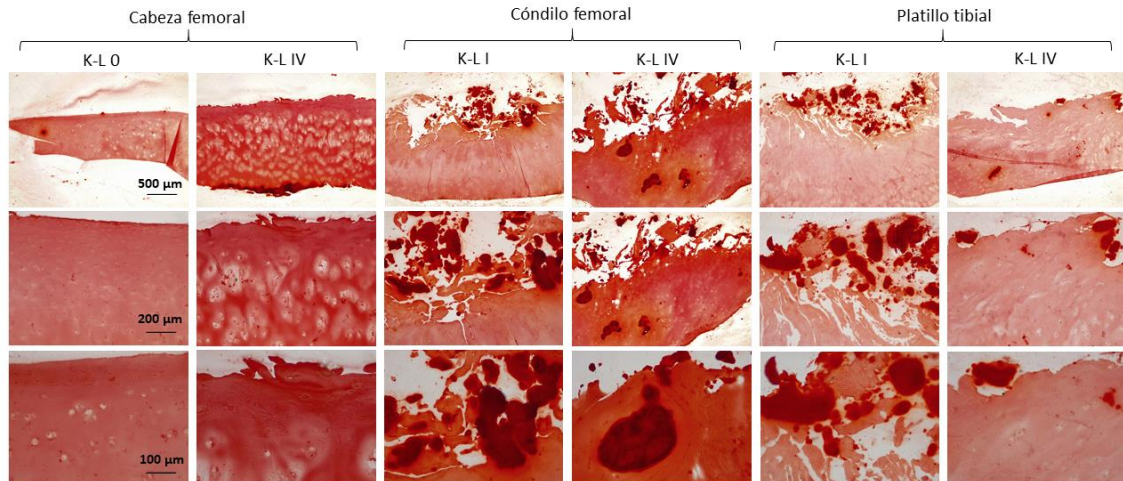


Figura 31. Tinciones de Rojo Alizarina, a diferentes aumentos, de muestras de cartílago procedentes de diferentes zonas anatómicas, cuyo espectro Raman presenta un perfil mineralizado, tomando como control negativo una muestra sana (K-L 0) con ausencia de bandas de mineralización. De izq. a dcha., tejido de cabeza femoral K-L 0 y IV, cóndilo femoral K-L I y IV, y platillo tibial K-L I y IV cuyos espectros presentan un perfil mineralizado.

La figura 32 representa tinciones de Von Kossa de las muestras referenciadas anteriormente, indicando la presencia de iones calcio en las diferentes capas del cartílago, y corroborando los resultados observados en las tinciones de rojo alizarina.

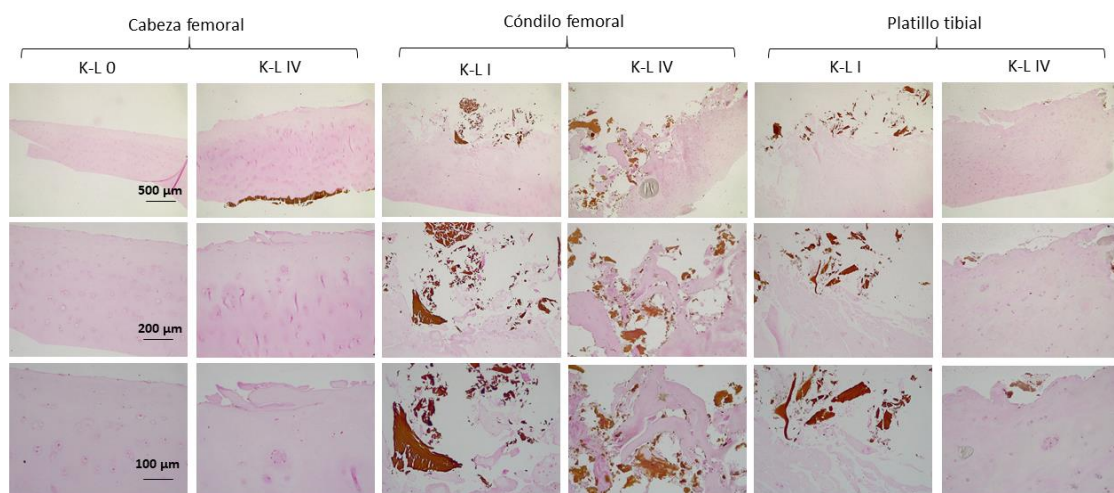


Figura 32. Tinciones de Von Kossa, a diferentes aumentos, de muestras de cartílago procedentes de diferentes zonas anatómicas, cuyo espectro Raman presenta un perfil mineralizado, tomando como control negativo una muestra sana (K-L 0) con ausencia de bandas de mineralización. De izq. a dcha., tejido de cabeza femoral K-L 0 y IV, cóndilo femoral K-L I y IV, y platillo tibial K-L I y IV cuyos espectros presentan un perfil mineralizado.

Posteriormente a estos análisis se confirmó que las muestras de una de las rodillas analizadas proceden de un paciente artrósico (Figura 12. K-L IV) con condrocalcinosis, un proceso patológico de calcificación ectópica del cartílago articular hialino y fibrocartílago (Hawellek *et al.*, 2016).

5.1.5. Caracterización por espectroscopía Raman: análisis cualitativo de muestras de cartílago procedentes de donantes sanos y OA, con respecto al *Mankin Score*

El mismo tipo de análisis cualitativo se realizó en función del *MS* (Pascual Garrido *et al.*, 2009) y teniendo en cuenta diferentes rangos propuestos por Acebes *et al.*, (Acebes *et al.*, 2009) (Figura 21).

En la figura 33 se representan los espectros obtenidos para muestras de cartílago de cabeza femoral agrupados en función del *MS*. Las muestras correspondientes a rangos de *MS* de 0-2 y 3-5 de cartílago de cabeza femoral, presentaron un espectro muy similar a aquellos de muestras sanas o de OA leve con K-L 0 y I, respectivamente.

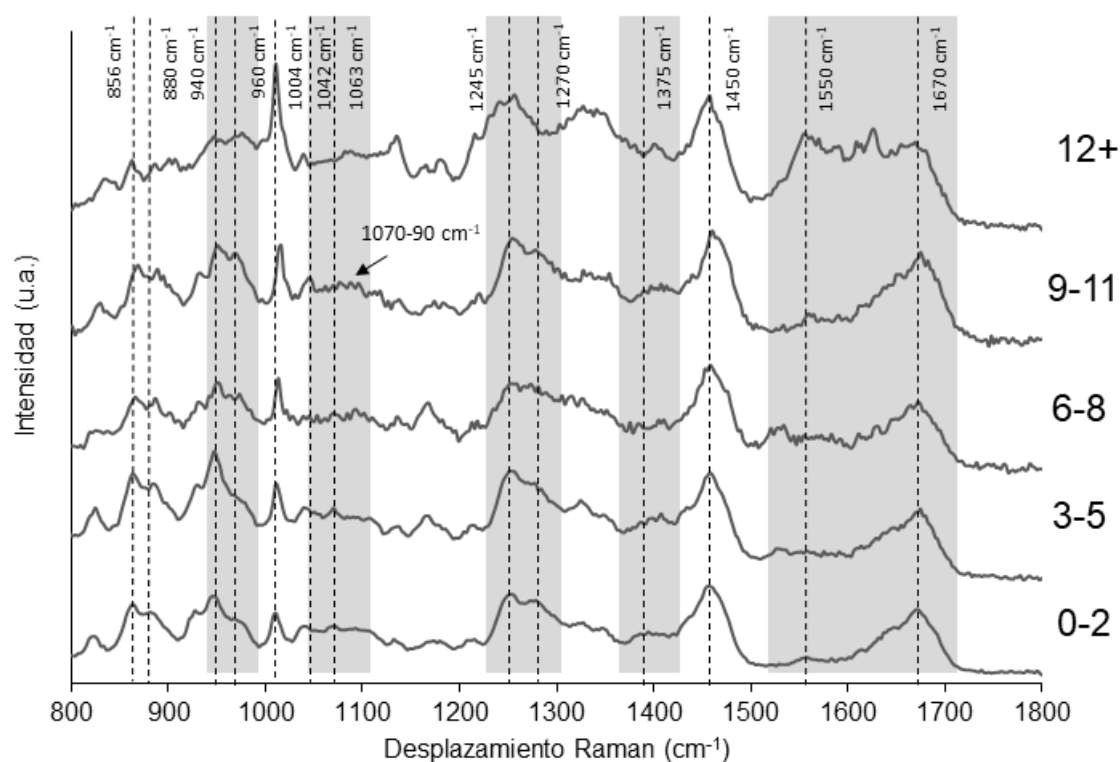


Figura 33. Espectros Raman de cartílago articular procedente de cabeza femoral de donantes sanos y artrósicos, en función de diferentes rangos de degradación establecidos para la escala *MS* (*MS* total: 0-2 a 12 o superior).

Se observó la presencia de las bandas de mineralización (960 y 1070-90 cm^{-1}) mayoritariamente en rangos de degradación de cartílago a partir de grados intermedios de *MS* (*MS* total 6-8). Es también a partir del rango *MS* 6-8 que se observó una pérdida de intensidad de la señal de GAGs sulfatados, a 1063 cm^{-1} . En cuanto al doblete del colágeno, se observó una disminución en la intensidad de la señal a 1270 cm^{-1} , correspondiente a la estructura ordenada de hélice- α , siendo esta más acusada en el cartílago que presenta mayor grado de degradación (*MS* total de 12 o superior). En muestras con una degradación de cartílago muy severa (*MS* 12 o superior), se pudo observar un aumento en intensidad de la señal de la amida II (1550-600 cm^{-1}).

En el caso de las muestras de rodilla (Figuras 34 y 35), se presentaron los resultados los espectros en función de la escala modificada de *MS* a partir de valores de 3-5 para muestras procedentes de cóndilo femoral y 6-8 para muestras procedentes de patillo tibial, debido a la ausencia de muestras de *MS* inferior.

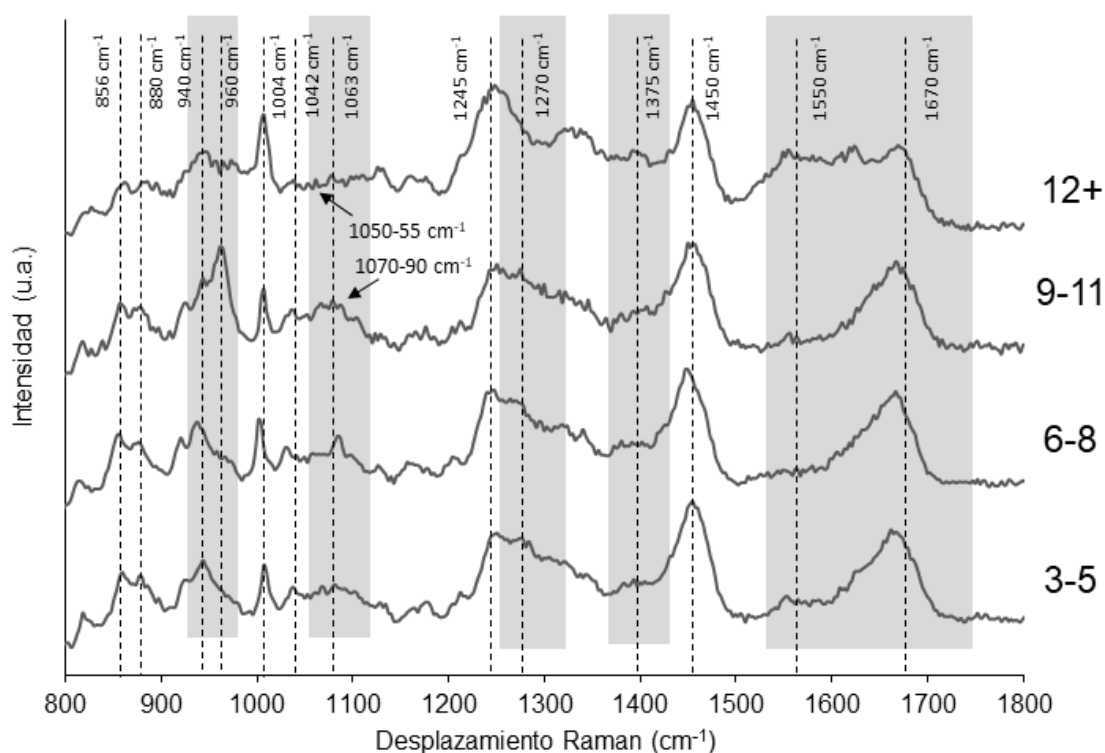


Figura 34. Espectros Raman de cartílago articular procedente de cóndilo femoral de donantes sanos y artrósicos, en función de diferentes rangos de degradación establecidos para la escala *MS* (*MS* total: 0-2 a 12 o superior).

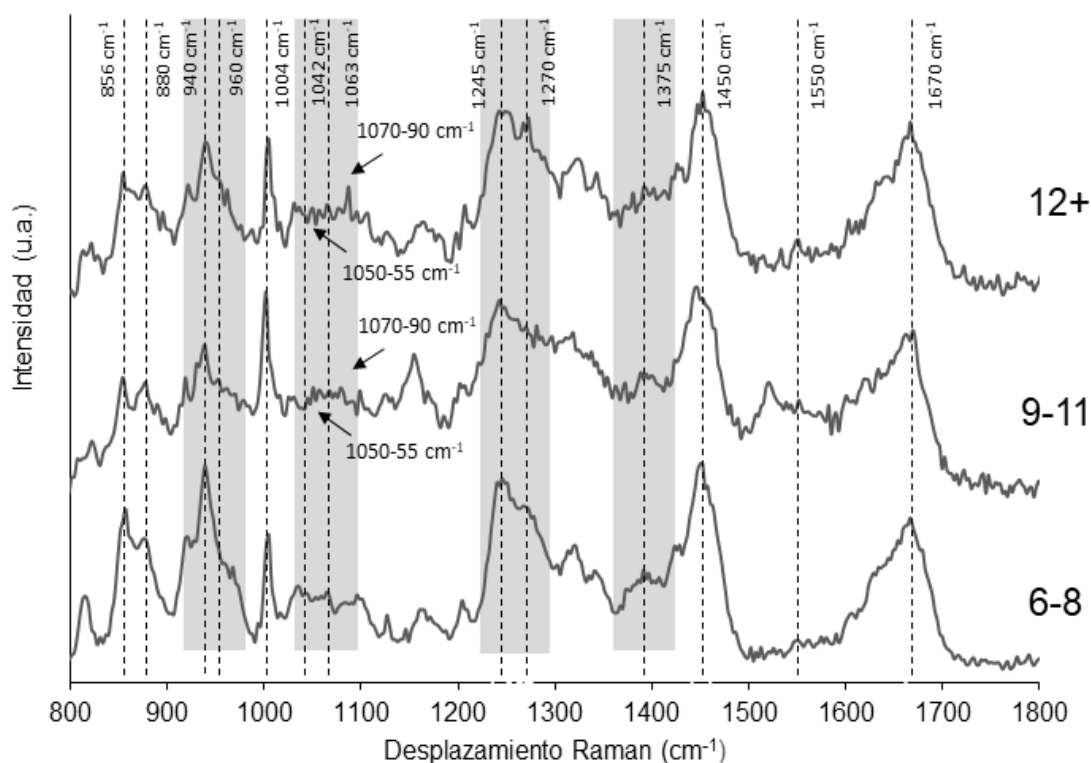


Figura 35. Espectros Raman de cartílago articular procedente de platillo tibial de donantes sanos y artrósicos, en función de diferentes rangos de degradación establecidos para la escala *MS* (*MS* total: 0-2 a 12 o superior).

A diferencia de las muestras de cabeza femoral, en las muestras de cóndilo femoral de *MS* 3-5 (Figura 34) se pudo apreciar cierto grado de mineralización, a través de la presencia de carbonato (1070 cm^{-1}). De la misma forma, se detectó la presencia de la banda de mineralización de fosfato (960 cm^{-1}) como señal intensa a partir del rango de *MS* 9-11, y la de carbonato (1070 cm^{-1}) en ese y el resto de los rangos de la escala. La banda de GAGs sulfatados (1063 cm^{-1}) es menos intensa con el aumento de la degradación del tejido, en algunos casos siendo enmascarada por la señal del carbonato. Se produjo, igualmente que en el cartílago de cabeza femoral, la pérdida de definición del doblete del colágeno ($1245\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$) por pérdida de intensidad de la banda 1270 cm^{-1} en el tejido más degradado (*MS* 12 o superior). Se apreciaron cambios similares en los espectros de platillo tibial (Figura 35). Adicionalmente, las muestras de cóndilo femoral presentaron una mayor contribución de la señal correspondiente a grupos fosfato (960 cm^{-1}). En las muestras de rodilla también se observó la presencia de la señal a 1550 cm^{-1} en muestras con una mayor degradación de la matriz para un rango de *MS* total de 9-13.

5.2. Análisis cuantitativo de los parámetros Raman en cartílago procedente de donantes sanos y artrósicos

El siguiente apartado se centra en el estudio de los parámetros propuestos como perfil biomarcador óptico de la OA (Tabla 6) en función del grado radiológico K-L o la escala MS.

Para ello, se consideraron diferentes unidades de análisis como la articulación o región anatómica (cabeza o cóndilo femorales y platillo tibial) y en el caso de tejido lesionado (OA) la zona macroscópica (tejido lesionado y adyacente-intacto).

5.2.1. Análisis cuantitativo de cartílago sano y OA: grado K-L como referencia

Para el análisis cuantitativo tomando el grado radiológico K-L como referencia, se contó con el tamaño muestral especificado en la tabla 10.

Tabla 10. Tamaño muestral del estudio cuantitativo de los parámetros Raman respecto al grado K-L.

Grado K-L	n cabeza femoral		n cóndilo femoral		n platillo tibial	
	Sano/ Lesión	Adyacente	Sano/ Lesión	Adyacente	Sano/ Lesión	Adyacente
0	6	4	0	0	0	0
I	9	6	1	1	1	1
II	7	6	3	3	3	2
III	14	11	5	4	5	4
IV	11	10	13	11	13	6

Siempre que fue posible, se tomó de cada donante una muestra de lesión y otra de tejido intacto adyacente. Algunas de las muestras de grado K-L 0, aun no presentando las radiografías evidencias de OA, sí presentaban pequeñas lesiones a nivel macroscópico, y esto se tuvo en cuenta para el análisis. Este es el motivo de tener 4 muestras de tejido adyacente para el grado K-L 0. En el caso de algunas de las muestras OA no fue posible la recogida de tejido adyacente a la lesión por no presentar el donante tejido macroscópicamente intacto.

5.2.1.1. Análisis cuantitativo del cartílago articular humano por espectroscopia Raman: muestras de cabeza femoral

La tabla 11 resume los resultados encontrados al aplicar la prueba Krustal-Wallis para muestras independientes en el estudio comparativo de diferentes ratios en cartílago sano y OA de cabeza femoral, con respecto al grado K-L. Se han encontrado diferencias significativas en la composición molecular del cartílago procedente de los diferentes grados K-L en los parámetros relacionados con los GAGs, SGAGs ($p < 0,001$) y PGs ($p = 0,002$); colágeno CoID/F ($p = 0,002$); índice lipídico indirecto IL ($p = 0,009$); y mineralización C/H ($p = 0,014$) y H/Col ($p = 0,044$).

Tabla 11. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cabeza femoral procedentes de donantes sanos y OA. Hipótesis nula: La distribución del parámetro es la misma entre los diferentes grados K-L.

Parámetro	Significancia (p)*	Decisión
SGAGs	<0,001	Rechazar la hipótesis nula
TGAGs	0,065	Retener la hipótesis nula
PGs	0,002	Rechazar la hipótesis nula
CoID/F	0,002	Rechazar la hipótesis nula
IL	0,009	Rechazar la hipótesis nula
CPPD	0,360	Retener la hipótesis nula
GMF	0,109	Retener la hipótesis nula
GMC	0.363	Retener la hipótesis nula
C/H	0,014	Rechazar la hipótesis nula
H/Col	0,044	Rechazar la hipótesis nula

*Se considera que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

En la figura 36 se representan los resultados para los diferentes parámetros, y las diferencias significativas entre grupos encontradas, tras aplicar la prueba de Bonferroni.

Considerando los parámetros relacionados con los GAGs (SGAGs, TGAGs y PGs) se pudo observar una tendencia descendente del contenido relativo de GAGs y PG con el avance de la enfermedad. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los grados 0-I ni entre los grados II-IV entre sí, aunque sí se observaron diferencias significativas entre los grados 0-I con los grados radiológicos más avanzados de osteoartritis en los parámetros SGAGs y PGs.

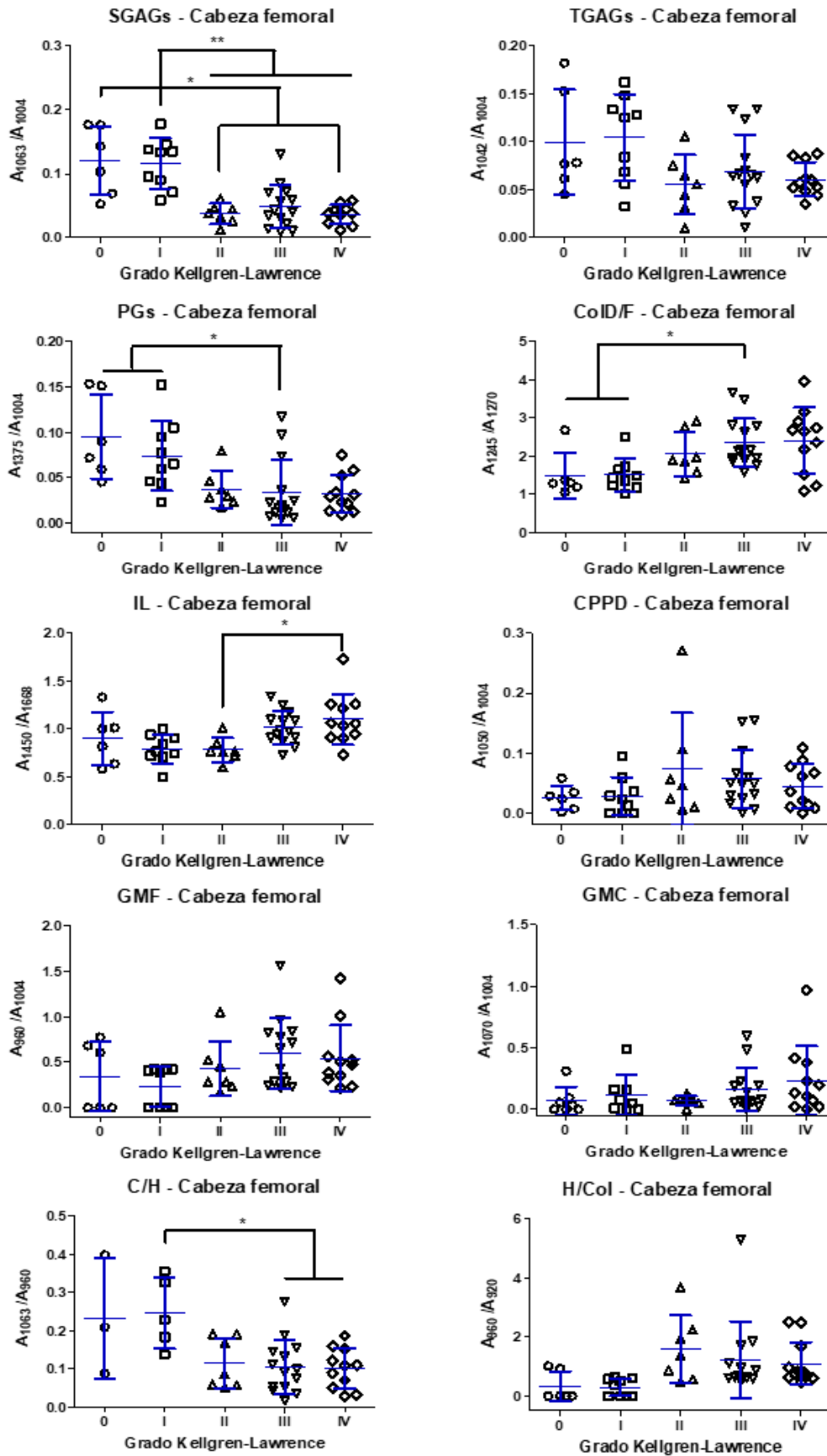


Figura 36. Ratio de señales correspondientes a los parámetros Raman respecto al grado K-L para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado procedentes de cabeza femoral de donantes sanos y OA. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Los resultados para el parámetro CoID/F mostraron una tendencia ascendente con la severidad de la osteoartritis. Este parámetro presentó diferencias significativas entre el cartílago de grado K-L 0-I con grados más avanzados (K-L III). Algo similar ocurrió con el IL, con diferencias significativas entre los grados II y IV.

Según los valores para los parámetros relacionados con la mineralización CPPD, GMF, GMC y H/Col, los resultados mostraron una mayor mineralización general en grados avanzados de osteoartritis, aunque en ninguno de los casos presentaron diferencias estadísticamente significativas. La relación entre el cartílago funcional y el tejido mineralizado (parámetro C/H) mostró una tendencia descendente, con diferencias significativas entre el grado K-L I y los grados más avanzados (K-L III-IV).

Cuando se analizaron las muestras de cartílago teniendo en cuenta el tejido macroscópicamente intacto, y adyacente a la lesión (Ad), se observó que el único parámetro en el que se detectaron diferencias significativas fue en el parámetro SGAGs (Tabla 12). Este parámetro siguió, para el tejido adyacente, una misma tendencia que la descrita en tejido lesionado (Figura 37). El resto de los parámetros siguieron una misma tendencia, pero no presentaron significancia estadística con respecto a los diferentes grados K-L, por lo que no se han representado gráficamente.

Tabla 12. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartílago OA intacto y adyacente en muestras de cabeza femoral. Hipótesis nula: La distribución del parámetro es la misma entre los diferentes grados K-L.

Parámetro	Significancia (p)*	Decisión
SGAGs	0,021	Rechazar hipótesis nula
TGAGs	0,079	Retener la hipótesis nula
PGs	0,063	Retener la hipótesis nula
CoID/F	0,150	Retener la hipótesis nula
IL	0,300	Retener la hipótesis nula
CPPD	0,097	Retener la hipótesis nula
GMF	0,644	Retener la hipótesis nula
GMC	0,823	Retener la hipótesis nula
C/H	0,061	Retener la hipótesis nula
H/Col	0,166	Retener la hipótesis nula

*Se considera que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

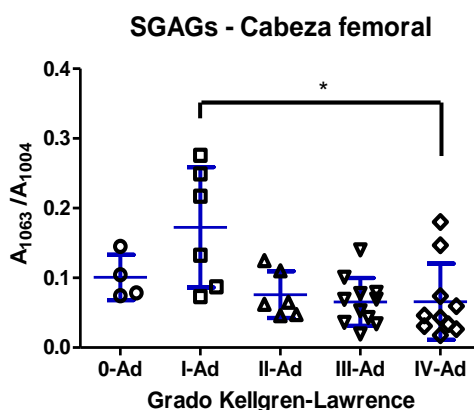


Figura 37. Ratio SGAGs ($1063/1004 \text{ cm}^{-1}$) respecto al grado K-L para el conjunto de muestras de cartílago intacto adyacente procedente de la cabeza femoral sana y OA. * $p < 0,05$.

Posteriormente, se realizó la prueba de Mann-Whitney para detectar diferencias entre el tejido lesionado y adyacente de cada grado. Los resultados se detallan en la tabla 13. Las únicas diferencias significativas encontradas fueron en el grado II para los parámetros SGAGs ($p=0,0082$) y C/H ($p=0,0168$).

Tabla 13. Análisis estadístico de las diferencias entre los parámetros Raman en tejido lesionado y el intacto adyacente (Ad) procedente de la cabeza femoral. Valores p de la prueba de Mann-Whitney.

K-L	SGAGs	TGAGs	PGs	CoID/F	IL	CPPD	GMF	GMC	C/H	H/CoI
0	0,9143	0,3524	1	1	0,4762	0,0952	0,5895	0,3392	0,8571	0,2667
I	0,4278	0,9578	0,2867	0,9578	0,4923	0,1739	0,1104	0,4395	0,9430	1
II	0,0082*	0,6282	0,2343	0,7308	0,3660	0,6282	0,9357	0,5338	0,0168*	0,4121
III	0,2180	0,8571	0,1213	0,2688	0,1572	0,3155	0,6251	0,3159	0,3289	0,9259
IV	0,3150	0,7040	0,6759	0,4033	0,4474	0,4026	0,9394	0,9092	0,5915	0,8036

*Se considera que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

5.2.1.2. Análisis cuantitativo del cartílago articular humano: muestras de cóndilo femoral y platillo tibial

Para estudiar las diferencias entre el cartílago de cóndilo femoral y de platillo tibial, se analizaron los parámetros Raman para las diferentes regiones anatómicas por separado.

De forma análoga que para las muestras de cabeza femoral, se ha realizado la prueba estadística de Krustal-Wallis, con la que se ha retenido la hipótesis nula para cada uno de los parámetros, esto es, no se han encontrado diferencias significativas

para ninguno de ellos entre los distintos grados K-L. En general, atendiendo a los valores medios obtenidos para las muestras de cóndilo femoral (Tabla 14) se observó el descenso del parámetro SGAGs en grados III y IV, el aumento de la desorganización del colágeno (CoID/F) en las muestras de grado IV, y el aumento en los parámetros de mineralización, aunque con desviaciones muy elevadas. En las muestras de platillo tibial se observaron tendencias similares, en los parámetros SGAGs, CoID/F y parámetros de mineralización (Tabla 15). Debido a la falta de diferencias estadísticamente significativas no se han representado gráficamente ninguno de los casos.

Tabla 14. Valores medios y desviaciones estándar (DE) para los parámetros Raman descritos, obtenidos en cartílago de cóndilo femoral, tomando como referencia la escala K-L.

<i>Cóndilo Femoral</i>	K-L 0	K-L I	K-L II	K-L III	K-L IV
SGAGs	-	0,088	0,095±0,067	0,037±0,017	0,057±0,023
TGAGs	-	0,061	0,055±0,010	0,092±0,085	0,073±0,034
PGs	-	0,056	0,046±0,028	0,021±0,007	0,037±0,018
CoID/F	-	2,336	1,776±0,269	1,355±0,479	2,153±0,651
IL	-	0,792	0,982±0,071	0,978±0,121	0,953±0,152
CPPD	-	0,034	0,032±0,001	0,035±0,021	0,049±0,049
GMF	-	0,602	0,475±0,303	0,474±0,255	0,670±0,274
GMC	-	0,124	0,066±0,054	0,154±0,176	0,150±0,116
C/H	-	0,146	0,219±0,085	0,084±0,023	0,091±0,056
H/Col	-	0,434	0,764±0,276	0,659±0,258	0,725±0,223

Tabla 15. Valores medios y desviaciones estándar (DE) para los parámetros Raman descritos, obtenidos en cartílago de platillo tibial, tomando como referencia la escala K-L.

<i>Platillo Tibial</i>	K-L 0	K-L I	K-L II	K-L III	K-L IV
SGAGs	-	0,050	0,071±0,019	0,043±0,014	0,055±0,017
TGAGs	-	0,045	0,075±0,009	0,061±0,031	0,070±0,043
PGs	-	0,019	0,059±0,009	0,031±0,013	0,026±0,012
CoID/F	-	1,7266	1,777±0,257	2,535±1,290	2,074±0,857
IL	-	0,961	0,887±0,053	0,995±0,069	1,024±0,230
CPPD	-	0,023	0,032±0,046	0,071±0,070	0,166±0,244
GMF	-	0,536	0,401±0,397	0,527±0,199	0,777±0,928
GMC	-	0,0907	0,022±0,037	0,090±0,055	0,124±0,057
C/H	-	0,0927	0,075±0,055	0,107±0,0844	0,135±0,090
H/Col	-	0,980	0,372±0,003	0,790±0,263	1,486±1,593

Por otra parte, se han comparado los ratios obtenidos para el tejido lesionado y adyacente de cada región anatómica para muestras con grado K-L igual o superior a 2. En el caso de las muestras de cóndilo femoral (Tabla 16) se encontraron diferencias significativas en el parámetro PGs, en las muestras de K-L III ($p=0,0317$) y en los

parámetros SGAGs ($p=0,0370$) y GMC ($p=0,0054$), en las muestras de grado K-L IV. En las muestras de platillo tibial (Tabla 17), se encontraron diferencias significativas en el parámetro PGs ($p=0,0316$), en las muestras de K-L IV.

Tabla 16. Análisis estadístico de las diferencias entre los parámetros Raman en tejido lesionado y el intacto adyacente (Ad) de cóndilo femoral. Resultados de los valores p de la prueba de Mann-Whitney.

K-L	SGAGs	TGAGs	PGs	CoID/F	IL	CPPD	GMF	GMC	C/H	H/Col
II	0,4000	0,7000	0,7000	0,5066	0,7000	0,7000	0,4000	1	1	0,7000
III	0,1905	0,7302	0,0317*	0,3836	0,5556	0,9048	0,5556	0,9048	0,4127	0,9048
IV	0,0370*	0,3539	0,3247	0,0725	0,5623	0,6224	0,3848	0,0054*	0,2970	0,4173

*Se considera que existen diferencias significativas cuando $p<0,05$.

Tabla 17. Análisis estadístico de las diferencias entre los parámetros Raman en tejido lesionado y el intacto adyacente (Ad) de platillo tibial. Resultados de los valores p de la prueba de Mann-Whitney.

K-L	SGAGs	TGAGs	PGs	CoID/F	IL	CPPD	GMF	GMC	C/H	H/Col
II	0,2000	1	1	0,8000	0,2000	1	-	0,3743	-	-
III	0,0635	0,9048	0,1905	0,9048	0,1905	0,5556	0,7302	0,9017	0,1111	0,8057
IV	0,0549	0,5427	0,0316*	0,6295	0,4047	0,8264	0,2729	0,9650	0,8883	0,6294

*Se considera que existen diferencias significativas cuando $p<0,05$.

Finalmente, en la tabla 18 se presentan las diferencias encontradas en el análisis comparativo de los ratios obtenidos para muestras de cartílago de las diferentes regiones anatómicas estudiadas (cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial).

Tabla 18. Resultados de la prueba de Krustal-Wallis para detectar diferencias en los parámetros entre las muestras de cartílago articular de cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial, tomando como referencia la escala K-L.

Valores p	K-L II	K-L III	K-L IV
SGAGs	0,052	0,794	0,008**
TGAGs	0,208	0,840	0,803
PGs	0,280	0,380	0,301
CoID/F	0,831	0,342	0,560
IL	0,065	0,994	0,267
CPPD	0,675	0,762	0,195
GMF	0,942	0,816	0,129
GMC	0,221	0,930	0,853
C/H	0,177	0,943	0,228
H/Col	0,518	0,326	0,282

El único parámetro en el que se encontraron diferencias significativas fue en el parámetro SGAGs ($p=0,008$), en las muestras procedentes de grado K-L IV. Al realizar la comparación múltiple mediante la prueba de Bonferroni para este parámetro en el subconjunto de muestras K-L IV, se encontraron diferencias significativas exclusivamente entre el cartílago de cabeza femoral y el de platillo tibial ($p=0,014$).

5.2.2. Análisis cuantitativo de cartílago sano y OA tomando el Sistema de evaluación Histoquímico-Histomorfológico de Mankin modificado (MS)

Se replicó el análisis estadístico realizado con respecto al grado K-L, frente a la escala MS, teniendo en cuenta los 5 rangos, desde la ausencia de lesión (MS Total 0-2) hasta lesión muy severa (MS Total 12-13) (Acebes *et al.*, 2009). Seguidamente, se repitió el análisis frente a las diferentes subcategorías de puntuación de la escala o *subscores* (SI: defectos en la estructura; SII: anomalías celulares, SIII: tinción de proteoglicanos de la matriz). Para este análisis se emplearon las muestras de cartílago sano y lesionado. El tamaño muestral para este análisis estadístico se detalla en la tabla 19.

Tabla 19. Tamaño muestral del estudio cuantitativo de los parámetros Raman respecto a la escala MS y sus diferentes subcategorías.

Mankin Score	Puntuación	n cabeza femoral	n cóndilo femoral	n platillo tibial
MS total	0 – 2	4	-	-
	3 – 5	7	1	-
	6 – 8	16	10	8
	9 – 11	16	9	13
	12 – 13	4	2	1
MS SI	0	2	-	-
	1	6	-	-
	2	4	1	-
	3	4	5	2
	4	13	8	6
	5	8	3	6
	6	8	5	6
MS SII	7	2	-	2
	0	9	5	6
	1	11	10	7
MS SIII	2	27	7	9
	0	2	-	-
MS SIII	1	7	-	-
	2	14	7	4
	3	18	8	15
	4	6	7	3

5.2.2.1. Análisis cuantitativo del cartílago articular humano respecto a la escala *Mankin Score*: muestras de cabeza femoral

Análisis respecto al *Mankin Score* total

Los resultados de la prueba de Krustal-Wallis para las muestras de cartílago de cadera frente al *MS* total (Tabla 20) muestran diferencias significativas en los parámetros relacionados con los GAGs, SGAGs ($p < 0,001$), TGAGs ($p = 0,025$) y PGs ($p = 0,003$), con el colágeno ColD/F ($p = 0,001$) y con respecto a la mineralización, para el parámetro C/H ($p = 0,002$). Una vez aplicada la prueba de Bonferroni, se mantuvieron las diferencias significativas encontradas, con la excepción del parámetro TGAGs (Figura 38).

Tabla 20. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartílago sano y OA de cadera respecto al *MS* total. Hipótesis nula: la distribución del parámetro es la misma entre las distintas categorías de *MS* total.

Parámetro	Significancia (p)*	Decisión
SGAGs	<0,001	Rechazar la hipótesis nula
TGAGs	0,025	Rechazar la hipótesis nula
PGs	0,003	Rechazar la hipótesis nula
ColD/F	0,001	Rechazar la hipótesis nula
IL	0,140	Retener la hipótesis nula
CPPD	0,902	Retener la hipótesis nula
GMF	0,085	Retener la hipótesis nula
GMC	0,375	Retener la hipótesis nula
C/H	0,002	Rechazar la hipótesis nula
H/Col	0,143	Retener la hipótesis nula

*Se considera que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Se observó que los parámetros relacionados con los GAGs (SGAGs, TGAGs, y PGs) siguieron una tendencia descendente con el aumento de la degradación del cartílago según la escala *MS*; siendo que para SGAGs se han encontrado diferencias significativas entre muestras de bajo *MS* (0-2 y 3-5) frente a lesiones severas y muy severas (9-11 y 12+) y también entre valores intermedios de *MS*, que se corresponden con lesión leve (3-5) y moderada (6-8). Se obtuvo una tendencia descendente para el parámetro TGAGs, aunque no se han encontrado diferencias significativas, como se mencionó anteriormente. En lo que respecta al parámetro PGs, se observaron diferencias significativas entre el grupo de ausencia de lesión (*MS* 0-2) frente a lesiones moderadas-severas (6-8 y 9-11).

El parámetro ColD/F, al igual que en el análisis respecto al grado K-L (Figura 38), presentó una tendencia ascendente, con diferencias significativas entre muestras con *MS* 0-2 y *MS* 9-11.

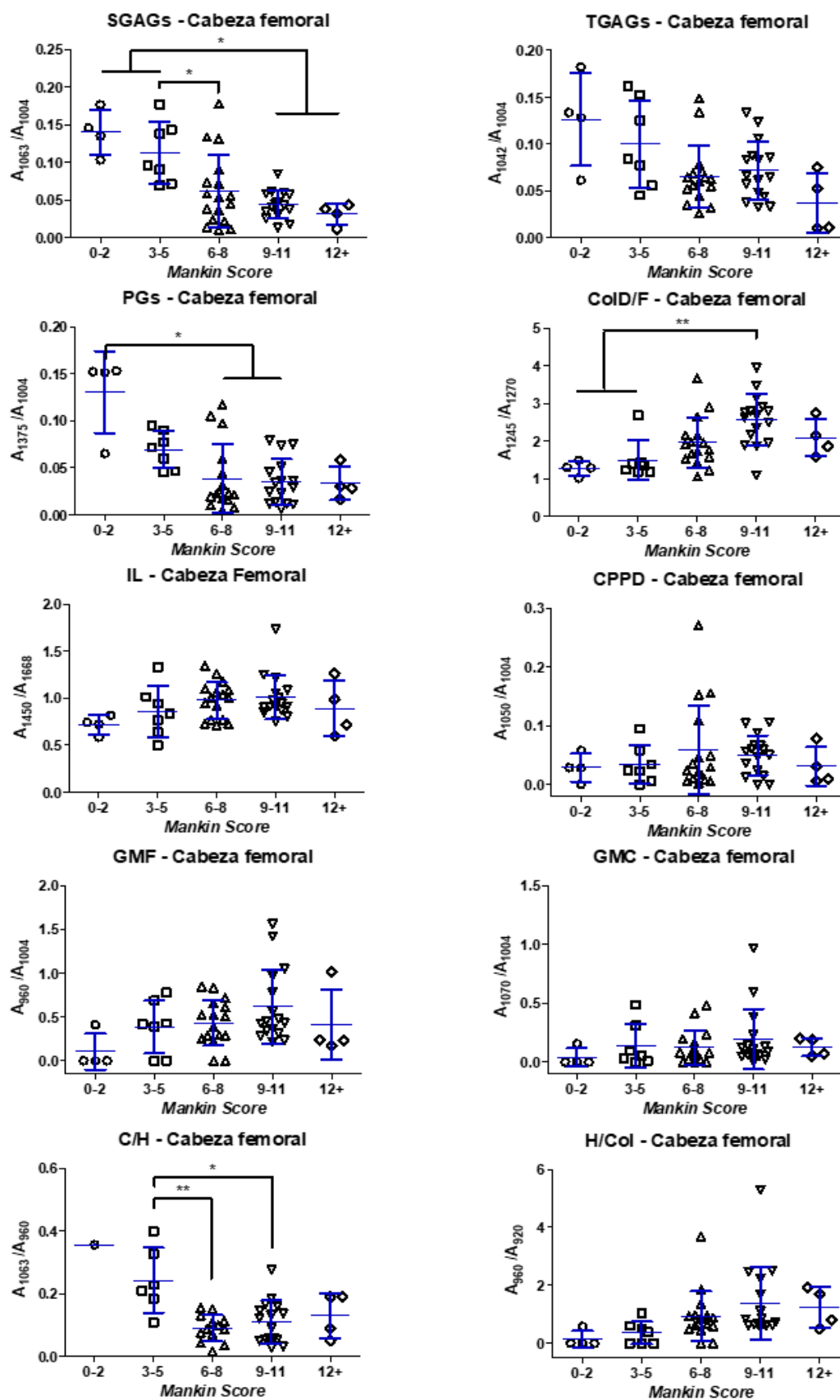


Figura 38. Resultados cuantitativos de los parámetros Raman respecto al *MS* total para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado de cabeza femoral. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

En cuanto al IL, prácticamente no se observaron alteraciones con la degradación del tejido.

En el caso de los parámetros relacionados con la mineralización (GMF, GMC, CPPD, H/Col) se observó algún aumento en muestras de mayor degradación en los parámetros GMF y H/Col, aunque no fueron significativos. En el caso del parámetro C/H, indicativo de la relación entre la matriz funcional rica en proteoglicanos y la matriz mineralizada, se observó una disminución de éste, significativa entre lesiones leves y moderadas (3-5 vs 6-8) o leves y severas (3-5 vs 9-11).

Análisis respecto al Mankin Score MS-SI: defectos en la estructura

La prueba de Krustal-Wallis para los resultados de las muestras de cabeza femoral frente a la categoría *MS-SI* (Tabla 21), mostró la presencia de diferencias significativas en los parámetros SGAGs ($p=0,001$), TGAGs ($p=0,034$), PGs ($p=0,002$), CoID/F ($p=0,009$) y C/H ($p=0,004$), de forma análoga a lo obtenido frente a las categorías de *Mankin Score* total (Tabla 14).

Tabla 21. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartílago sano y OA de cóndilo femoral respecto al *MS-SI*. Hipótesis nula: la distribución del parámetro es la misma entre las distintas categorías de *MS-SI*.

Parámetro	Significancia (p)*	Decisión
SGAGs	0,001	Rechazar la hipótesis nula
TGAGs	0,034	Rechazar la hipótesis nula
PGs	0,002	Rechazar la hipótesis nula
CoID/F	0,009	Rechazar la hipótesis nula
IL	0,366	Retener la hipótesis nula
CPPD	0,266	Retener la hipótesis nula
GMF	0,118	Retener la hipótesis nula
GMC	0,745	Retener la hipótesis nula
C/H	0,004	Rechazar la hipótesis nula
H/Col	0,074	Retener la hipótesis nula

*Se considera que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Se muestran en la figura 39 las diferencias significativas tras realizar la prueba de Bonferroni, las cuales se mantuvieron para los parámetros SGAGs, PGs, CoID/F y C/H y se perdió en el parámetro TGAGs, con respecto a la prueba de Krustal-Wallis. Las tendencias observadas en estos parámetros también fueron similares, descendente en parámetros relacionados con la presencia de proteoglicanos en la matriz, y significativa en SGAGs para *MS-SI* 1 vs *MS-SI* 4 y 5-6 y en PGs para *MS-SI* 1 vs *MS-SI* 4 y 6 y en C/H, para *MS-SI* 1 vs *MS-SI* 4. El parámetro de desorganización del colágeno CoID/F mostró una tendencia ascendente con los diferentes grados de defectos en la estructura del cartílago, significativa para *MS-SI* 1 vs *MS-SI* 6.

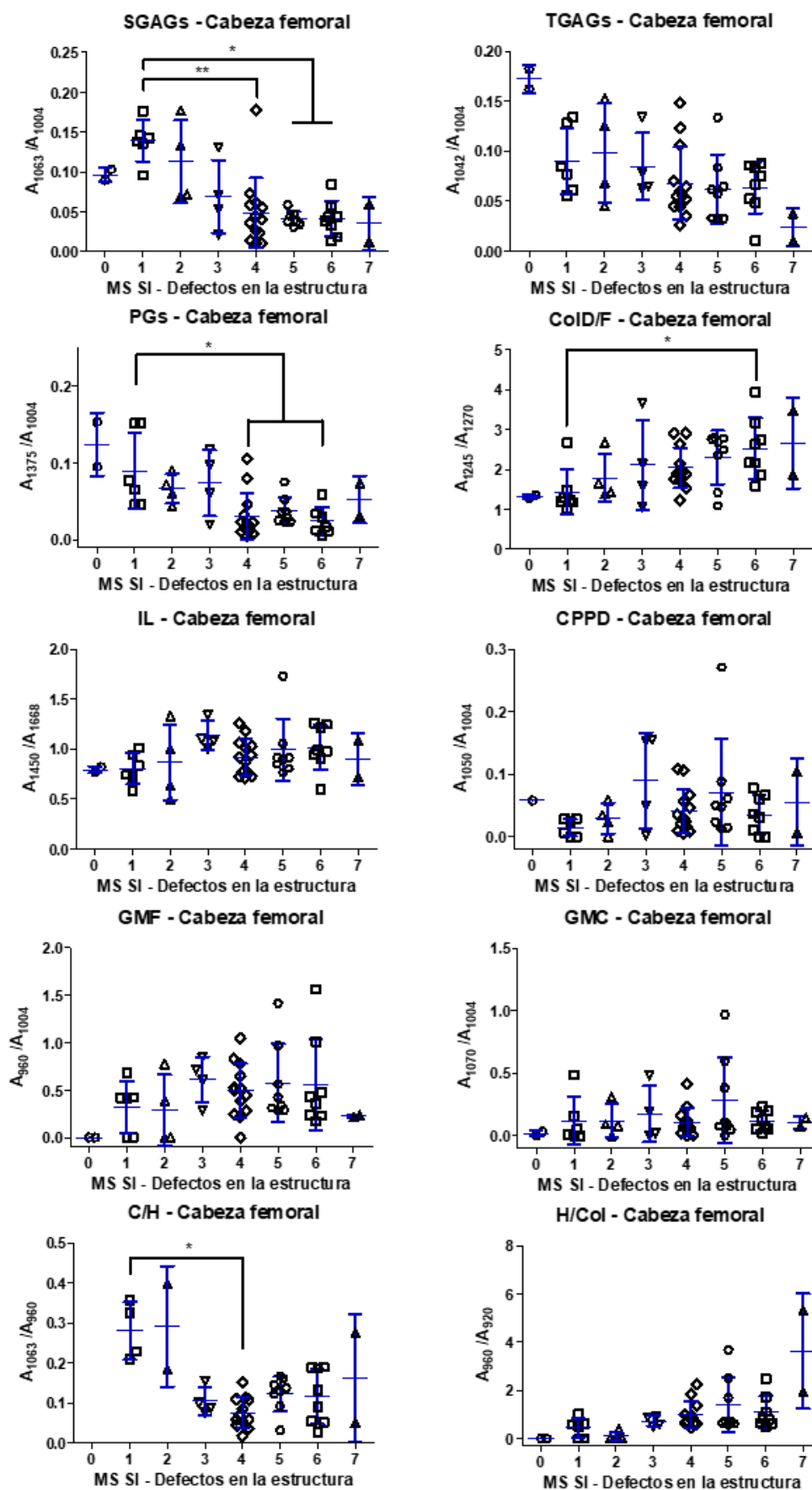


Figura 39. Resultados cuantitativos de los parámetros Raman respecto al *MS-SI* para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado de cabeza femoral. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Análisis respecto al Mankin Score MS-SII: anomalidades celulares

Analizando los resultados respecto a la categoría *MS-SII* (Tabla 22), se encontraron diferencias significativas en los parámetros SGAGs ($p=0,004$), PGs ($p=0,003$), CoID/F ($p=0,002$) y GMC ($p=0,030$).

Tabla 22. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartílago sano y OA de cadera respecto al *MS-SII*. Hipótesis nula: la distribución del parámetro es la misma entre las distintas categorías de *MS-SII*.

Parámetro	Significancia (p)*	Decisión
SGAGs	0,004	Rechazar la hipótesis nula
TGAGs	0,184	Retener la hipótesis nula
PGs	0,003	Rechazar la hipótesis nula
CoID/F	0,002	Rechazar la hipótesis nula
IL	0,399	Retener la hipótesis nula
CPPD	0,170	Retener la hipótesis nula
GMF	0,195	Retener la hipótesis nula
GMC	0,030	Rechazar la hipótesis nula
C/H	0,154	Retener la hipótesis nula
H/Col	0,693	Retener la hipótesis nula

*Se considera que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Las principales diferencias encontradas (Figura 40) se observaron entre las muestras de categoría 0 (celularidad normal) y las muestras de cualquiera de las categorías de anomalidades celulares (1- hipocelularidad y 2- presencia de clones). Estas últimas presentaron valores significativamente inferiores de los parámetros SGAGs (*MS-SII* 0 vs 1-2) y PGs (*MS-SII* 0 vs 1-2) y valores para el parámetro CoID/F significativamente mayores (*MS-SII* 0 vs 1-2). Además, se pudieron observar diferencias en los valores de GMC entre las muestras con una celularidad normal (*MS-SII* 0) y las que presentan hipocelularidad (*MS-SII* 1). En lo que respecta a los restantes parámetros, no se observó ninguna alteración en el IL, mientras que para los parámetros relacionados con la mineralización, se observaron tendencias ascendentes en CPPD, GMF y H/Col y descendente en C/H.

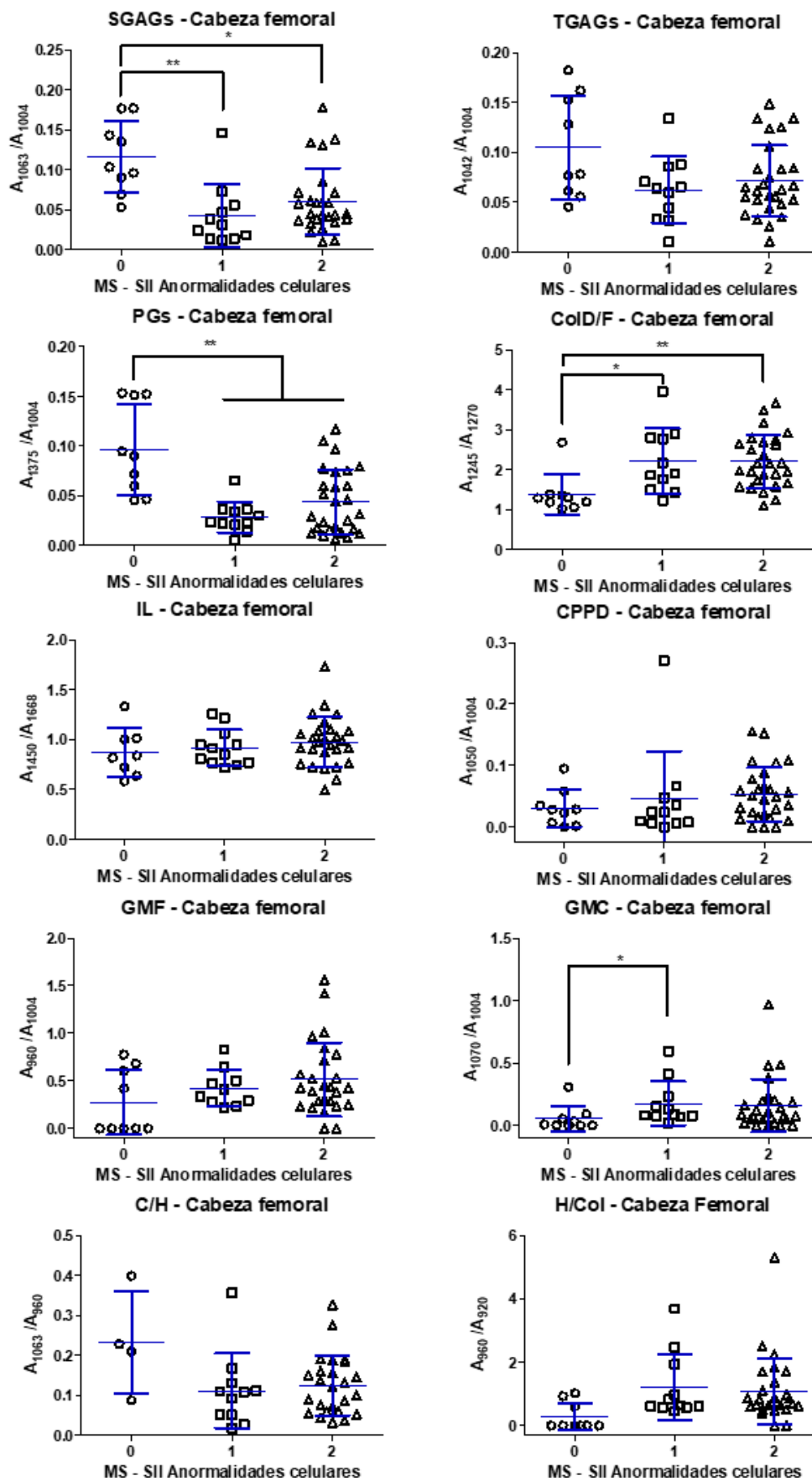


Figura 40. Resultados cuantitativos de los parámetros Raman respecto al *MS-SII* para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado de cabeza femoral. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Análisis respecto al Mankin Score MS-SIII: tinción proteoglicanos de la matriz

Los resultados de los parámetros se analizaron con respecto al *MS-SIII*, directamente relacionado con la presencia de proteoglicanos en la matriz. Analizando las muestras de cabeza femoral frente al *MS-SIII* (Tabla 23), se observaron diferencias significativas en los tres parámetros relacionados con este componente principal del cartilago: SGAGs ($p=0,002$), TGAGs ($p=0,030$), y PG ($p=0,014$).

Tabla 23. Resumen prueba de Krustal-Wallis (muestras independientes) para las muestras de cartilago sano y OA de cadera respecto al *MS-SIII*. Hipótesis nula: la distribución del parámetro es la misma entre las distintas categorías de *MS-SIII*.

Parámetro	Significancia (p)*	Decisión
SGAGs	0,002	Rechazar la hipótesis nula
TGAGs	0,030	Rechazar la hipótesis nula
PGs	0,014	Rechazar la hipótesis nula
CoID/F	0,110	Retener la hipótesis nula
IL	0,144	Retener la hipótesis nula
CPPD	0,897	Retener la hipótesis nula
GMF	0,265	Retener la hipótesis nula
GMC	0,331	Retener la hipótesis nula
C/H	0,185	Retener la hipótesis nula
H/Col	0,148	Retener la hipótesis nula

*Se considera que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Las diferencias significativas encontradas tras aplicar la prueba de Bonferroni se representaron en la figura 41. Se observó un descenso en los valores obtenidos para los parámetros indicados con la reducción de la tinción de la matriz, significativa en el caso de SGAGs para valores de *MS-SIII* 1 vs 3-4, y próxima a la significancia para valores *MS-SIII* 1 vs 2. En el caso del parámetro PGs se observaron diferencias significativas entre valores de *MS-SIII* 1 vs 2-3, mientras que la significancia en el parámetro TGAGs se pierde.

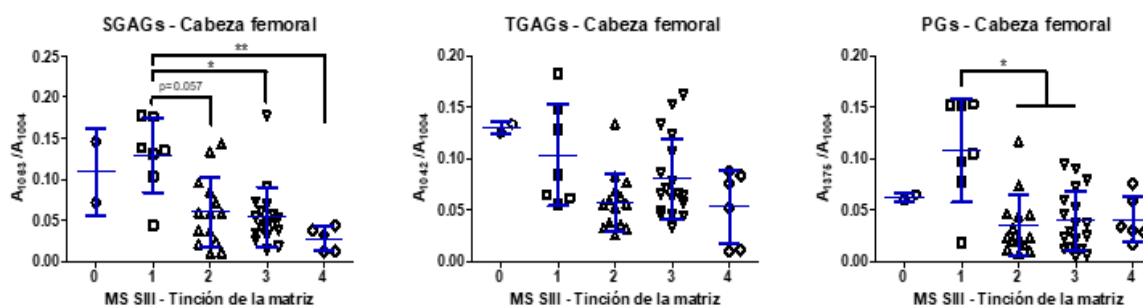


Figura 41. Resultados cuantitativos de los parámetros Raman respecto al *MS-SIII* para el conjunto de muestras de tejido sano y lesionado de cabeza femoral. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

5.2.2.2. Análisis cuantitativo del cartílago articular humano respecto a la escala *Mankin Score*: muestras de cóndilo femoral y platillo tibial

Al analizar las muestras de cartílago de rodilla, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las regiones anatómicas. Esto pudo ser debido al tamaño muestral reducido, y ausencia de muestras representativas de los grados más bajos de la escala *MS* en general, y más altos en el caso del platillo tibial en particular. Los resultados de los valores medios y DE para cada parámetro para cartílago de cóndilo femoral y platillo tibial se muestran en las tablas 24 y 25, respectivamente.

Tabla 24. Valores medios y desviaciones estándar para los parámetros Raman descritos, obtenidos en cartílago de cóndilo femoral, tomando como referencia la escala de *MS*.

Cóndilo Femoral	<i>MS</i> 0-2	<i>MS</i> 3-5	<i>MS</i> 6-8	<i>MS</i> 9-11	<i>MS</i> 12+
SGAGs	-	0,0703	0,066±0,043	0,053±0,026	0,042±0,002
TGAGs	-	0,108	0,089±0,060	0,059±0,027	0,047±0,005
PGs	-	0,020	0,038±0,016	0,038±0,023	0,018±0,005
ColD/F	-	1,804	1,785±0,289	2,373±0,664	2,058±0,065
IL	-	0,944	1,000±0,141	0,921±0,139	0,882±0,117
CPPD	-	0,108	0,027±0,015	0,054±0,052	0,041±0,014
GMF	-	0,614	0,636±0,147	0,586±0,396	0,431±0,090
GMC	-	0,175	0,146±0,132	0,141±0,133	0,074±0,045
C/H	-	0,115	0,105±0,060	0,105±0,089	0,147±0,009
H/Col	-	0,700	0,672±0,220	0,739±0,265	0,691±0,314

En ambos casos, se apreció el descenso en los valores medios de los parámetros relacionados con los PGs (SGAGs, TGAGs, PGs) con el aumento de la degradación del cartílago medido por la escala *MS*, salvo en la muestra de platillo tibial de degradación más elevada (*MS* 12+), que mostró un valor anormalmente alto en el parámetro TGAGs. En cuanto a la desorganización del colágeno, los valores fueron similares entre los grados de severidad *MS* 3-8, y más elevados en cartílago degradado con un *MS* superior a 9. Los valores del parámetro IL no sufrieron variaciones teniendo en cuenta las desviaciones estándar. En cuanto a los parámetros de mineralización, se obtuvieron elevadas desviaciones y no hubo tendencias claras entre los rangos de *MS* 6-13 en los diferentes parámetros (CPPD, GMF, GMC, C/H, H/Col) en el cartílago de ambas regiones anatómicas de la rodilla.

Tabla 25. Valores medios y desviaciones estándar para los parámetros Raman descritos, obtenidos en cartílago de platillo tibial, tomando como referencia la escala MS.

Platillo Tibial	MS 0-2	MS 3-5	MS 6-8	MS 9-11	MS 12+
SGAGs	-	-	0,062±0,019	0,060±0,019	0,051
TGAGs	-	-	0,071±0,045	0,067±0,032	0,112
PGs	-	-	0,038±0,018	0,030±0,016	0,026
CoID/F	-	-	1,964±0,477	2,209±0,981	4,239
IL	-	-	1,081±0,205	1,028±0,177	0,972
CPPD	-	-	0,251±0,303	0,063±0,060	0,055
GMF	-	-	0,600±0,146	0,740±0,954	0,666
GMC	-	-	0,131±0,074	0,089±0,056	0,133
C/H	-	-	0,130±0,061	0,124±0,097	0,076
H/Col	-	-	0,820±0,188	1,445±1,642	0,839

Los resultados de la prueba de Krustal-Wallis demostraron la ausencia de diferencias significativas en los distintos parámetros Raman de muestras de los distintos rangos del MS, entre el cartílago de cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial (Tabla 26).

Tabla 26. Resultados de la prueba de Krustal-Wallis para detectar diferencias significativas en los parámetros entre las muestras de cartílago articular de cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial, tomando como referencia la escala MS.

Valores p	MS 6-8	MS 9-11	MS 12+
SGAGs	0,480	0,215	0,158
TGAGs	0,666	0,620	0,325
PGs	0,495	0,842	0,277
CoID/F	0,768	0,248	0,325
IL	0,528	0,318	0,852
CPPD	0,327	0,962	0,585
GMF	0,113	0,948	0,485
GMC	0,463	0,773	0,498
C/H	0,417	0,700	0,601
H/Col	0,218	0,313	0,725

5.2.3. Análisis correlacional

Se realizó un análisis correlacional para las muestras de cartílago de cabeza femoral con respecto tanto al grado K-L como al *MS* total y subcategorías de este, obteniendo los resultados reflejados en la tabla 27. Estas correlaciones se estudiaron mediante el cálculo del coeficiente rho de Spearman, considerando correlaciones significativamente fuertes cuando $\rho > 0,5$ y $p < 0,05$ y débiles cuando $\rho < 0,5$ y $p < 0,05$.

Tabla 27. Análisis de las correlaciones (coeficiente rho de Spearman) entre los parámetros Raman de cartílago de cabeza femoral con respecto al grado K-L, *MS* total y subscores.

Parámetro		K-L	<i>MS</i> total	<i>MS-SI</i>	<i>MS-SII</i>	<i>MS-SIII</i>
SGAGs	rho	-0,632	-0,642	-0,601	-0,312	-0,540
	p	>0,001	>0,001	>0,001	0,033	>0,001
TGAGs	rho	-0,324	-0,395	-0,412	-0,237	-0,207
	p	0,025	0,006	0,004	0,104	0,159
PGs	rho	-0,532	-0,484	-0,482	-0,363	-0,291
	p	>0,001	<0,001	0,001	0,011	0,045
ColD/F	rho	0,529	0,593	0,612	0,386	0,352
	p	>0,001	>0,001	>0,001	0,007	0,014
IL	rho	0,427	0,196	0,167	0,131	0,188
	p	0,002	0,181	0,256	0,376	0,202
CPPD	rho	0,171	0,171	0,172	0,260	-0,065
	p	0,236	0,236	0,233	0,068	0,656
GMF	rho	0,321	0,264	0,225	0,234	0,235
	p	0,260	0,070	0,125	0,110	0,108
GMC	rho	0,293	0,245	0,212	0,15	0,256
	p	0,043	0,094	0,148	0,308	0,079
C/H	rho	-0,426	-0,287	-0,300	-0,199	-0,269
	p	0,005	0,068	0,057	0,459	0,089
H/Col	rho	0,446	0,547	0,546	0,261	0,354
	p	0,001	<0,001	<0,001	0,071	0,012

En gris oscuro se señalan las correlaciones fuertes ($\rho > 0,5$) y en gris claro, las correlaciones débiles ($\rho < 0,5$) significativas ($p < 0,05$). Los valores sombreados en blanco no presentan correlaciones significativas ($p > 0,05$).

En vista de los resultados, se han encontrado varias correlaciones significativas. Los parámetros relacionados con GAGs presentaron el mayor número de correlaciones fuertes significativas. El parámetro SGAGs presentó correlaciones negativas fuertes tanto con K-L ($\rho = -0,632$) como con el *MS* total ($\rho = -0,642$) y los subscores *SI* y *SIII* ($\rho = -0,601$ y $-0,540$, respectivamente), mientras para *SII* se observó una correlación débil ($\rho = -0,312$). El parámetro TGAGs presentó una correlación débil con el grado K-

L, el *MS* total y *SI* ($\rho=-0,324$, $-0,395$ y $-0,412$, respectivamente), y una ausencia de correlación con el *SII* y *SIII*. El parámetro *PGs* presentó una buena correlación con el grado K-L ($\rho=0,532$) y correlaciones débiles con el resto de escalas de referencia ($\rho=-0,484$, $\rho=-0,482$, $\rho=-0,363$ y $\rho=-0,291$ con *MS* total, *MS-SI*, *MS-SII* y *MS-SIII*, respectivamente).

El parámetro *ColD/F* presentó correlaciones fuertes con el grado K-L, *MS* total y *SI* ($\rho=0,529$, $0,593$ y $0,612$, respectivamente) y débiles frente al *SII* y *SIII* ($\rho=0,386$ y $0,352$, respectivamente) mientras que el *IL* apenas presentó una correlación débil con el grado K-L ($\rho=0,427$).

En lo que respecta a los parámetros relacionados con la mineralización, se observó, en general, una ausencia de correlaciones significativas, excepto para *GMC* y *C/H* con correlaciones débiles con el grado K-L ($\rho=0,293$ y $-0,426$, respectivamente), o el parámetro *H/Col*, con correlaciones débiles con el grado K-L y el *MS-SIII* ($\rho=0,446$ y $0,354$, respectivamente), y fuertes con el *MS* total y *MS-SI* ($\rho=0,547$ y $0,546$).

5.3. Análisis bioquímico

Para la validación de los parámetros Raman relacionados con los GAGs, uno de los componentes mayoritarios del cartílago, se cuantificaron los GAGs sulfatados, relacionados mayoritariamente con la molécula de sulfato de condroitina (CS). La cuantificación de colágeno total de las muestras se obtuvo a través del ensayo de cuantificación de hidroxiprolina *Hyp*, uno de los tres aminoácidos mayoritarios presentes en la cadena proteica del colágeno, constituyendo entre el 7 y 12 % de su estructura, ~10% en el caso del *Col-II*, mayoritario en cartílago articular (Hollander *et al.*, 1994; Angele *et al.*, 2004).

5.3.1. Evaluación de los efectos del láser NIR sobre las muestras

Con el fin de verificar que la radiación del láser en las muestras de cartílago no producía alteraciones en el tejido en las condiciones de medida empleadas en este trabajo, se realizaron ensayos previos en muestras de cartílago de cabeza femoral procedentes de donantes sanos ($n=3$, 2 muestras por donante). Las tinciones histológicas en muestras control (ausencia de exposición al láser) y muestras que han sido sometidas a la radiación del láser (post-raman), no demostraron cambios aparentes a nivel morfológico (H-E), ni de composición de la matriz extracelular (SO/VR y AT) (Figura 42).

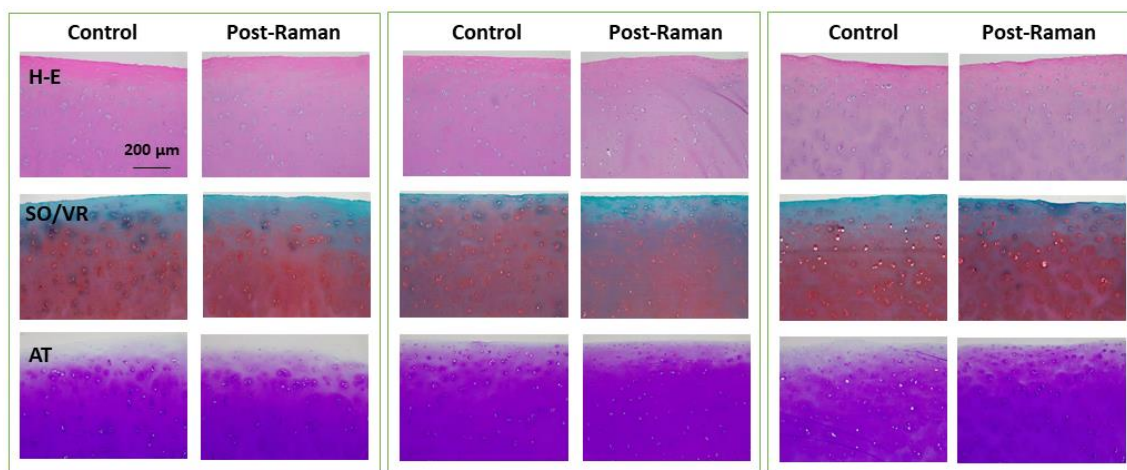


Figura 42. Tinciones histológicas (hematoxilina-eosina (H-E), safranina-O/verde rápido (SO/VR) y azul de toluidina (AT)) realizada para muestras control (sin exposición a láser, n=3) y muestras post-exposición al láser *NIR* ($\lambda=785$ nm, potencia 50 mW, 120 acumulaciones/s, n=3), durante 10 minutos.

Posteriormente, se realizaron ensayos bioquímicos para la cuantificación de sGAGs y *Hyp*, utilizando los kits comerciales correspondientes. No se encontraron diferencias significativas entre las muestras control y las muestras irradiadas en ninguno de los casos (Figuras 43 y 44).

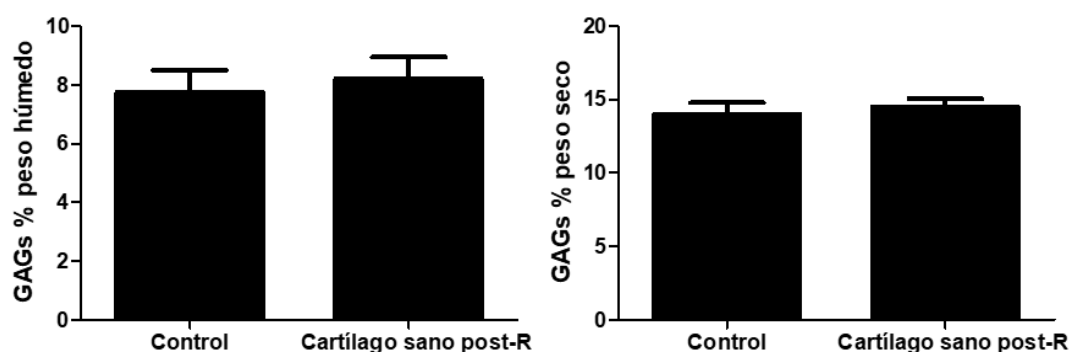


Figura 43. Cuantificación de SGAGs para muestras control (sin exposición a láser, n=3) y muestras después de la exposición al láser *NIR* ($\lambda=785$ nm, potencia 50 mW, 120 acumulaciones/s, n=3) durante 10 minutos. No se encontraron diferencias significativas.

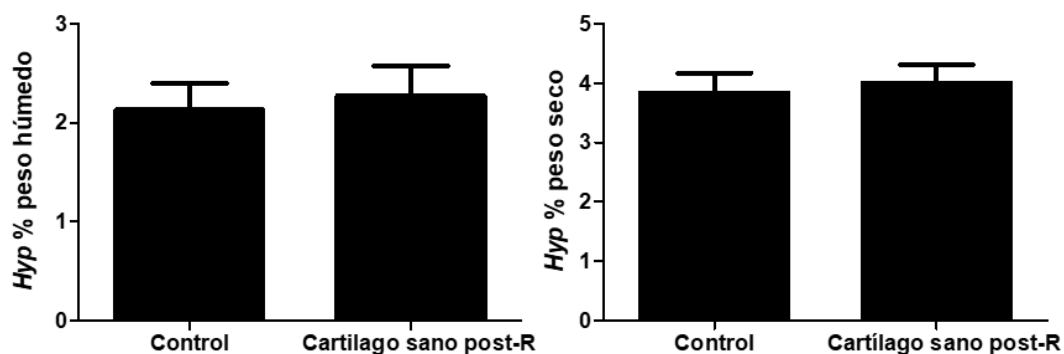


Figura 44. Cuantificación de *Hyp* para muestras control (sin exposición a láser, n=3) y muestras después de la exposición al láser *NIR* ($\lambda=785$ nm, potencia 50 mW, 120 acumulaciones/s, n=3) durante 10 minutos. No se encontraron diferencias significativas.

Una vez confirmada la ausencia de efectos en la morfología o composición del tejido, y para minimizar desviaciones producidas por el empleo de diferentes explantes, se realizaron los ensayos bioquímicos en el mismo explante que se utilizó para la adquisición de espectros.

5.3.2. Análisis bioquímico de muestras de diferentes grados K-L

Determinación de GAGs sulfatados

Al analizar el contenido de GAGs sulfatados de las muestras de cabeza femoral se obtuvieron, respecto al grado K-L, tendencias descendentes similares a las obtenidas en el análisis cuantitativo de los parámetros Raman relacionados con este componente del cartílago (SGAGs, TGAGs y PGs). En estos resultados se encontraron diferencias significativas entre las muestras de grado K-L I con respecto a las muestras de grado K-L II, III y IV (Figura 45).

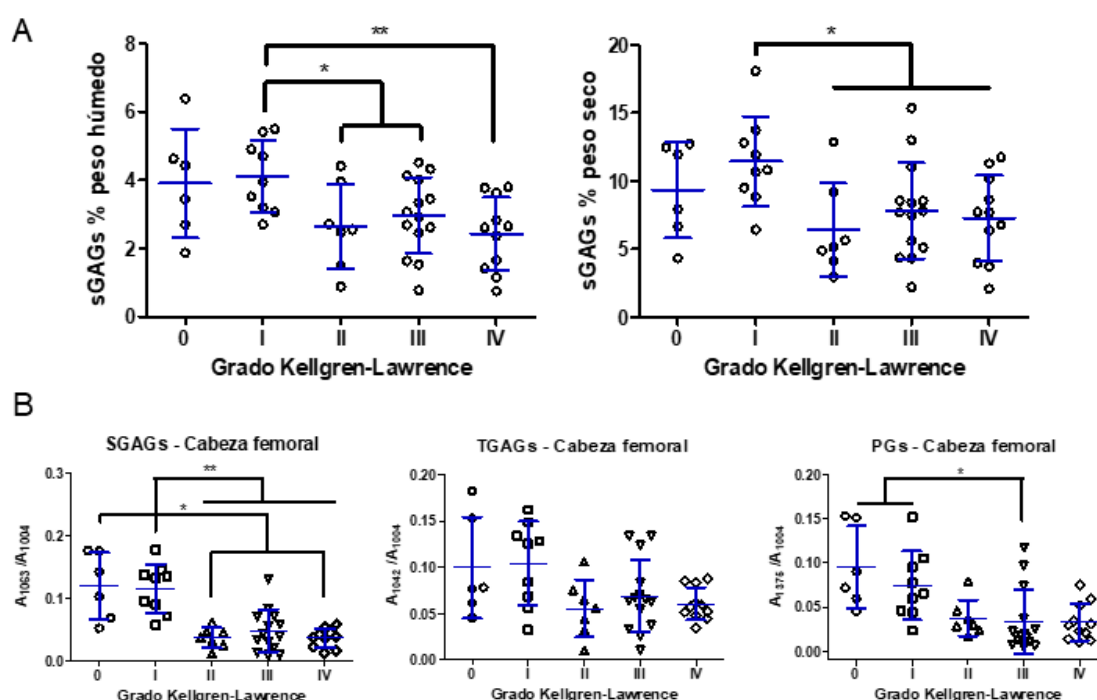


Figura 45. Análisis cuantitativo respecto al grado K-L. A: del contenido de GAGs sulfatados respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico (SGAGs, TGAGs y PGs). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Con estos resultados se obtuvieron correlaciones negativas débiles y significativas, tanto con los resultados expresados como %sGAGs p.h ($\rho = -0,4161$ y $p = 0,0360$) como expresados en %sGAGs p.s ($\rho = -0,3179$ y $p = 0,0313$) confirmando un comportamiento similar de los parámetros Raman con respecto a la cuantificación bioquímica (Figura 46).

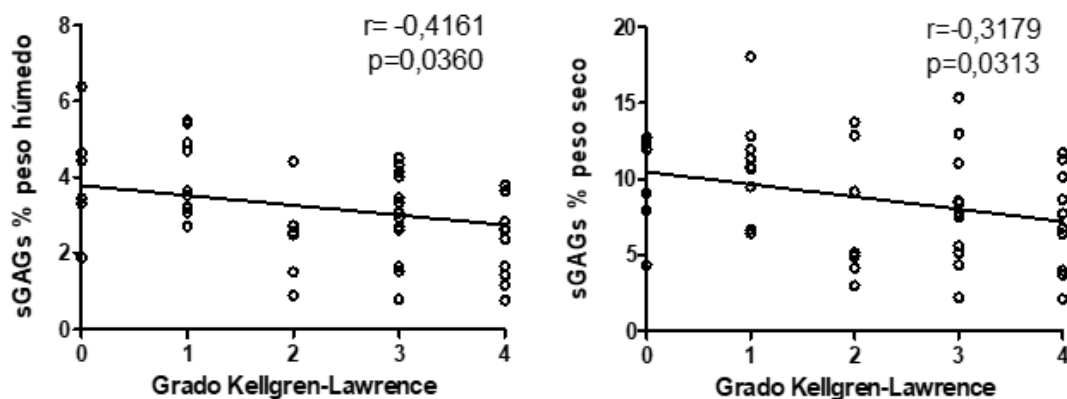


Figura 46. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados con el grado K-L: resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.). Se considera que la correlación es significativa cuando $p < 0,05$.

Determinación de colágeno total

La cuantificación del colágeno total se realizó en función de la *Hyp*, obteniendo una tendencia ligeramente descendente de este aminoácido con respecto al grado K-L y las diferencias estadísticamente significativas detalladas en la figura 47A. Estas tendencias fueron inversas a las obtenidas para los parámetros Raman $ColD/F$ y H/Col (Figura 47B).

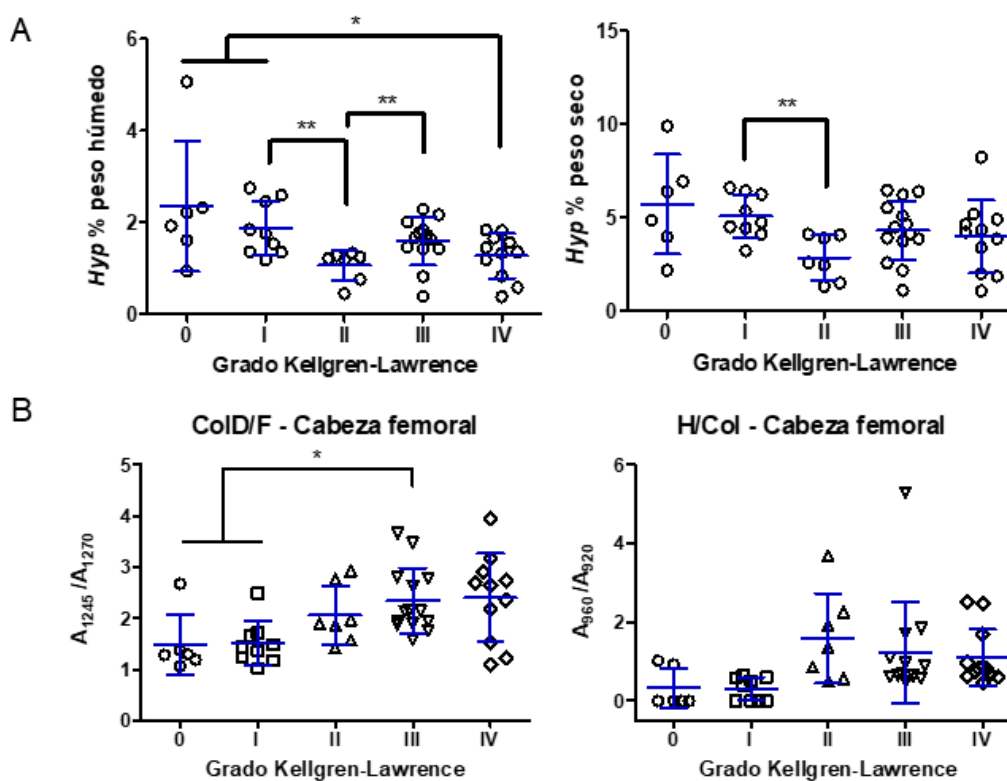


Figura 47. Análisis cuantitativo respecto al grado K-L. A: del contenido de *Hyp* respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico ($ColD/F$ y H/Col). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Mediante el estudio de las correlaciones obtenidas para la cuantificación de *Hyp* (Figura 48), se pudo observar una correlación negativa significativa de los resultados expresados en función del peso húmedo ($r=-0,3065$ y $p=0,0406$) mientras que con la cuantificación de *Hyp* expresada en función del peso seco no se obtuvo correlación ($p=0,2299$).

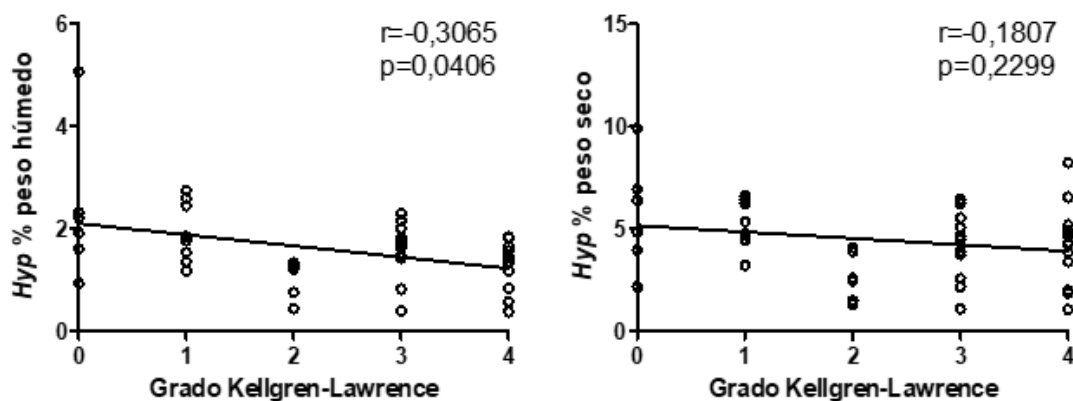


Figura 48. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de *Hyp* con el grado K-L: resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.). Se considera que la correlación es significativa cuando $p<0,05$.

La tabla 28 muestra un resumen de los resultados del análisis bioquímico de las muestras de cabeza femoral respecto al grado K-L. Los resultados apuntaron a un menor contenido de GAGs sulfatados en los grados K-L II-IV (26,49-24,26 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.h. y 78,30-64,12 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.s.) y valores de colágeno total también inferiores (15,88-10,65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.h. y 43,05-28,44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.s.) aunque se obtuvieron DE elevadas. El contenido de agua es mayor en las muestras de OA avanzada.

Tabla 28. Resultados cuantitativos de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados, colágeno total y contenido de agua de los diferentes grados K-L.

Grado K-L	K-L 0 (n=6)	K-L I (n=9)	K-L II (n=7)	K-L III (n=14)	K-L IV (n=11)
sGAGs $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.h	39,14 \pm 15,98	41,10 \pm 10,52	26,49 \pm 12,42	29,69 \pm 11,16	24,26 \pm 10,68
sGAGs $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.s	93,52 \pm 35,31	114,30 \pm 33,14	64,13 \pm 34,38	78,30 \pm 35,49	72,88 \pm 31,32
Hyp $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.h	23,47 \pm 14,2	18,71 \pm 5,81	10,65 \pm 3,33	15,88 \pm 1,43	12,71 \pm 4,87
Hyp $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.s	56,99 \pm 26,74	50,68 \pm 11,59	28,44 \pm 11,99	43,05 \pm 16,04	39,66 \pm 19,59
Contenido de agua (%)	58,60 \pm 8,60	62,63 \pm 7,79	62,16 \pm 10,87	60,51 \pm 10,37	66,01 \pm 5,67

5.3.3. Análisis bioquímico de muestras de diferentes rangos de *MS*

Determinación de GAGs sulfatados

De la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados de las muestras de cabeza femoral de los distintos rangos de *MS*, se obtuvieron de nuevo tendencias descendentes similares a las obtenidas de los resultados cuantitativos de los parámetros Raman relacionados (SGAGs, TGAGs, PGs). La figura 49 muestra estos resultados, y las diferencias significativas entre grupos encontradas únicamente en los resultados expresados en función del peso húmedo (*MS* 0-2 vs 6-13 y *MS* 3-5 vs 6-8).

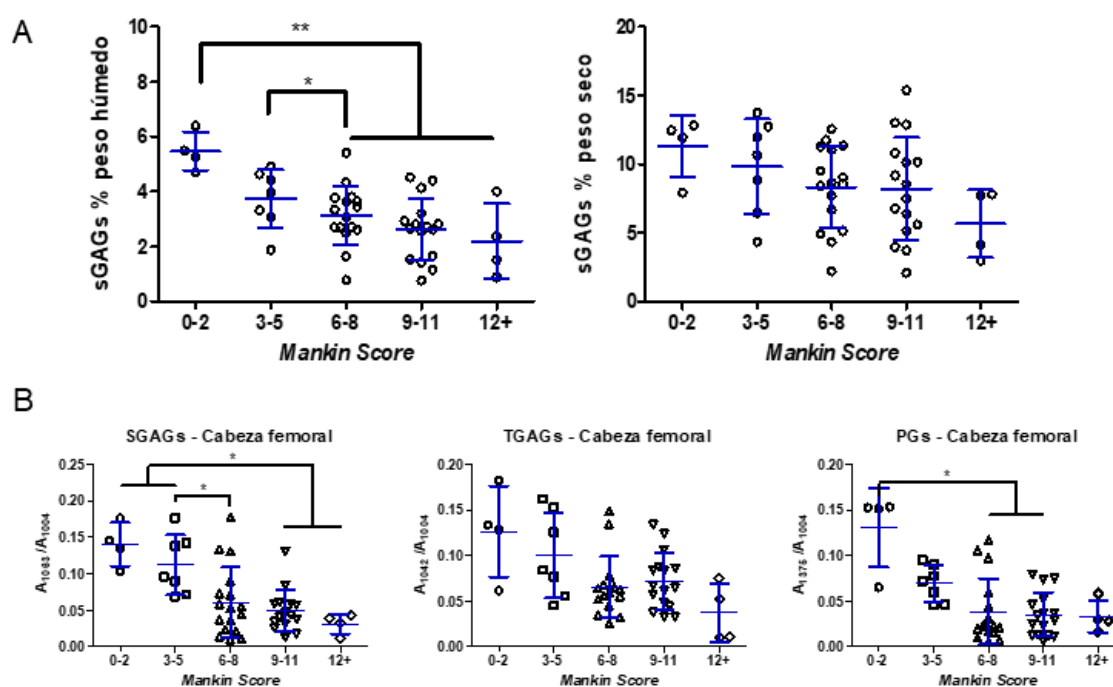


Figura 49. Análisis cuantitativo respecto al *MS*. A: del contenido de GAGs sulfatados respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico (SGAGs, TGAGs y PGs). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Los resultados de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados, expresados tanto en función del peso húmedo como seco, se correlacionaron de forma significativa con el *MS* total, con coeficientes $r = -0,5361$ y $p > 0,0001$ (% p.h.) y $r = -0,4142$ y $p = 0,0042$ (% p.s.). Estas correlaciones son negativas, es decir, el contenido de GAGs sulfatados disminuye a medida que aumenta el *MS* (Figura 50).

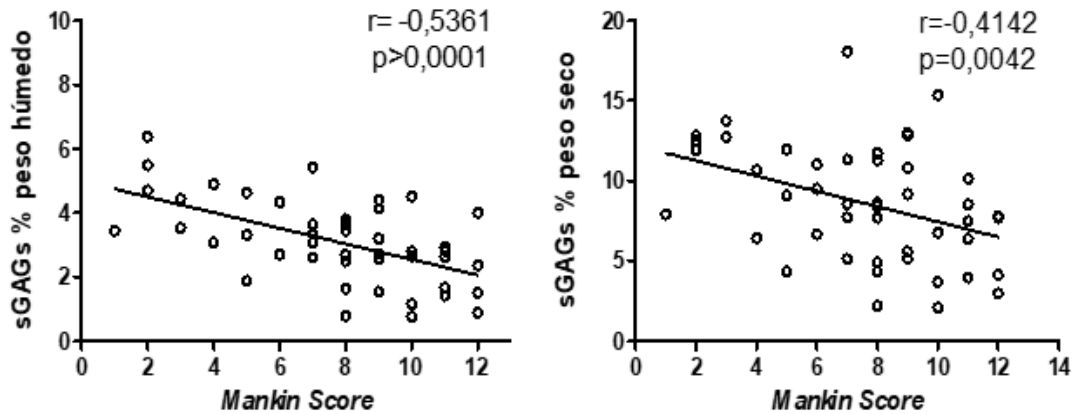


Figura 50. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados con el MS: resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.). Se considera que la correlación es significativa cuando $p < 0,05$.

Los resultados de cuantificación de GAGs sulfatados también se presentaron frente al *MS-SIII*, directamente relacionado con el contenido de proteoglicanos de la matriz (Figura 51), obteniendo las mismas tendencias descendentes que los resultados cuantitativos de los parámetros Raman asociados (SGAGs, TGAGs, PGs) frente al *MS* total y *MS-SIII*, obteniendo diferencias significativas entre *MS-SIII* 0 vs 1-4 y *MS-SIII* 1 vs 3, únicamente en los resultados expresados en % p.h.

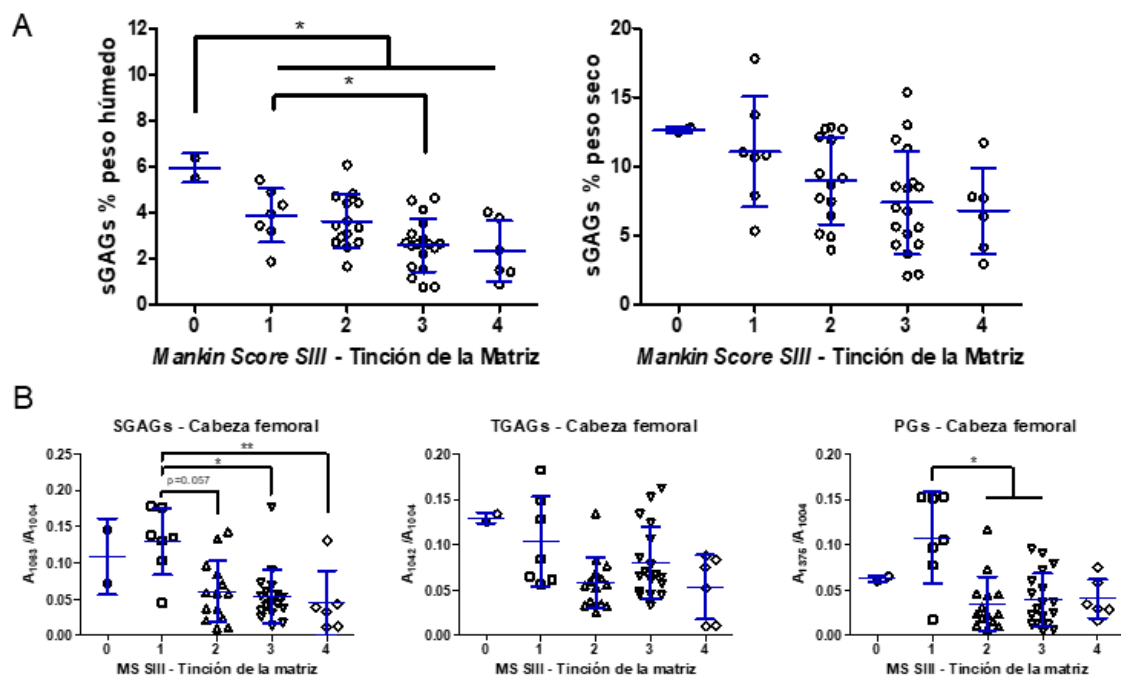


Figura 51. Análisis cuantitativo respecto al *MS-SIII*. A: del contenido de GAGs sulfatados respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico (SGAGs, TGAGs y PGs). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Se obtuvieron correlaciones significativas con el *MS-SIII* expresando los resultados tanto en % p.h. ($r=-0,5469$ y $p=0,0001$) como % p.s. ($r=-0,4309$ y $p=0,0044$), siendo más fuerte la obtenida respecto al % p.h. (Figura 52).

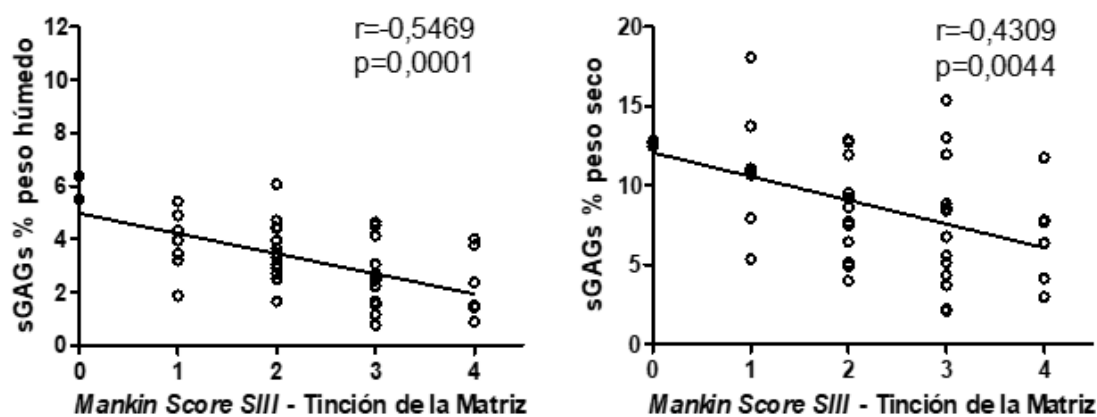


Figura 52. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados con el *MS-SIII*: resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.). Se considera que la correlación es significativa cuando $p<0,05$.

Determinación del colágeno total

Los resultados de cuantificación bioquímica relativa de colágeno total (cuantificación de *Hyp*) de las muestras de los diferentes rangos de *MS* siguieron una tendencia descendente, mostrando diferencias significativas entre los rangos de *MS* 0-2 y *MS* 3-11 en los resultados expresados en % p.h., y *MS* 0-2 y 3-12+ en los resultados expresados en % p.s (Figura 53). Estos resultados mostraron una tendencia inversa a los parámetros de desorganización del colágeno (CoID/F) y mineralización/matriz colagenosa (H/Col). Se obtuvieron correlaciones significativas del *MS* con los resultados de *Hyp* expresados tanto en % p.h. ($r=-0,5373$ y $p=0,0100$) como % p.s. ($r=-0,3915$ y $p=0,0059$), siendo más fuerte la obtenida respecto al % p.h. (Figura 54).

La tabla 29 muestra un resumen de los resultados de los análisis bioquímicos de las muestras de cabeza femoral respecto al *MS*. Los resultados apuntaron a un menor contenido de GAGs sulfatados con el aumento de la severidad del *MS* tanto total (rangos de valores medios de 54,62-21,96 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.h. y 112,93-56,60 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.s.) como *MS-SIII* (rangos de valores medios de 59,43-23,31 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.h. y 126,49-67,93 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.s.). Los valores de *Hyp* también resultaron inferiores a valores mayores de *MS* (30,85-10,99 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.h. y 74,60-26,41 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.s.) aunque se obtuvieron DE elevadas. El contenido de agua en las muestras de degradación más avanzada (mayor *MS*) es ligeramente mayor.

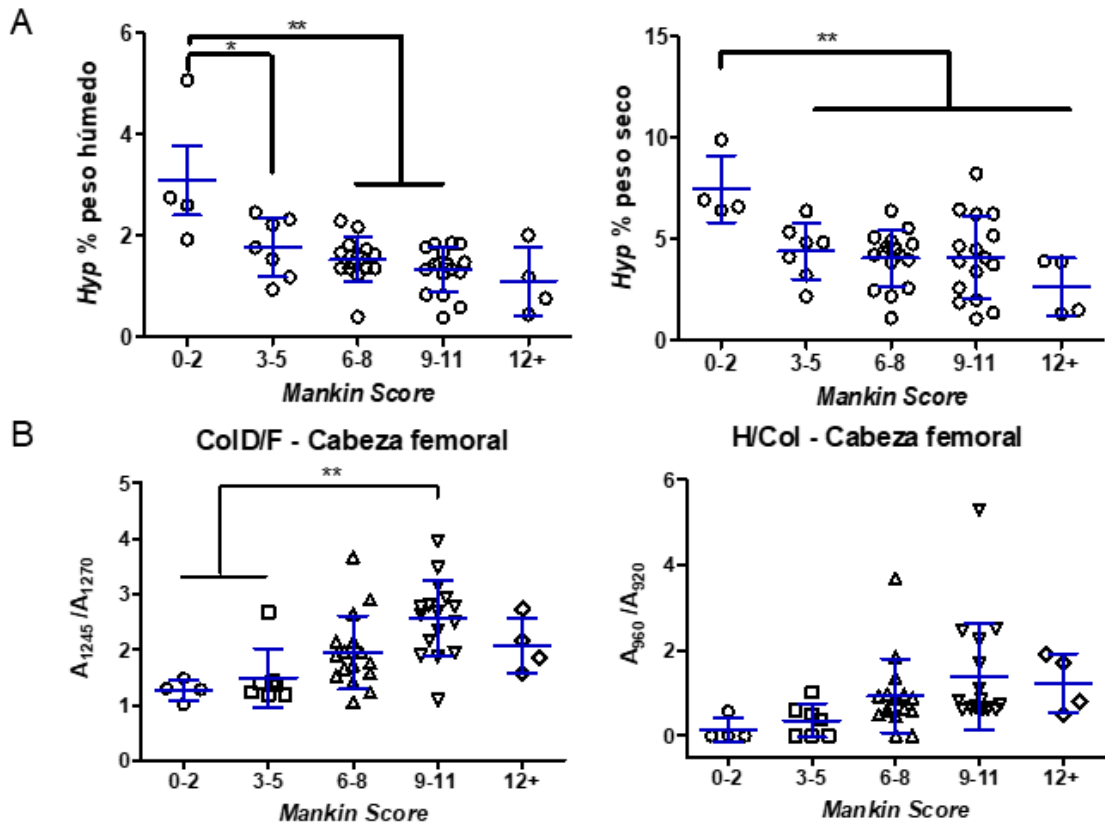


Figura 53. Análisis cuantitativo respecto al MS. A: del contenido de *Hyp* respecto al peso húmedo (izq.) y respecto al peso seco (dcha.); B: de los parámetros Raman asociados con este componente bioquímico (CoID/F y H/Col). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

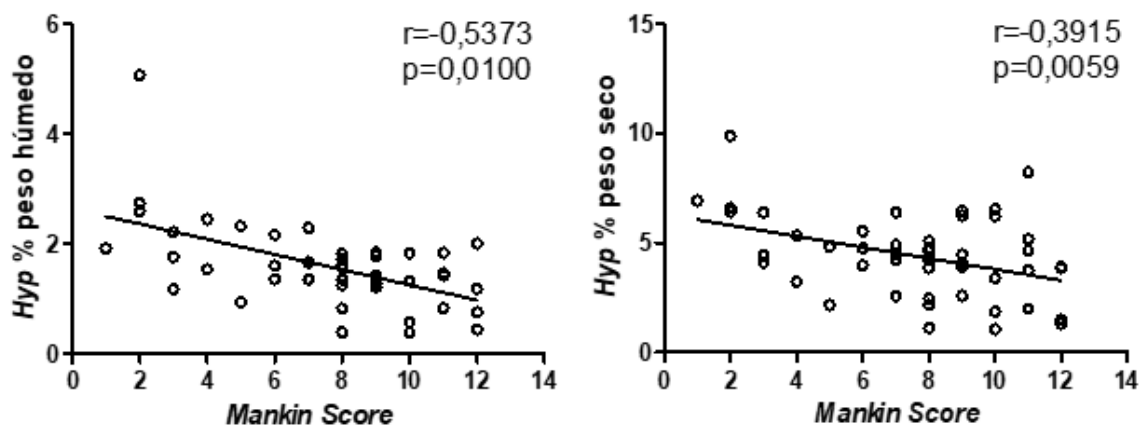


Figura 54. Correlaciones obtenidas a partir de la cuantificación bioquímica de *Hyp* con el MS: resultados expresados respecto a peso húmedo (izq.) y peso seco (dcha.). Se considera que la correlación es significativa cuando $p < 0,05$.

Tabla 29. Resultados cuantitativos de la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados, colágeno total y contenido de agua de los diferentes rangos de MS.

Mankin Score	MS 0-2 (n=4)	MS 3-5 (n=7)	MS 6-8 (n=16)	MS 9-11 (n=16)	MS 12+ (n=4)
sGAGs µg/mg p.h	54,62 ± 7,01	37,42 ± 10,63	31,33 ± 10,71	26,21 ± 11,20	21,96 ± 13,57
sGAGs µg/mg p.s	112,93 ± 22,74	98,24 ± 34,55	83,21 ± 30,03	82,53 ± 37,38	56,60 ± 24,71
Hyp µg/mg p.h	30,85 ± 13,70	17,73 ± 5,87	15,29 ± 4,37	13,26 ± 4,42	10,99 ± 6,78
Hyp µg/mg p.s	74,60 ± 16,39	44,12 ± 13,91	40,4 ± 13,57	40,89 ± 20,42	26,41 ± 14,34
Contenido de agua (%)	59,10 ± 9,72	58,49 ± 7,20	60,37 ± 9,40	67,42 ± 5,52	64,07 ± 11,62
Mankin Score-SIII	MS-SIII 0 (n=2)	MS-SIII 1 (n=7)	MS-SIII 2 (n=14)	MS-SIII 3 (n=18)	MS-SIII 4 (n=6)
sGAGs µg/mg p.h	59,43 ± 6,31	38,78 ± 11,76	36,06 ± 11,63	25,80 ± 11,47	23,31 ± 13,04
sGAGs µg/mg p.s	126,49 ± 2,49	110,55 ± 39,94	89,59 ± 31,55	73,87 ± 37,25	67,93 ± 31,04

5.3.3. Correlaciones de la cuantificación bioquímica con los parámetros Raman asociados

Seguidamente a los resultados anteriores, se analizaron las correlaciones entre los resultados de los análisis bioquímicos obtenidos frente a los diferentes parámetros Raman relacionados. La figura 55 muestra las correlaciones obtenidas entre los resultados de la cuantificación de GAGs sulfatados con los parámetros SGAGs, TGAGs y PGs. Los parámetros SGAGs y PGs mostraron correlaciones positivas significativas, siendo las correlaciones más fuertes las halladas respecto al parámetro SGAGs ($r=0,6830$ y $p<0,0001$, con % p.h. y $r=-0,5872$ y $p<0,0001$, con % p.s.), seguida de las obtenidas con el parámetro PGs ($r=0,5952$ y $p<0,0001$, con % p.h. y $r=-0,5245$ y $p=0,0002$, con % p.s.). No se encontraron correlaciones significativas entre el parámetro TGAGs y los resultados de la cuantificación de GAGs sulfatados expresados ni como % p.h. como % p.s. ($p=0,0747$ y $p=0,1745$, respectivamente).

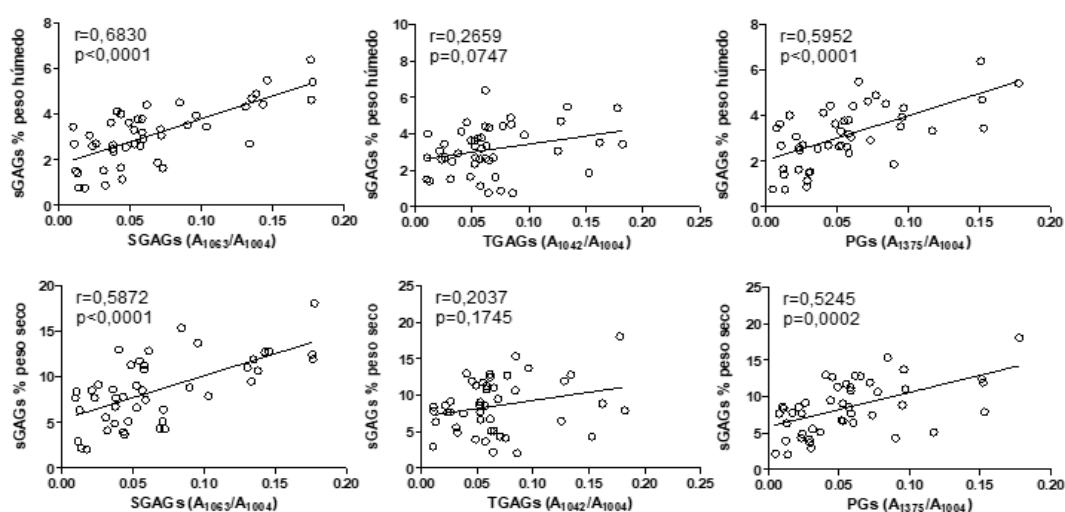


Figura 55. Correlaciones obtenidas entre los parámetros SGAGs (izq.), TGAGs (centro) y PGs (dcha.) con la cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados normalizados tanto respecto al peso húmedo como peso seco. Las gráficas muestran el valor del coeficiente rho de Spearman (r). Se considera que la correlación es significativa cuando $p<0,05$.

En la tabla 30 se resumen las correlaciones obtenidas entre los parámetros Raman relacionados con los GAGs, y las distintas escalas de referencia para su validación.

Tabla 30. Análisis de las correlaciones (coeficiente rho de Spearman) entre los parámetros Raman de cartílago de cabeza femoral con respecto al grado K-L, MS total y subcores.

Parámetro		sGAGs p.h.	sGAGs p.s.	K-L	MS total	MS-SI	MS-SII	MS-SIII
SGAGs	rho	0,6830	0,5872	-0,632	-0,642	-0,601	-0,312	-0,540
	p	<0,0001	<0,0001	>0,001	>0,001	>0,001	0,033	>0,001
TGAGs	rho	0,2659	0,2037	-0,324	-0,395	-0,412	-0,237	-0,207
	p	0,0747	0,1745	0,025	0,006	0,004	0,104	0,159
PGs	rho	0,5952	0,5245	-0,532	-0,484	-0,482	-0,363	-0,291
	p	<0,0001	0,0002	>0,001	<0,001	0,001	0,011	0,045

En gris oscuro se señalan las correlaciones fuertes ($\rho > 0,5$) y en gris claro, las correlaciones débiles ($\rho < 0,5$). Los valores sombreados en blanco no presentan correlaciones significativas ($p > 0,05$).

La cuantificación de *Hyp* (colágeno total) se correlacionó significativamente con los parámetros ColD/F y H/Col (Figura 56). Con ambos parámetros las correlaciones obtenidas fueron negativas y débiles, con valores de coeficiente rho en el caso del parámetro ColD/F de $r = -0,2894$ con respecto al % p.h. y $r = -0,2960$ con respecto al % p.s. En el caso del parámetro H/Col se obtuvieron correlaciones débiles, con coeficientes de $r = 0,3168$ (% p.h.) y $r = 0,4053$ (% p.s.).

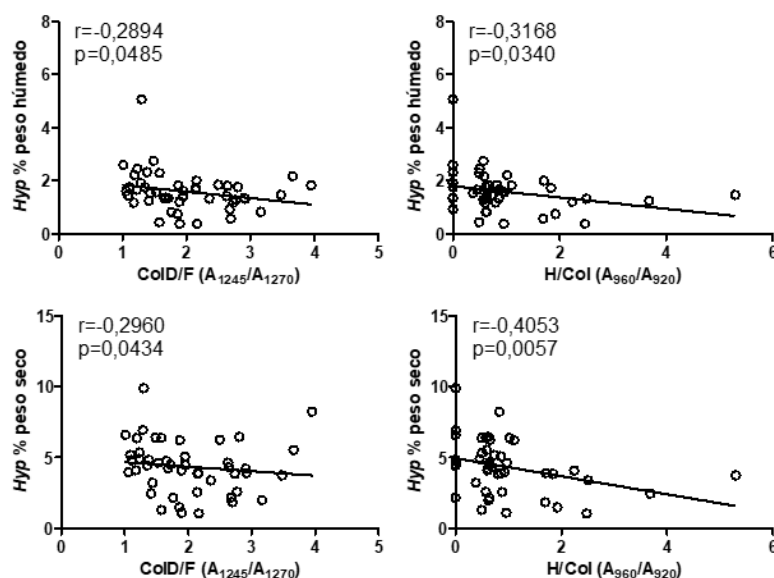


Figura 56. Correlaciones obtenidas entre los parámetros ColD/F (izq.) y H/Col (dcha.) con la cuantificación bioquímica de *Hyp* normalizada tanto respecto al peso húmedo como peso seco. Las gráficas muestran el valor del coeficiente rho de Spearman (r). Se considera que la correlación es significativa cuando $p < 0,05$.

En la tabla 31 se resumen todas las correlaciones obtenidas entre los parámetros Raman relacionados con el colágeno, y las distintas referencias empleadas para su validación, obteniendo relaciones inversas entre las correlaciones con los resultados de la bioquímica y las escalas de severidad de OA utilizadas como referencia.

Tabla 31. Análisis de las correlaciones (coeficiente rho de Spearman) entre los parámetros Raman de cartílago de cabeza femoral con respecto al grado K-L, MS total y subcores.

Parámetro		Hyp p.h	Hyp p.h.	K-L	MS total	MS-SI	MS-SII	MS-SIII
CoID/F	rho	-0,2894	-0,2960	0,529	0,593	0,612	0,386	0,352
	p	0,0485	0,0434	>0,001	>0,001	>0,001	0,007	0,014
H/Col	rho	-0,3168	-0,4053	0,446	0,547	0,546	0,261	0,354
	p	0,0340	0,0057	0,001	<0,001	<0,001	0,071	0,012

En gris oscuro se señalan las correlaciones fuertes ($\rho > 0,5$) y en gris claro, las correlaciones débiles ($\rho < 0,5$). Los valores sombreados en blanco no presentan correlaciones significativas ($p > 0,05$).

5.4. Identificación de perfiles y establecimiento de un modelo predictivo de severidad de artrosis

5.4.1. Análisis clúster

Los diferentes perfiles de severidad se establecieron mediante el método de k-medias, tomando como variables los parámetros Raman SGAGs, CoID/F y GMF, de forma que, para establecer subgrupos, se tomó un parámetro Raman por cada evento molecular diferente que se desarrolla en el cartílago OA (SGAGs - pérdida de GAGs, CoID/F - desorganización de las fibras de colágeno y GMF - mineralización).

Inicialmente, se estimó el número óptimo de subgrupos o clústeres mediante el *método del codo*, obteniendo un número óptimo de perfiles diferentes de $k=2$. Se realizó el análisis clúster tanto para el conjunto global de las muestras de cartílago (cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial), como para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral.

A partir del análisis clúster del global de muestras se diferenciaron los siguientes dos perfiles. El “**Perfil 1: gravedad baja**”, se caracteriza por tomar valores de SGAGs más elevados y CoID/F y GMF más bajos, estando constituido en un 51,4% por muestras de **K-L 0-II** y en un 90,3% por muestras de **MS 0-8** (Tabla 32). Los valores medios finales del perfil 1 fueron GAGs=0,072, CoID/F=1,616 y GMF=0,446 (Tabla 33). El “**Perfil 2: gravedad elevada**”, se caracteriza por tener GMF y CoID/F elevados y SGAGs bajos. Está constituido en un 66,1% por muestras de **K-L III-IV** y en un 74,2% por muestras de **MS 9-13** (Tabla 32). Este perfil presentó valores medios finales de SGAGs=0,053, CoID/F=2,849 y GMF=0,572 (Tabla 33).

Tabla 32. Perfiles encontrados mediante el análisis clúster por el método k-medias en el global de muestras de cartílago articular.

Clúster	n	SGAGs	CoID/F	GMF	K-L	MS
Perfil 1: gravedad baja	59	↑	↓	↓	0-I-II	0-8
Perfil 2: gravedad elevada	31	↓	↑	↑	III-IV	9-13

Tabla 33. Valores medios finales de cada perfil derivados del análisis clúster por el método k-medias en el global de muestras de cartílago articular.

Valores medios finales	SGAGs	CoID/F	GMF
Perfil 1: gravedad baja	0,072	1,616	0,466
Perfil 2: gravedad elevada	0,053	2,849	0,572

Se reprodujo el análisis para el subconjunto de datos de cartílago de cabeza femoral y se verificó que los perfiles descritos anteriormente se mantenían (Tabla 34). Se obtuvo el “**Perfil 1: gravedad baja**”, que se caracteriza por tomar valores más elevados en SGAGs y más bajos en CoID/F y GMF y que está constituido en un 61,2%, por muestras de **K-L 0-II** y en un 77,4%, por muestras de **MS 0-8**. El “**Perfil 2: gravedad elevada**”, se caracteriza por tener GMF y CoID/F elevados y SGAGs bajos y está constituido en un 75%, por muestras de **K-L III-IV** y en un 75%, por muestras de **MS 9-13**. Con respecto al análisis anterior, se produjeron pequeñas variaciones en los valores medios finales de los perfiles 1 y 2 en los parámetros SGAGs (0,077 y 0,051, respectivamente) y CoID/F (1,611 y 2,916, respectivamente). Al disminuir el tamaño muestral, el valor medio final del parámetro de mineralización GMF en el perfil 1 disminuyó (0,385) mientras que el del perfil 2 también registró una variación pequeña (0,564) (Tabla 35).

Tabla 34. Perfiles encontrados mediante el análisis clúster por el método k-medias en cartílago de cabeza femoral.

Clúster	n	SGAGs	CoID/F	GMF	K-L	MS
Perfil 1: gravedad baja	31	↑	↓	↓	0-I-II	0-8
Perfil 2: gravedad elevada	16	↓	↑	↑	III-IV	9-13

Tabla 35. Valores medios finales de cada perfil derivados del análisis clúster por el método k-medias en cartílago de cabeza femoral.

Valores medios finales	SGAGs	CoID/F	GMF
Perfil 1: gravedad baja	0,077	1,611	0,385
Perfil 2: gravedad elevada	0,051	2,916	0,564

5.4.2. Modelos de regresión logística: global de las muestras

Con el objetivo de establecer un modelo predictivo de severidad de la OA, se procedió a la búsqueda de puntos de corte en las variables SGAGs, CoID/F y GMF, identificadores de los perfiles descritos anteriormente mediante análisis clúster, tomando como variable respuesta “baja severidad de OA” (K-L 0-II o MS 0-8) o “alta severidad de OA” (K-L III-IV o MS 9-13). Los análisis se realizaron teniendo en cuenta tanto las variables continuas como dicotómicas en función de estos puntos de corte.

5.4.2.1. Grado K-L como variable respuesta

5.4.2.1.1. Variables continuas

Mediante modelos multivariados de regresión logística, se estudió el impacto de cada variable correspondiente a los parámetros Raman, así como el efecto de otras variables como la edad o el sexo, en la probabilidad de detectar grados elevados de OA. En la tabla 36 se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 36. Resultados del modelo predictivo mediante modelos multivariados de regresión logística: odds ratio (OR), valores p e intervalos de confianza (IC), para el global de muestras tomando como variable respuesta el grado K-L.

Variable	OR	p	Menor IC 95%	Mayor IC 95%
Edad	1,0030	0,9308	0,9365	1,0724
Sexo	1,0440	0,9442	0,3152	3,6229
SGAGs	<0,0001	0,0010	<0,0001	<0,0001
CoID/F	2,3674	0,0597	1,0261	6,3556
GMF	19,8685	0,0243	2,0002	387,0026

Los datos para el OR indicaron una probabilidad muy baja de OA avanzada con valores altos del parámetro SGAGs ($OR < 0,0001$ y $p = 0,001$), mientras valores altos del

ColD/F ($OR=2,3674$ y $p=0,0597$) y GMF ($OR=19,8685$ y $p=0,0243$) incrementaron la probabilidad de tratarse el tejido analizado de cartílago procedente de un paciente con severidad de OA elevada. Las variables edad ($p=0,9308$) y sexo ($p=0,9442$) no resultaron significativas, por lo que se realizó el modelo teniendo en cuenta exclusivamente las variables correspondientes a los parámetros Raman.

En la figura 57, se presenta la curva ROC correspondiente al modelo, tomando el grado K-L III-IV como variable respuesta.

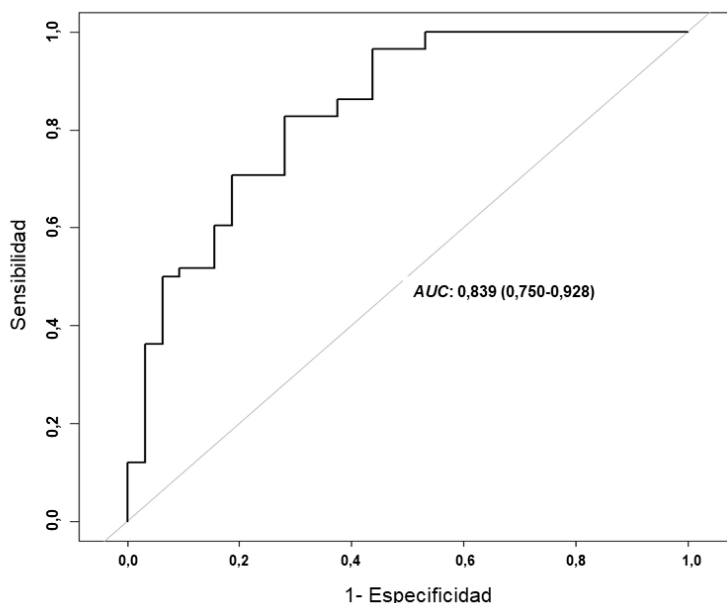


Figura 57. Curva ROC del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, en función de los parámetros Raman como variables continuas, tomando como variable respuesta el grado K-L.

El valor de área bajo la curva (AUC) es alto (Tabla 37), superior al 83% (0,839) con un $IC95\%=0,750-0,928$, correspondiéndose este valor con un modelo predictivo “muy bueno”. Se obtuvieron unos valores de sensibilidad y especificidad de 0,828 y 0,719, respectivamente, con un valor predictivo negativo (VPN) del 70% y un valor predictivo positivo (VPP) del 84%.

Tabla 37. Estimación e intervalos de confianza del AUC , sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, obtenidos a partir de los parámetros Raman como variables continuas, tomando como variable respuesta el grado K-L.

	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
Estimación	0,839	0,828	0,719	0,700	0,842
IC 95%	0,750 – 0,928	0,724 – 0,914	0,562 – 0,988	0,571 – 0,833	0,799 – 0,923

El modelo predictivo definido constituye el nomograma representado en la figura 58, que establece una puntuación en base a los valores obtenidos para cada parámetro Raman, y el riesgo de padecer una OA severa (K-L III-IV) en base a esta puntuación.

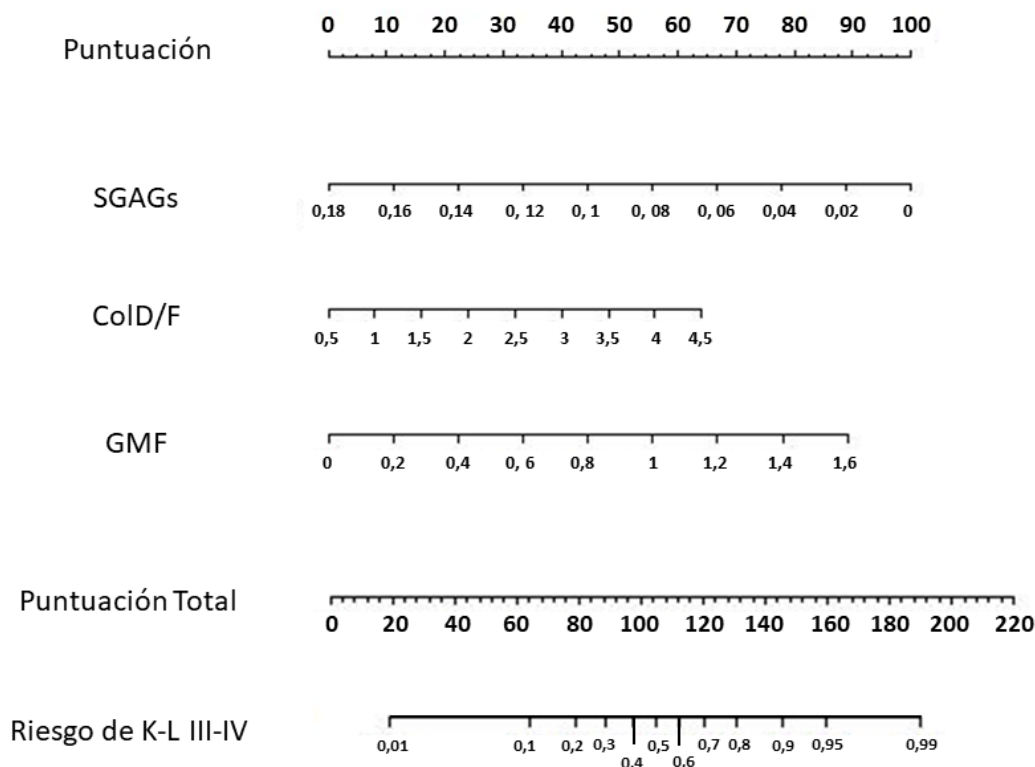


Figura 58. Nomograma resultado del modelo predictivo de severidad de OA tomando como variable respuesta el grado K-L. De la barra correspondiente se extrae, para cada parámetro Raman, una puntuación equivalente en la escala superior (“Puntuación”). La suma de las 3 puntuaciones equivale a una mayor o menor probabilidad de las muestras analizadas a pertenecer a una clasificación de grado K-L III-IV en la escala inferior (“Puntuación total” vs “Riesgo de K-L III-IV”).

5.4.2.1.2. Variables codificadas

Para una interpretación más simplificada, se establecieron puntos de corte para cada parámetro Raman, SGAGs (0,0875), CoID/F (1,7280) y GMF (0,4289) mediante el índice Youden de las correspondientes curvas *ROC* para cada parámetro (Tabla 38). Los *OR* calculados para este nuevo modelo teniendo en cuenta las variables codificadas, mostraron que un valor de SGAGs por debajo del punto de corte (SGAGs <0,0875) incrementa significativamente la probabilidad de que la muestra de cartílago pertenezca a un paciente de severidad de OA elevada ($OR=14,7844$ y $p=0,0005$). Lo mismo ocurre con valores de CoID/F y GMF mayores al punto de corte (CoID/F >1.7280 y GMF >0,4289), siendo esta relación de probabilidad significativa en el caso del GMF ($OR=2,7506$ y $p=0,0138$) y no significativa en el caso del parámetro CoID/F ($OR= 4,0632$ y $p=0,0729$).

Tabla 38. Resultados del modelo predictivo a partir de los puntos de corte obtenidos mediante modelos multivariados de regresión logística: punto de corte, *odds ratio* (OR), valores p e intervalos de confianza (IC), para el global de muestras tomando como variable respuesta el grado K-L.

Variable	Punto de corte	OR	p	Menor IC 95%	Mayor IC 95%
SGAGs	0,0875	14,7844	0,0005	3,6303	79,8212
CoID/F	1,7280	2,7506	0,0729	0,9023	8,4335
GMF	0,4289	4,0632	0,0138	1,3765	13,2350

A partir de este segundo modelo, teniendo en cuenta los parámetros Raman codificados en función de sus puntos de corte, se obtuvo la curva ROC mostrada en la figura 59, cuyos parámetros se detallan en la tabla 39, constituyendo un modelo predictivo “muy bueno” ($AUC=0,822$; IC95% 0,729-0,915), con una sensibilidad y especificidad de 0,862 y 0,625, respectivamente. El VPP es del 80% y el VPN del 71%.

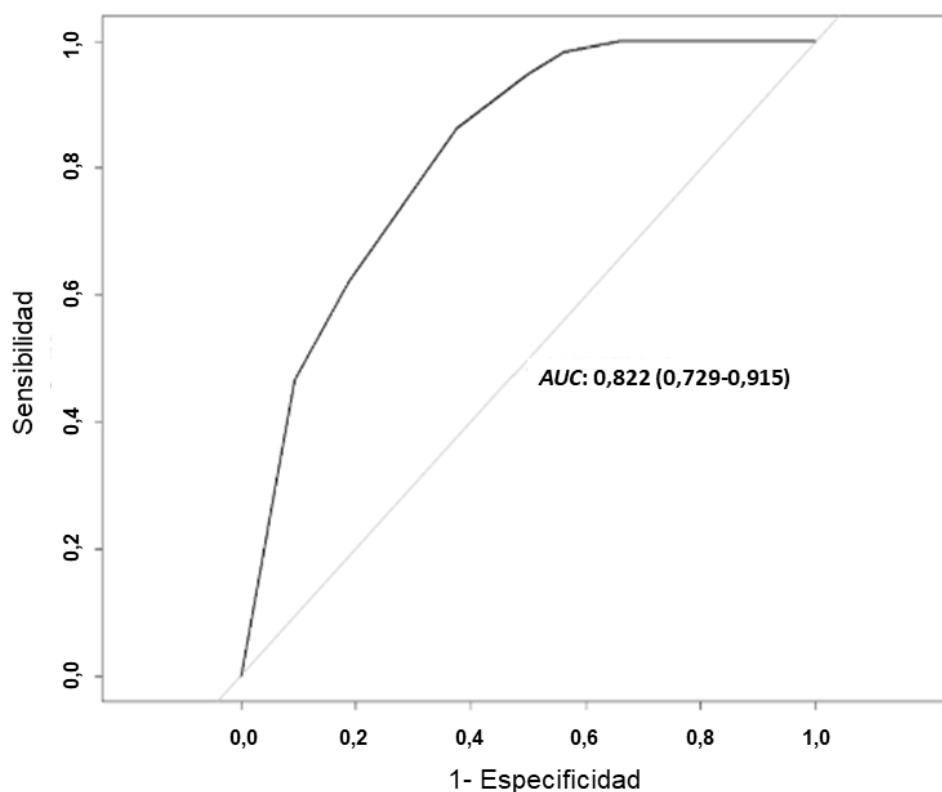


Figura 59. Curva ROC del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras obtenida en función de los parámetros Raman como variables codificadas, tomando como variable respuesta el grado K-L.

Tabla 39. Estimación e intervalos de confianza del AUC, sensibilidad, especificidad, VPN, VPP del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, obtenidos a partir de los parámetros Raman como variables codificadas, tomando como variable respuesta el grado K-L.

	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
Estimación	0,822	0,862	0,625	0,719	0,807
IC 95%	0,729 - 0,915	0,759 - 0,948	0,469 - 0,781	0,571 - 0,864	0,734 - 0,881

En función de los puntos de corte definidos en la tabla 38, se establecieron puntuaciones indicativas del grado de severidad de OA, de acuerdo con el nomograma representado en la figura 60, y que se puede interpretar de la siguiente forma: para una determinada muestra de cartílago cuyo parámetro Raman de SGAGs tome un valor por debajo del punto de corte (0,0875), este sumará 100 puntos al total. De la misma forma, cuando los valores de los parámetros CoID/F y GMF se encuentran por encima de su punto de corte (1,7280 y 0,4289, respectivamente) otorgarán al total 38 y 52 puntos, respectivamente. Por lo tanto, una muestra que reúna las 3 condiciones anteriormente citadas tendrá una puntuación total de 190 puntos, lo que se corresponde según el modelo, con una probabilidad superior al 90% de que el paciente del cual procede dicha muestra, presente un riesgo de severidad de OA elevado con respecto al grado K-L. No se encontraron diferencias significativas ($p=0,5479$) en cuanto a la capacidad predictiva de los modelos de variables codificadas y de variables continuas.

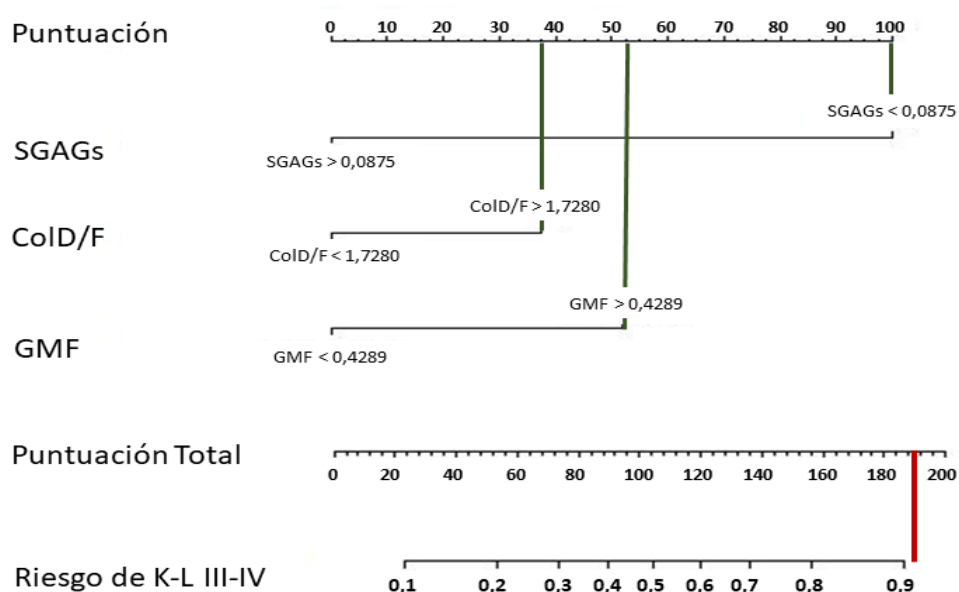


Figura 60. Nomograma resultado del modelo predictivo de severidad de OA a partir de parámetros Raman como variables codificadas, tomando como variable respuesta el grado K-L. La figura detalla la puntuación de cada condición (SGAGs<0,0875; CoID/F>1,7280 y GMF>0,4289) según el punto de corte de cada parámetro.

La tabla siguiente (Tabla 40) resume la información obtenida en el nomograma estableciendo permutaciones, en las que la condición “0” se corresponde con el conjunto de condiciones en las que los parámetros no suman puntos al total (SGAGs>0,0875; CoID/F<1,7280 y GMF<0,4289) y la condición “1” con el conjunto de condiciones en las que los parámetros suman puntos al total (SGAGs<0,0875; CoID/F>1,7280 y GMF>0,4289). Para cada permutación de resultados tendríamos asociada una probabilidad de OA severa (K-L III-IV).

Tabla 40. Puntuación total y probabilidad de OA severa (K-L III-IV) obtenida según el modelo predictivo para las diferentes permutaciones de las condiciones de cada parámetro.

Permutaciones			Puntuación				Probabilidad (%)
SGAGs	CoID/F	GMF	SGAGs	CoID/F	GMF	Total	K-L III-IV
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	52	52	20
0	1	0	0	38	0	38	15
0	1	1	0	38	52	90	40
1	0	0	100	0	0	100	45
1	1	0	100	38	0	138	70
1	0	1	100	0	52	152	75
1	1	1	100	38	52	190	>90

5.4.2.2. Tomando la escala *MS* como variable respuesta: global de muestras

5.4.2.2.1. Variables continuas

Mediante el análisis por modelos multivariados de regresión logística de las variables continuas, se obtuvieron los resultados detallados en la tabla 41, tomando como variable respuesta un *MS* elevado (*MS* 9-13) frente a la degradación de cartílago leve a moderada (*MS* 0-8). Se puede observar en los parámetros SGAGs y CoID/F un comportamiento similar al modelo tomando como variable respuesta el grado K-L, suponiendo unos valores de SGAGs altos, una probabilidad muy baja de degradación severa ($OR<0,0001$ y $p=0,0135$), y unos valores altos de CoID/F, una probabilidad mayor de degradación de cartílago severa ($OR=4,5850$ y $p=0,0010$). En este modelo, el

parámetro GMF no resultó significativo ($p=0,7413$), así como tampoco lo fueron la edad ($p=0,9493$) ni el sexo ($p=0,6820$).

Tabla 41. Resultados del modelo predictivo mediante modelos multivariados de regresión logística: odds ratio (OR), valores p e intervalos de confianza (IC) para el global de muestras, tomando como variable respuesta la escala MS.

Variable	OR	p	Menor IC 95%	Mayor IC 95%
Edad	1,0019	0,9493	0,9429	1,0638
Sexo	0,8006	0,6820	0,2709	2,3141
SGAGs	<0,0001	0,0135	<0,0001	0,0020
CoID/F	4,5850	0,0010	1,995	12,4401
GMF	1,3450	0,7413	0,2335	8,4864

La curva ROC para el modelo de variables continuas se muestra en la figura 61. El valor de área bajo la curva (AUC) es alto, superior a 0,8 ($AUC=0,814$; IC95% 0,728-0,900) por lo que el modelo se considera “muy bueno”. El modelo tiene unos valores de sensibilidad de 0,674 y de especificidad de 0,809. Tanto el VPN como el VPP es superior al 70%, con valores de VPN=0,732 y VPP=0,765 (Tabla 42). La figura 62 muestra el nomograma correspondiente a este modelo.

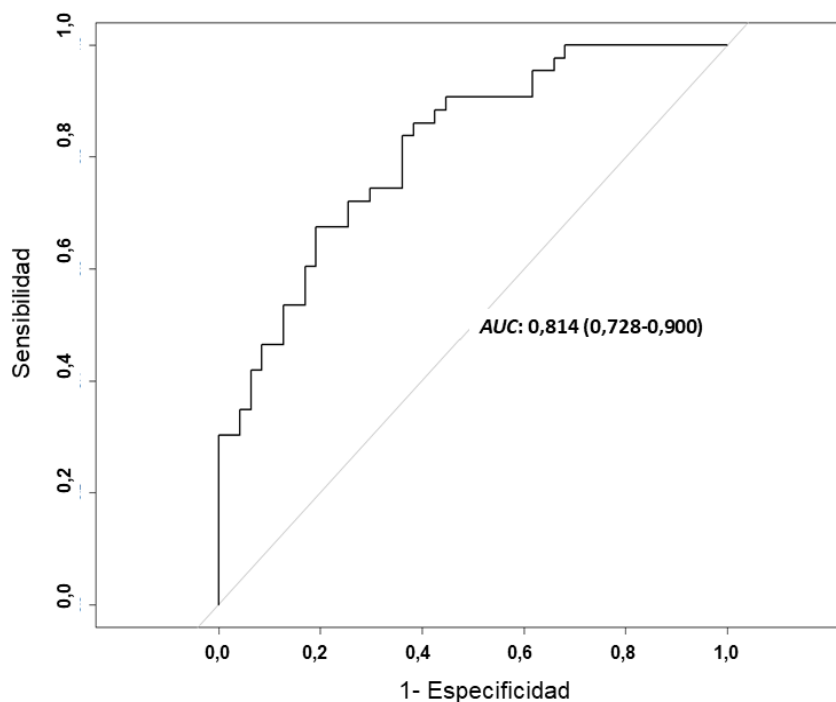


Figura 61. Curva ROC del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, en función de los parámetros Raman como variables continuas, tomando como variable respuesta la escala MS.

Tabla 42. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, obtenidos a partir de los parámetros Raman continuos, tomando como variable respuesta la escala *MS*.

	<i>AUC</i>	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
Estimación	0,814	0,674	0,809	0,732	0,765
IC 95%	0,728-0,900	0,535-0,814	0,681-0,915	0,646 – 0,826	0,650 – 0,882

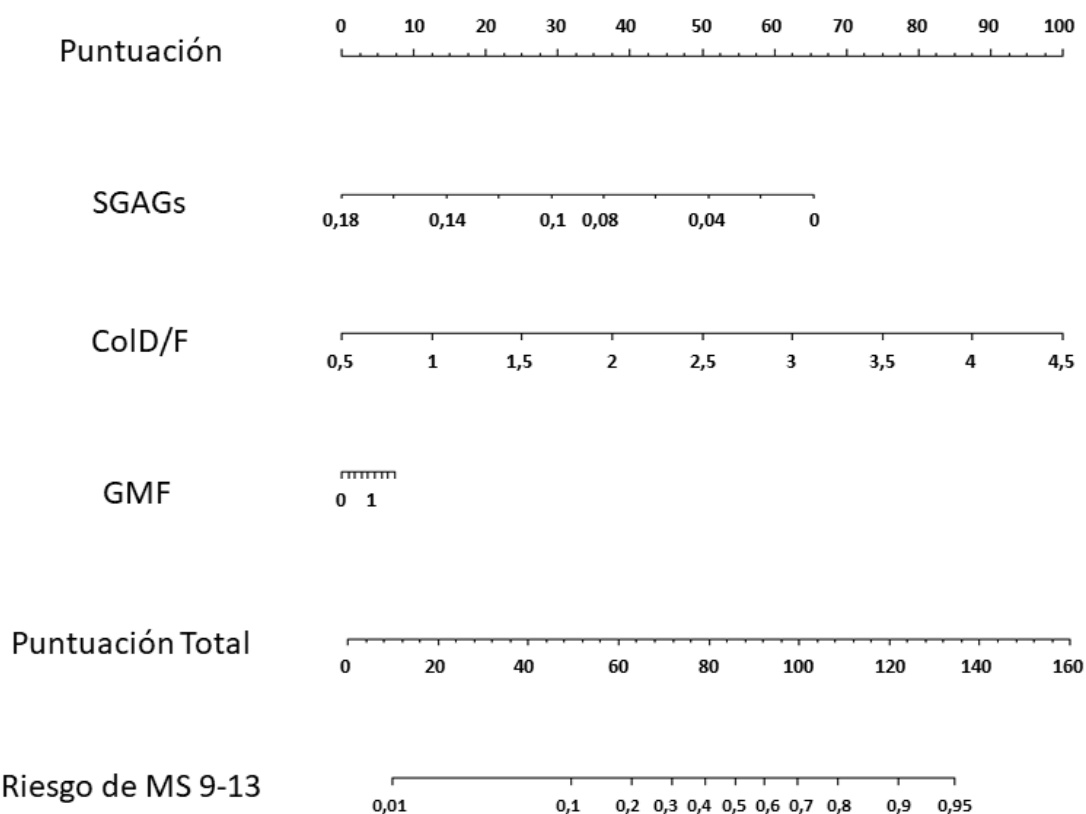


Figura 62. Nomograma resultado del modelo predictivo de severidad de OA tomando como variable respuesta la escala *MS*. De la barra correspondiente se extrae, para cada parámetro Raman, una puntuación equivalente en la escala superior (“Puntuación”). La suma de las 3 puntuaciones equivale a una mayor o menor probabilidad de las muestras analizadas a pertenecer a una clasificación de *MS* 9-13 en la escala inferior (“Puntuación total” vs “Riesgo de *MS* 9-13”).

5.4.2.2.2. Variables codificadas

Mediante las curvas *ROC* de los parámetros por separado, se establecieron nuevos puntos de corte con el objetivo de realizar un modelo a partir de las variables codificadas, tomando el *MS* elevado (*MS* 9-13) como variable respuesta (Tabla 43). Replicando el análisis realizado con el grado K-L como variable respuesta, se tomó como condición “0” valores de los parámetros $SGAGs > 0,0684$; $ColD/F < 1,8345$ y $GMF < 0,4987$, y como condición “1”, valores de $SGAGs < 0,0684$; $ColD/F > 1,8345$ y $GMF > 0,4987$. Los *OR*

calculados para este modelo de variables codificadas muestran que un valor de SGAGs por debajo del punto de corte (SGAGs<0,0684) incrementa significativamente la probabilidad de que la muestra de cartílago pertenezca a un paciente de severidad de OA elevada según la escala MS (OR=3,5975 y $p=0,0280$). Valores de CoID/F mayores al punto de corte (CoID/F>1,8345) incrementan a su vez la probabilidad de OA severo (OR=3,8907), de forma significativa ($p=0,0018$) En este caso, el GMF modifica la probabilidad de manera inversa a las tendencias obtenidas con anterioridad y de forma próxima a la significancia (OR=0,3658 y $p=0,0597$) obteniendo que valores por encima de su punto de corte disminuyen la probabilidad de severidad de MS.

Tabla 43. Resultados del modelo predictivo a partir de los puntos de corte obtenidos mediante modelos multivariados de regresión logística: puntos de corte, odds ratio (OR), valores p e intervalos de confianza, para el global de muestras tomando como variable respuesta la escala MS.

Variable	Punto de corte	OR	p	Menor IC 95%	Mayor IC 95%
SGAGs	0,0684	3,5975	0,0280	1,1767	11,9239
CoID/F	1,8345	3,8907	0,0018	2,0083	19,0226
GMF	0,4987	0,3658	0,0597	0,1199	1,0140

A partir de este segundo modelo construido a partir de las variables codificadas, se obtuvo la curva ROC mostrada en la figura 63, cuyos parámetros se detallan en la tabla 44.

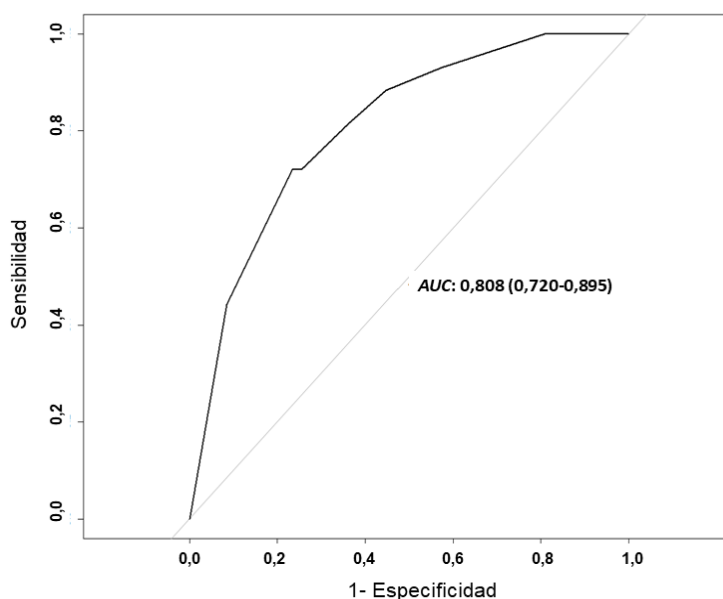


Figura 63. Curva ROC del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras obtenida en función de los parámetros Raman codificados, tomando como variable respuesta el grado MS.

El valor del *AUC* es superior a 0,8 ($AUC=0,808$; $IC95\%=0,720-0,895$), por lo que se trata de un modelo “muy bueno”. El modelo presenta valores de sensibilidad y especificidad de 0,766 y 0,721, respectivamente, con un VPN del 75% y VPP del 74%. Entre el modelo constituido a partir de las variables codificadas y el de variables continuas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,8380$).

Tabla 44. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad, especificidad, VPN y VPP del modelo predictivo de severidad OA para el global de muestras, obtenidos a partir de los parámetros Raman codificados, tomando como variable respuesta la escala *MS*.

	<i>AUC</i>	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
Estimación	0,808	0,721	0,766	0,750	0,740
IC 95%	0,720-0,895	0,581-0,837	0,638-0,872	0,659 – 0,848	0,634 – 0,846

El nomograma obtenido a partir de este segundo modelo a partir de las variables codificadas se muestra en la figura 64. El cartílago articular de un paciente cuyo parámetro de SGAGs tome un valor por debajo del punto de corte ($SGAGs < 0,0684$) sumará 73 puntos al total. Lo mismo ocurre según el modelo con valores de GMF por debajo de su punto de corte ($GMF < 0,4967$), sumando 55 puntos al total. Si el valor del parámetro CoID/F se encuentra por encima de su punto de corte ($CoID/F > 1,8345$) otorgan al total 100 puntos. En su conjunto, un paciente cuyo tejido cartilaginoso reúna las 3 condiciones anteriormente citadas tendrá una puntuación total de 228 puntos, lo que se corresponde según el modelo con una probabilidad de tener esa muestra un *MS* 9-13 superior al 80%.

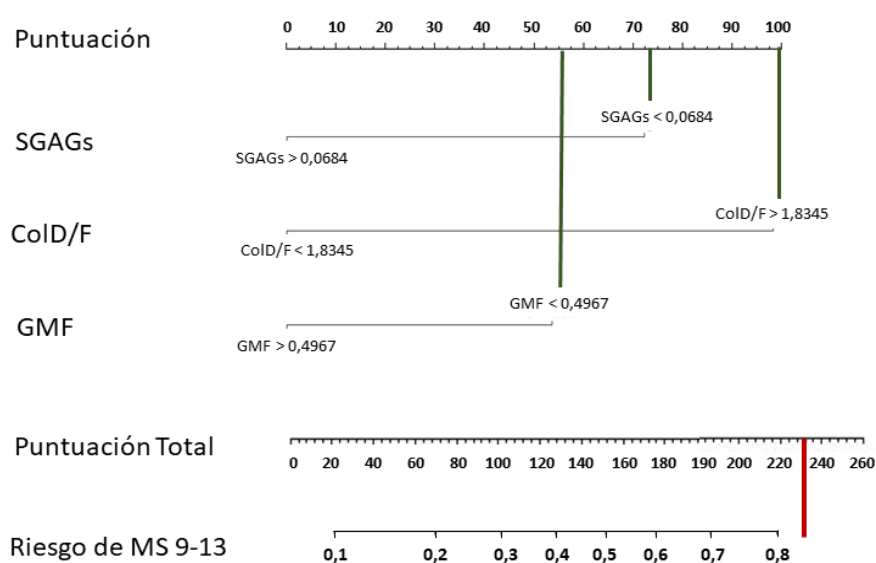


Figura 64. Nomograma resultado del modelo predictivo de severidad de OA a partir de variables codificadas, tomando como variable respuesta el *MS*. La figura detalla los valores en puntos de cada condición según el punto de corte de cada parámetro.

La simplificación del modelo en función de los puntos de corte conduce a las diferentes permutaciones entre las diferentes condiciones establecidas (0 y 1). Los resultados para cada posible caso y su correspondiente probabilidad de una degradación de cartílago *MS 9-13* se muestran en la tabla 45. Tal como se estableció en el análisis tomando el grado K-L como variable respuesta, la condición “0” se corresponde con las condiciones que no suman puntos al total (SGAGs>0,0684; CoID/F<1,8345 y GMF>0,4967) y la condición “1” con las condiciones que suman puntos al total (SGAGs<0,0684; CoID/F>1,8345 y GMF<0,4967).

Tabla 45. Puntuación total y probabilidad de degradación de cartílago severa (*MS 9-13*) obtenida según el modelo predictivo para las diferentes permutaciones de las condiciones de cada parámetro.

Permutaciones			Puntuación				Probabilidad (%)
SGAGs	CoID/F	GMF	SGAGs	CoID/F	GMF	Total	<i>MS 9-13</i>
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	55	55	20
1	0	0	73	0	0	73	25
0	1	0	0	100	0	100	30
1	0	1	73	0	55	128	45
0	1	1	0	100	55	155	55
1	1	0	73	100	0	173	60
1	1	1	73	100	55	228	>80

5.3.3. Modelos de regresión logística: muestras de cartílago de cabeza femoral

5.3.3.1. Grado K-L como variable respuesta

Los resultados del modelo predictivo para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral, tomando el grado K-L como variable respuesta, fueron similares a los obtenidos con el conjunto global de muestras (Tabla 46). De nuevo valores altos de SGAGs hacen disminuir la probabilidad de OA avanzada ($OR<0,0001$ y $p=0,0227$), mientras que valores mayores de CoID/F ($OR=3,9682$ y $p=0,0393$) y GMF ($OR=15,2260$ y $p=0,0836$) la hacen aumentar, aunque este último no fue significativo.

Tabla 46. Resultados del modelo predictivo mediante modelos multivariados de regresión logística para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral: odds ratio (OR), valores p e intervalos de confianza (IC), tomando como variable respuesta el grado K-L.

Variable	OR	p	Menor IC95%	Mayor IC95%
SGAGs	<0,0001	0,0227	<0,0001	<0,0001
CoID/F	3,9682	0,0393	1,2717	16,2520
GMF	15,2260	0,0838	1,1312	751,1806

Los valores de los parámetros obtenidos en función de su correspondiente curva ROC se muestran en la tabla 47, mostrando un *AUC* “muy bueno” (*AUC*=0,889; IC95% 0,794-0,985), un valor de sensibilidad de 0,917 y de especificidad de 0,797. El VPN es del 90% y el VPP del 79%. La curva ROC de este modelo está representada en la figura 65A.

Tabla 47. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad y especificidad del modelo predictivo de severidad OA a partir de variables continuas para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral, obtenidos a partir de los parámetros Raman como variables continuas tomando como variable respuesta el grado K-L.

	<i>AUC</i>	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
Estimación	0,889	0,917	0,797	0,900	0,792
IC 95%	0,794-0,985	0,792-1,000	0,565-0,913	0,762 – 1,000	0,677 – 0,920

Para el análisis en función de las variables codificadas, se tomaron los mismos puntos de corte que en el caso del análisis de la muestra global. Los resultados se muestran en la tabla 48. Los *OR* calculados para este modelo, muestran que valores de SGAGs por debajo del punto de corte (SGAGs<0,0875) incrementan la probabilidad de que la muestra de cartílago pertenezca a un paciente de severidad de OA elevada, aunque no de forma significativa ($p=0,0841$). Valores por encima del punto de corte en los parámetros CoID/F (CoID/F<1,7280) y GMF (GMF<0,4289) incrementan la probabilidad de OA severa, aunque tampoco fueron significativos ($p=0,0651$ y $p=0,5385$, respectivamente).

Tabla 48. Resultados obtenidos al aplicar el modelo de variables codificadas obtenido mediante el global de muestras al subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral: *odds ratio* (OR), valores p e intervalos de confianza, muestras tomando como variable respuesta el grado K-L.

Variable	Puntos de corte	OR	p	Menor IC95%	Mayor IC95%
SGAGs	0,0875	8,5611	0,0841	0,9084	191,7302
CoID/F	1,7280	5,4649	0,0651	0,9418	38,3601
GMF	0,4289	1,6404	0,5385	0,3251	8,2615

Los parámetros de la correspondiente curva ROC se muestran en la tabla 49. El modelo predictivo en base a los parámetros Raman continuos se trata de un modelo “muy bueno” ($AUC=0,829$; IC95% 0,711-0,947), con una sensibilidad de 0,833, especificidad de 0,696 y un VPN del 80% y VPP del 74%. Las diferentes curvas ROC para los modelos de variables continuas y codificadas se muestran en la figura 65.

Tabla 49. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad y especificidad del modelo predictivo de severidad OA a partir de variables codificadas para el subconjunto de muestras de cartílago de cadera femoral, tomando como variable respuesta el grado K-L.

	<i>AUC</i>	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
Estimación	0,829	0,833	0,696	0,800	0,741
IC 95%	0,711-0,947	0,667-0,958	0,522-0,869	0,666 – 0,947	0,633 – 0,880

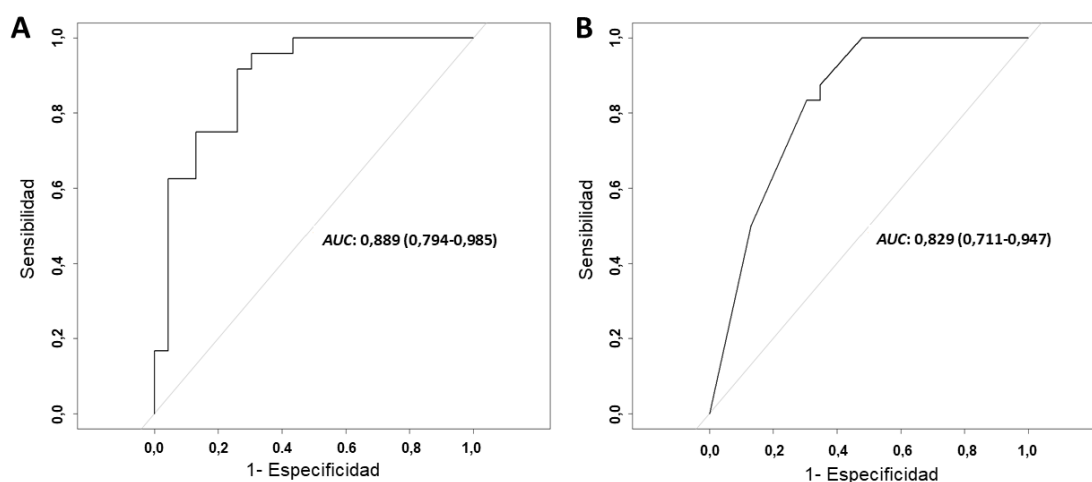


Figura 65. Curvas ROC de los modelos para muestras de cartílago de cabeza femoral tomando como variable respuesta el grado K-L. A: modelo de variables continuas. B: modelo de variables codificadas.

Entre los modelos anteriormente descritos (parámetros Raman continuos vs parámetros Raman codificados) no existen diferencias significativas en cuanto a capacidad predictiva ($p=0,1017$) en la muestra de cabeza femoral, así como tampoco se observaron diferencias en la muestra global ($p=0,5479$). Comparando estos modelos con los obtenidos para la muestra global, tampoco se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los modelos de variables continuas ($p=0,4486$), ni codificadas ($p=0,9286$) tomando la variable K-L como respuesta (Tabla 50).

Tabla 50. Comparación estadística de los valores AUC de las curvas ROC de los modelos obtenidos a partir de la muestra global y del subconjunto de cabeza femoral, tomando la variable K-L como variable respuesta.

	Global (parámetros Raman continuos)	Global (parámetros Raman codificados)
Cabeza femoral (parámetros Raman continuos)	AUC (0,839 vs 0,889) $p=0,4486$	-
Cabeza femoral (parámetros Raman codificados)	-	AUC (0,822 vs 0,829) $p=0,9286$

5.3.3.2. MS como variable respuesta

Los resultados del modelo predictivo para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral tomando la escala MS como variable respuesta fueron similares a los obtenidos con el conjunto global de muestras (Tabla 51).

Tabla 51. Resultados del modelo predictivo mediante modelos multivariados de regresión logística para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral: odds ratio (OR), valores p e intervalos de confianza (IC), para el global de muestras tomando como variable respuesta la escala MS.

Variable	OR	p	Menor IC95%	Mayor IC95%
SGAGs	<0,0001	0,0245	<0,0001	<0,0001
CoID/F	6,8430	0,0101	1,8907	38,5142
GMF	6,9064	0,1468	0,5993	140,2968

Se reprodujo la tendencia de que valores altos de SGAGs equivalen a probabilidades muy bajas de lesión severa (MS 9-13) de forma significativa ($OR<0,0001$ y $p=0,0245$), mientras que valores altos de CoID/F ($OR=6,8430$ y $p=0,0101$), y GMF ($OR=6,9064$)

equivalen a probabilidades mayores, aunque el GMF no de forma significativa ($p=0,1468$). Los valores de los parámetros obtenidos en función de su correspondiente curva *ROC* se muestran en la tabla 52, indicando que se trata de un modelo “muy bueno” ($AUC=0,883$; $IC95\%$ 0,789-0,978), con una sensibilidad de 0,947 y especificidad de 0,750. El VPN es del 96% y VPP del 72%.

Tabla 52. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad y especificidad del modelo predictivo de severidad OA, obtenidos a partir de variables continuas para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral, tomando como variable respuesta el grado *MS*.

	<i>AUC</i>	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
Estimación	0,883	0,947	0,750	0,957	0,720
IC 95%	0,789-0,978	0,842-1,000	0,571-0,893	0,864 – 1,000	0,600 – 0,864

Tomando los puntos de corte obtenidos del análisis global, se construyó un modelo de variables codificadas como en los casos anteriores, esta vez tomando la escala *MS* como referencia sobre el subconjunto de muestras de cabeza femoral. Los resultados se muestran en la tabla 53. En este modelo, valores por encima del punto de corte en el parámetro CoID/F incrementan la probabilidad de pertenecer la muestra a un *MS* 9-13 de forma significativa ($OR=29,7528$ y $p=0,0064$). Valores por debajo del punto de corte de SGAGs y GMF incrementan la probabilidad de severidad de OA, aunque no de forma significativa ($p=0,0650$ y $p=0,1937$, respectivamente). Los parámetros de la correspondiente curva *ROC* se muestran en la tabla 54, indicando que se trata de un modelo “excelente” ($AUC=0,900$; $IC95\%$ 0,816-0,985), con una sensibilidad y especificidad de 0,895 y 0,786, respectivamente. El VPN es del 95%, mientras que VPP es más bajo, del 56%. Las diferentes curvas *ROC* para los modelos de variables continuas y codificadas se muestran en la figura 66.

Tabla 53. Resultados obtenidos al aplicar el modelo de variables codificadas obtenido mediante el global de muestras al subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral: *odds ratio* (*OR*), valores *p* e intervalos de confianza (*IC*), muestras tomando como variable respuesta la escala *MS*.

Variable	Punto de corte	<i>OR</i>	<i>p</i>	Menor $IC95\%$	Mayor $IC95\%$
SGAGs	0,0684	9,3697	0,0650	1,1050	203,6759
CoID/F	1,8345	29,7528	0,0064	3,5813	685,4632
GMF	0,4987	0,3070	0,1937	0,0454	1,7449

Tabla 54. Estimación e intervalos de confianza del *AUC*, sensibilidad y especificidad del modelo predictivo de severidad OA obtenido a partir de variables codificadas para el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral, tomando como variable respuesta el grado *MS*.

	<i>AUC</i>	Sensibilidad	Especificidad	VPN	VPP
Estimación	0,900	0,895	0,786	0,952	0,563
IC 95%	0,816-0,985	0,737-1,000	0,643-0,929	0,850 – 1,000	0,562 – 0,818

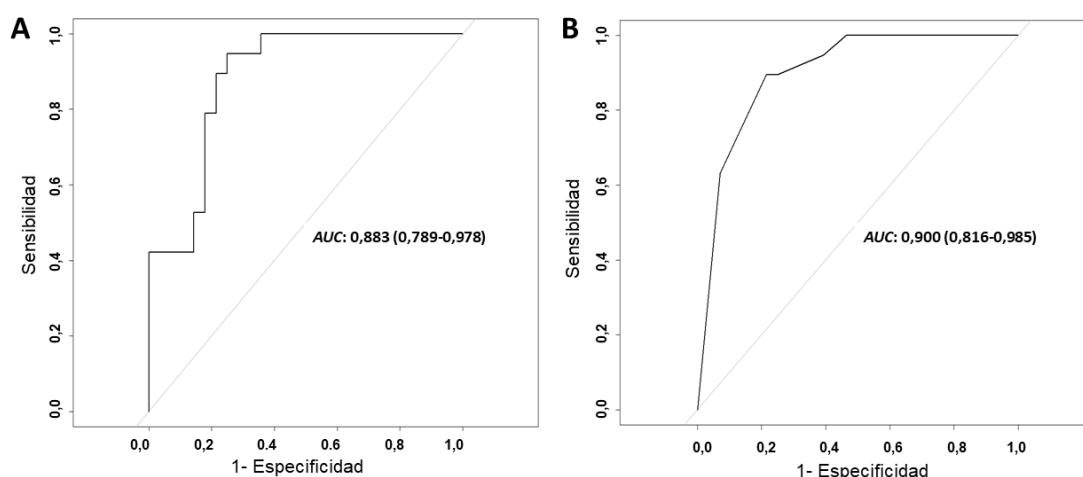


Figura 66. Curvas *ROC* de los modelos para muestras de cartílago de cabeza femoral tomando como variable respuesta el *MS*. A: modelo de variables continuas. B: modelo de variables codificadas.

Entre los modelos predictivos del subconjunto de cabeza femoral, tomando como variable respuesta el *MS* (parámetros Raman continuos vs parámetros Raman codificados) no existen diferencias significativas en cuanto a capacidad predictiva ($p=0,5140$), al igual que tampoco las presentaron los del global ($p=0,8380$). Comparando estos modelos con los obtenidos para la muestra global, tampoco se aprecian diferencias entre ambos modelos de variables continuas ($p=0,2872$) ni los obtenidos a partir de las variables codificadas ($p=0,1377$) (Tabla 55).

Tabla 55. Comparación estadística de los valores *AUC* de las curvas *ROC* de los modelos obtenidos a partir de la muestra global y del subconjunto de cabeza femoral, tomando la variable *MS* como variable respuesta.

	Global (parámetros Raman continuos)	Global (parámetros Raman codificados)
Cabeza femoral (parámetros Raman continuos)	<i>AUC</i> (0,813 vs 0,8834) $p = 0,2872$	-
Cabeza femoral (parámetros Raman codificados)	-	<i>AUC</i> (0,8077 vs 0,9003) $p = 0,1377$

Discusión

6. Discusión

6.1. Huella molecular del cartílago articular humano

Desde 2006, diferentes autores han descrito el uso de la espectroscopía Raman para la caracterización del cartílago (Casal-Beiroa *et al.*, 2020b). Sin embargo, y como se indicó en la introducción de esta tesis doctoral, solamente un número limitado realizado en muestras humanas refleja las condiciones patofisiológicas de la osteoartritis (Tabla 3). Por ello, es de suma importancia profundizar en su caracterización a través de la ER, utilizando como referencia escalas *gold-standard*, de forma que se pueda confirmar su potencial como herramienta diagnóstica y validar los biomarcadores ópticos que definen el marco de esta tesis doctoral.

A través de un modelo *ex vivo*, en este trabajo se describió la huella molecular del cartílago humano de cabeza femoral, sana de OA (ausencia de lesión macroscópica y K-L 0, Figura 22) así como se observaron cualitativamente tendencias similares en los espectros Raman de diferentes articulaciones y regiones anatómicas (cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial) con el aumento de la severidad de la enfermedad establecida tanto en función del grado K-L (Figuras 23, 27 y 29) como del MS (Figuras 33-35).

Las señales Raman identificadas se corresponden con estudios previos de caracterización de cartílago articular, tanto humano como de modelos animales (Tablas 8 y 9) y representan a los principales componentes de la matriz extracelular cartilaginosa (GAGs y colágenos), a componentes minoritarios (lípidos y otras proteínas) y a la presencia de componentes relacionados con procesos de mineralización del tejido.

Más específicamente, en los espectros obtenidos se pudo observar el descenso, y en algunos casos solapamiento en estados de degradación avanzados, de la señal a 1063 cm^{-1} , relacionada con los GAGs sulfatados. El descenso de esta banda implica el descenso de los GAGs en tejido OA debido a la degradación del tejido, dato que concuerda con lo descrito anteriormente en la literatura en cartílago OA (Pearle *et al.*, 2005; Temple-Wong *et al.*, 2009). Esto implica la disminución de los PGs y agregados proteicos como el AG por la desestabilización de los enlaces que los forman y su degradación (Mort *et al.*, 2016). El descenso de esta señal puede también ser debida a la pérdida de sulfatación y estabilidad del AG provocada por la edad (Bayliss, 1978; Wells *et al.*, 2003), uno de los factores de riesgo relacionado con el desarrollo de la OA (Musumeci *et al.*, 2015).

El grupo sulfato (OSO_3^-), es uno de grupos responsables a nivel molecular de las propiedades viscoelásticas del cartílago, al proveer al tejido de cargas negativas (Mansour, 2003; Bhosale *et al.*, 2008) y su pérdida está, por tanto, relacionada con la pérdida de funcionalidad del tejido. Al ser esta banda (1063 cm^{-1}) específica de este grupo funcional, presenta potencial como biomarcador de la OA, por lo que fue utilizada ya anteriormente por otros autores (Kumar *et al.*, 2015). Además, el descenso observado en la banda a $1375\text{-}80\text{ cm}^{-1}$, relacionada con estas estructuras proteicas, concuerda con la observación anterior, indicando un descenso de PGs en el tejido. Otra señal inespecífica del espectro relacionada con los GAGs es la banda a 940 cm^{-1} , cuya asignación se corresponde tanto con el enlace O-glucosídico de los GAGs como el enlace C-C proteico. Esta señal fue descartada como potencial biomarcador por su inespecificidad, y por no haber encontrado diferencias significativas en la misma en estudios previos (Casal-Beiroa, 2017).

En lo referente al doblete de la amida III, relacionada con la desorganización relativa de las cadenas de colágeno, se observó una pérdida de su definición en muestras de OA avanzada (K-L III-IV y MS moderado a severo) (Figuras 23, 27, 29 y 33-35, respectivamente), que podría ser debido a cambios en la organización relativa de este componente (Figura 28). Estudios previos demostraron que el colágeno presenta cierto grado de degradación y desorganización en etapas tempranas de la OA (McDevitt, 1973; Saarakkala *et al.*, 2010), por lo que el ratio entre estas señales ($1245/1270\text{ cm}^{-1}$), definido como la relación entre el colágeno defectivo y funcional, se presenta como un posible marcador de OA temprana. Otras señales relacionadas con el colágeno son las del doblete a $850\text{-}880\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a los aminoácidos prolina (*Pro*) e hidroxiprolina (*Hyp*). Se han encontrado con respecto a estas señales algunas inconsistencias en cuando a su asignación y su especificidad en la literatura, motivo por el cual se descartaron como posibles biomarcadores ópticos. Tampoco se encontraron diferencias significativas en estas señales en estudios previos (Lim *et al.*, 2011).

Adicionalmente, en muestras de OA avanzada, se observó un aumento en intensidad o la aparición de nuevas señales. Este es el caso de la banda a 960 cm^{-1} (Figura 24), que se corresponde con el fosfato de la apatita mineral (Kunstar *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2015). Aparecen también señales en el intervalo $1070\text{-}90\text{ cm}^{-1}$, relacionadas con la presencia de grupos carbonato y apatita carbonatada (Figura 25) (Esmonde-White *et al.*, 2011; Gamsjaeger *et al.*, 2014) y una señal a 1050 cm^{-1} (Figura 26), asociada a grupos pirofosfato. Estas últimas 3 señales son indicativas de la mineralización/calcificación del tejido y de la generación de depósitos cálcicos que se produce durante la OA (Fuerst *et al.*, 2009). Otros autores las asocian a una mayor

contribución de hueso subcondral en los espectros, al producirse el estrechamiento del cartílago (Esmonde-White *et al.*, 2011).

La asociación de la presencia de estas señales con la mineralización del tejido fue confirmada histológicamente (Figuras 31 y 32) en muestras seleccionadas. De forma posterior, se identificó en estas muestras un caso de condrocalcinosis, un proceso patológico de calcificación de cartílago (Hawellek *et al.*, 2016) asociado a la presencia de *CPPD*, indicando el potencial de esta señal para su diagnóstico.

Además, en muestras de OA avanzada (K-L IV) o degradación muy severa (*MS* 12 o mayor) se observó la aparición de una banda a un desplazamiento de 1550 cm^{-1} (Figura 30), que podría indicar la presencia de amidas secundarias. El aumento de amidas II fue previamente descrito por West *et al.* mediante espectroscopía IR (West *et al.*, 2004), confirmando la asignación de esta banda y la presencia de estas estructuras químicas en el tejido OA. Este hecho podría estar relacionado con procesos de degradación o fragmentación de proteínas por acción de las MMPs (Billinghurst *et al.*, 1997; Maldonado y Nam, 2013).

En resumen, las muestras de cartílago degradado de las diferentes regiones anatómicas analizadas presentaron señales adicionales en su espectro, además de las que presentó el espectro de cartílago sano (Tabla 9). El análisis de estas bandas, y de aquellas relacionadas con eventos que transcurren durante la OA (descenso de GAGs, desorganización de las fibras de colágeno) se presentaron como potenciales biomarcadores ópticos de la enfermedad, constituyendo la base para el perfil biomarcador molecular estudiado en el apartado 5.2. de esta tesis doctoral.

6.2. Validación perfil biomarcador frente a escala radiológica (K-L) e histológica (MS)

Con el análisis cuantitativo de los parámetros, se pretendió validar el panel biomarcador óptico de la OA propuesto, frente a la escala *gold-standard* radiológica K-L y a la escala histomorfológica *MS*.

A continuación, se discuten los resultados obtenidos para el subconjunto de muestras de cabeza femoral, seguida de una comparación entre las diferentes regiones anatómicas estudiadas.

Parámetros relacionados con los GAGs (SGAGs, PGs, TGAGs)

Los valores del parámetro SGAGs disminuyeron con el aumento del grado K-L o *MS*, obteniendo diferencias significativas entre las muestras de cartílago sano o de OA leve

con muestras de OA avanzada. Se obtuvieron correlaciones negativas fuertes tanto con el grado K-L ($\rho=-0,632$) como con el *MS* total ($\rho=-0,642$), *MS-SI* ($\rho=-0,601$) y *MS-SIII* ($\rho=-0,540$) y una correlación débil con el *MS-SII* ($\rho=-0,312$), todas significativas. El ratio correspondiente a SGAGs ($1063/1004\text{ cm}^{-1}$) fue previamente estudiado por Kumar *et al.* (Kumar *et al.*, 2015), habiendo descrito una disminución significativa con el aumento de la severidad de OA según la clasificación de la *International Cartilage Repair Society (ICRS)*.

De forma análoga al ratio SGAGs, el parámetro PGs siguió una tendencia descendente, obteniendo correlaciones negativas fuertes con el grado K-L ($\rho=-0,532$) y débiles con el *MS* total ($\rho=-0,484$), *MS-SI* ($\rho=-0,482$), *MS-SII* ($\rho=-0,363$) y *MS-SIII* ($\rho=-0,291$), todas significativas. El comportamiento similar de estos dos parámetros confirma la validez de la señal 1375 cm^{-1} como señal alternativa propuesta por Gamsjaeger *et al.*, (Gamsjaeger *et al.*, 2014) para la cuantificación de PGs sin interferencias de bandas de mineralización, en muestras de cartílago de cabeza femoral humana y tendones de pavo.

En el caso del parámetro TGAGs, se observa una tendencia similar, pero presentando una mayor variabilidad, y las correlaciones significativas obtenidas para este parámetro fueron débiles ($\rho<0,5$) en relación con el grado K-L, *MS* total, y *MS-SI*. La variabilidad encontrada para este parámetro podría estar relacionada con la cuantificación del área de esta señal (1042 cm^{-1}), pues está ubicada cerca de una región de bandas inespecíficas de moléculas orgánicas a $1027-35\text{ cm}^{-1}$, relacionada con enlaces C-O y C-C, que aparecen usualmente en espectros de tejido biológico (Dehring *et al.*, 2006; Mandair *et al.*, 2006; Movasaghi *et al.*, 2007; Socrates, 2005). Adicionalmente, la presencia en tejido mineralizado de la señal a 1050 cm^{-1} , puede llegar también a enmascarar la señal, como se observó en diferentes muestras.

Los resultados para estos parámetros se pueden relacionar con dos eventos que ocurren en el cartílago durante la progresión de la OA. En primer lugar, en fases tempranas, se produce la síntesis de AG como respuesta de los condrocitos a las lesiones iniciales con el objetivo de iniciar la reparación del tejido, seguido de un descenso abrupto de este componente en fases de OA más avanzadas (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Este mecanismo podría influir en la falta de diferencias significativas entre el tejido sano (K-L 0 y *MS* 0-2) y el de OA leve (K-L I y *MS* 3-5). Se encontraron, para estos parámetros, diferencias significativas entre muestras de cartílago sano/OA leve (K-L 0-I, *MS* 0-5, *MS-SI* 0-1, *MS-SII* 0, *MS-SIII* 1) con las muestras de mayor severidad de OA (K-L>II, *MS*>6, *MS-SI*>4, *MS-SII*>1 *MS-SIII*>2).

Parámetros relacionados con Col (ColD/F)

Los espectros de muestras con valores de grado K-L altos (III y IV) o degradación del tejido severa/muy severa (*MS* 9-13), mostraron valores más altos para la desorganización relativa de la estructura del colágeno, obteniendo correlaciones positivas fuertes con el grado K-L ($\rho=0,529$), con el *MS* total ($\rho=0,593$) y con el *MS-SI* ($\rho=0,612$), y correlaciones débiles con el *MS-SII* ($\rho=0,386$) y *MS-SIII* ($\rho=0,352$), todas ellas significativas. La tendencia ascendente del ratio 1245/1270 cm^{-1} observada se corresponde con los resultados obtenidos por otros autores, frente a diferentes escalas de la severidad de OA, como la escala patológica de Collins (Takahashi *et al.*, 2014) o el grado *ICRS* (Kumar *et al.*, 2015). Estos cambios en la organización de la red de colágeno también fueron observados en otros estudios en tejido OA mediante RM (Pearle *et al.*, 2005).

Esta desorganización de la estructura del colágeno puede ser debida a dos tipos de eventos que ocurren en el cartílago articular durante la OA. Por un lado, se produce la desorganización y degradación de las fibras del colágeno mediada por colagenasas de la familia de las metaloproteasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13), lo que resulta en su desnaturalización y en la fibrilación del cartílago articular (Poole *et al.*, 2003; Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Por otro lado, la síntesis de otro tipo de colágenos por parte de los condrocitos OA podría contribuir a la distinta distribución de las bandas del doblete de la amida III, con el consecuente aumento del ColD/F, ya que los diferentes tipos de colágeno difieren tanto en su secuencia aminoacídica como en su organización estructural (Gelse, 2003; Rýglová *et al.*, 2017).

El Col-II, colágeno mayoritario en cartílago hialino sano, presenta grandes dominios de estructura ordenada de hélice α , de aproximadamente 1000 aminoácidos (Gelse, 2003). Sin embargo, en cartílago OA, se ven incrementados otros tipos de colágeno, como son el tipo VI en la región interterritorial, o el tipo X en casos de hipertrofia (Pullig *et al.*, 1999; Söder *et al.*, 2002; Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Estos dos tipos de colágeno (Col-VI y Col-X) presentan grandes dominios terminales no helicoidales, y dominios de hélice α considerablemente menores que los del Col-II, de 200 y 460 aminoácidos aproximadamente (Gelse, 2003), por lo que la desorganización relativa del colágeno en configuración hélice α podría ser debido a la síntesis de estos dos tipos de colágeno por parte de los condrocitos OA en lugar de Col-II funcional.

Parámetros relacionados con lípidos (IL)

La señal relacionada con los lípidos fue descrita para muestras de cartílago por primera vez en una cohorte reducida (n=14) (Casal Beiroa *et al.*, 2018), en la que se observó un aumento significativo de este ratio en las muestras de OA avanzada (K-L III y IV).

En este estudio, se han encontrado valores más elevados para muestras OA con respecto al tejido sano (significativos para K-L II y IV), obteniendo una única correlación positiva débil con el grado K-L ($\rho=0,427$) y ninguna correlación significativa ni con el MS ni ninguna de sus subcategorías. La tendencia encontrada podría estar relacionada con la acumulación de lípidos en la superficie del tejido OA y la baja abundancia de proteínas debido a la proteólisis de la matriz extracelular que media la destrucción articular, descritas en cartílago OA por otras técnicas como la espectroscopía de masas (Cillero-Pastor *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2017).

Por otro lado, el IL es un parámetro indirecto descrito previamente para el diagnóstico del cáncer colorrectal. En este tejido se encontró que variaciones en el índice de masa corporal (IMC) de los pacientes afectan en la cuantificación de la señal inespecífica de lípidos y proteínas (Ding *et al.*, 2017). Al ser la obesidad y el sobrepeso un factor de riesgo en el desarrollo de OA, sería importante tener en cuenta el IMC como factor de ajuste en las correlaciones estudiadas. Sin embargo, al no disponer de estos datos clínicos, no se pudo profundizar en su evaluación.

Parámetros relacionados con la mineralización (GMF, GMC, CPPD, C/H y H/Co)

Los cristales de calcio más comúnmente asociados a trastornos articulares son los depósitos de cristales de fosfato cálcico (*Basic Calcium phosphate, BCP*), que incluyen la hidroxiapatita, apatita carbonatada y fosfato de calcio carbonatado amorfo (*ACCP*), o depósitos de pirofosfato de calcio (*CPP*), cristales propios de cartílago mineralizado observados en OA avanzada (Fuerst *et al.*, 2009; Bazin *et al.*, 2012). Estos depósitos cristalinos se relacionan con los parámetros GMF, GMC y CPPD, respectivamente.

Los cristales de *BCP* y *CPP* frecuentemente coexisten en el cartílago (Durcan *et al.*, 2014), aunque otros autores raramente los encontraron en el mismo tipo de muestra (cóndilo/platillo) o zona (compartimiento lateral/medial) (Nguyen *et al.*, 2013). La presencia o aumento en su contenido permite además identificar cuadros clínicos de condrocalcinosis, aunque las técnicas actuales de radiografía o análisis macroscópico

presentan limitaciones a la hora de detectar estadios tempranos de calcificación (Nguyen *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2020).

En el caso de este estudio, a través de los parámetros de mineralización directos (GMF, GMC y CPPD) se han detectado de forma concomitante la presencia de ambos tipos de cristales, en el 68% de las muestras. Se observó, además, un aumento en sus valores para las muestras de OA más avanzada, aunque no se encontraron correlaciones significativas frente al K-L o *MS*, salvo una débil en el caso del GMC respecto al grado K-L ($\rho=0,293$).

Aunque no se ha tenido acceso al cuadro clínico con mayor detalle de los pacientes de todas las muestras de la cohorte, como se ha mencionado anteriormente, se ha confirmado un caso de condrocalcinosis, detectada tanto por radiología, como por histología (Figuras 31 y 32, muestra K-L IV) y ER. En este caso concreto, incluso se pudieron distinguir diferencias entre cóndilo y platillo, observando un incremento de los valores de GMF/GMC/PPD en el primero, apoyado histológicamente. Por otro lado, muestras que radiológicamente no presentaron señales de mineralización, sí presentaron valores aumentados de estos parámetros e indicios histológicos de este proceso (K-L I, Figuras 5, 31 y 32).

En un futuro, se plantea seguir con este caso de estudio con el objetivo de diferenciar la contribución de las diferentes señales y complementarlo con otras técnicas como la microscopía de luz polarizada, ya que las tinciones utilizadas no son específicas de *CPP* (Yan *et al.*, 2020). Finalmente, aunque la calcificación del cartílago se relaciona con patologías como la OA (Fuerst *et al.*, 2009) se trata de un proceso también asociado a la edad, por lo que estudios futuros deberían tener en cuenta esta variable (Mitsuyama *et al.*, 2007).

Para los parámetros de mineralización indirectos (C/H y H/Col) en tejido sano y OA, se obtuvieron valores significativamente inferiores en el parámetro C/H en muestras de K-L II-IV, *MS* total 6-13, y *MS-SI* 3-7. La única correlación significativa obtenida con este parámetro fue respecto al grado K-L ($\rho=-0,426$), aunque ésta es débil. Los valores obtenidos para el parámetro H/Col presentaron una tendencia ascendente en tejido OA, obteniendo correlaciones significativas positivas con el grado K-L ($\rho=0,446$), *MS* total ($\rho=0,547$), *MS-SI* ($\rho=0,546$), y una correlación más débil con *MS-SIII* ($\rho=0,354$).

Estos resultados se corresponden con un estudio previo realizado en cartílago intacto y erosionado, cuyos autores los atribuyeron a la contribución del hueso subcondral a la señal en el tejido erosionado (Esmonde-White *et al.*, 2011). Además, los cambios

observados en estos parámetros se podrían asociar a la concomitante mineralización del tejido provocada por la progresiva fibrilación, hipertrofia y esclerosis subcondral en el proceso artrósico (Bay-Jensen *et al.*, 2010; Hawellek *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2013), producida por la nucleación de cristales de calcio e hidroxapatita en el tejido en torno a las fibras de colágeno (Yan *et al.*, 2020). Esto a su vez apoyaría el aumento del parámetro H/Col con la reducción relativa de proteoglicanos evaluada histológicamente (Figura 21), siendo que la pérdida de proteoglicanos favorece la nucleación de depósitos cálcicos e hidroxapatita en el tejido (Yan *et al.*, 2020).

Diagnóstico diferencial en articulaciones afectadas por OA

La OA es una enfermedad que puede afectar diferentes articulaciones en el cuerpo, como cadera, rodillas y manos (Musumeci *et al.*, 2015, Casal-Beiroa *et al.*, 2020b). Por este motivo, otro de los objetivos de esta investigación fue estudiar si diferentes articulaciones, en este caso cadera (cabeza femoral) y rodilla (cóndilo femoral o platillo tibial) presentaban el mismo perfil molecular.

En este estudio, al evaluar los diferentes parámetros Raman con respecto al grado K-L o MS, no se detectaron diferencias significativas para el conjunto de muestras de las diferentes regiones anatómicas de la rodilla de forma aislada. Se compararon los valores medios para cada parámetro, con respecto a cada grado K-L o rango de MS, viendo tendencias similares entre muestras procedentes de rodilla (cóndilo femoral y platillo tibial) y cabeza femoral. No se detectaron diferencias significativas entre las diferentes regiones anatómicas, salvo en el parámetro SGAGs en muestras de cabeza femoral respecto a las de platillo tibial de grado K-L IV ($p=0,014$). Los resultados encontrados pudieron verse afectados debido a las limitaciones en el tamaño muestral de cartílago procedente de rodilla y a la ausencia de muestras de cartílago de rodilla sana de OA. Además, la única muestra de OA leve (K-L I) de rodilla, sigue un perfil de cartílago mineralizado (Figuras 31 y 32).

Hasta el momento, no se han descrito en la literatura estudios comparativos a través de la ER entre cartílago procedente de diferentes articulaciones. Por otro lado, y en términos de su composición bioquímica, tampoco se encontraron evidencias de que existan diferencias entre el cartílago de cadera y el de rodilla. A nivel del colágeno, Hosseininia *et al.* apuntan a que se producen rutas de degradación similares en ambas articulaciones durante la OA (Hosseininia *et al.*, 2013). En cuanto a la mineralización, otros autores apuntan a que no existen diferencias significativas entre la calcificación del cartílago de cadera y rodilla durante la enfermedad (Hawellek *et al.*, 2016), ni entre el cóndilo femoral y el platillo tibial (Mitsuyama *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2013). Quinn

et al., tampoco encontraron diferencias significativas entre las diferentes regiones de la rodilla humana adulta en cuando a densidad celular y morfología de matriz, aunque sí en su grosor, siendo significativamente más grueso el tejido de la región mediocentral del platillo tibial (Quinn *et al.*, 2005).

Detección de cambios moleculares en tejido intacto y adyacente a lesión

Otro de los objetivos de este estudio fue evaluar si era posible identificar alteraciones moleculares en el tejido macroscópicamente intacto y adyacente al tejido lesionado.

Al analizar el tejido adyacente a la lesión tomando como referencia en grado K-L, se encontraron tendencias similares a las observadas para tejido lesionado, observando únicamente diferencias significativas en el parámetro SGAGs (Figura 37). Al comparar ambos tejidos (adyacente y lesión), teniendo en cuenta las diferentes articulaciones, se encontraron diferencias significativas, para los parámetros SGAGs y C/H de las muestras K-L II (cabeza femoral), PGs en las muestras K-L III y SGAGs y GMC en las muestras K-L IV (cóndilo femoral) y PGs en las muestras K-L IV (platillo tibial) (Tablas 13, 16 y 17).

Estos resultados indican que el tejido adyacente macroscópicamente intacto también muestra rasgos de un perfil molecular Raman de degradación del tejido, como el descenso de proteoglicanos (Figura 37). Esto concuerda con la evaluación histológica de cartílago adyacente a lesión en otros estudios, en los cuales se pudo observar muerte celular, dominios de reducción de PGs y menor condensación de colágeno (Lourido *et al.*, 2014; Pritzker *et al.*, 2006). El descenso de PGs en regiones adyacentes a lesiones con una respuesta de reparación deficiente, también se observó mediante *MRI* (Nelson *et al.*, 2018). Por otro lado, otro trabajo describió una mayor contribución de la señal 1063 cm^{-1} (OSO^3) en cartílago intacto frente a regiones erosionadas (Esmonde-White *et al.*, 2011). Estos cambios en el cartílago aparentemente intacto podrían ser provocados por la tensión que experimentan las células en zonas próximas a lesiones, las cuales pueden resultar en respuestas catabólicas y apoptosis celular (Varady *et al.*, 2016).

Otra observación que destacar en las muestras de este estudio, fue la presencia de bandas de mineralización (960 , 1070 y 1050 cm^{-1}) en el cartílago adyacente a la lesión. Aunque el estudio del hueso subcondral no se ha estimado en este trabajo, trabajos recientes en ER indican que cambios moleculares en este tejido podrían ocurrir de forma temprana y desencadenar la OA (Donell, 2019) y, por lo tanto, afectar al cartílago intacto antes de que se produzcan lesiones macroscópicas.

Finalmente, en un estudio previo, se observó una mayor correlación entre diferentes parámetros Raman (SGAGs, TGAGs y CoID/F) y el *MS* para cartílago lesionado que para cartílago intacto o adyacente a la lesión. Además, se demostró una dependencia de los resultados con la experiencia de diferentes observadores en la clasificación del *MS*, y que la variabilidad encontrada en los resultados podría influir en la distinción entre una OA temprana y moderada (Casal-Beiroa *et al.*, 2019).

6.3. Análisis bioquímico

Validación de parámetros SGAGs, PG y TGAGs frente al contenido bioquímico de sGAGs

Analizando los resultados de cuantificación de sGAGs obtenidos para el subconjunto de muestras de cabeza femoral, se encontraron diferencias significativas entre muestras de grado K-L I con respecto a las muestras de K-L II-IV y correlaciones significativas tanto con los resultados expresados en % p.h. como % p.s. ($\rho=-0,5373$ y $\rho=-0,3915$, respectivamente) (Figuras 45 y 46).

En el caso de la evaluación histomorfológica del cartílago por *MS*, se encontró una reducción significativa de sGAGs en grados de *MS* más elevados (Figuras 49 y 50), obteniendo correlaciones negativas significativas (fuertes con el % p.h. y débiles con el % p.s.) tanto con el *MS* total ($\rho=-0,5361$ p.h.; $\rho=-0,4142$ p.s.), como más concretamente con el *MS-SIII* ($\rho=-0,5469$ p.h.; $\rho=-0,4309$ p.s.), directamente relacionado con la presencia de proteoglicanos en la matriz (Figuras 51 y 52).

En ambos casos se encontró la misma tendencia descendente del contenido de sGAGs que se detectaba en base a los parámetros Raman relacionados con este componente (SGAGs, TGAGs, PGs) con las diferentes escalas de referencia (Figuras 36, 38 y 41). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Afara *et al.*, (Afara *et al.*, 2014; Afara *et al.*, 2017) en un modelo murino de OA, en el cual se encontraron correlaciones significativas entre la cuantificación de GAGs obtenida a partir de espectros IR tanto con el contenido bioquímico de sGAGs como con el *MS*. Adicionalmente, se encontraron en este trabajo, valores superiores de contenido de sGAGs que aquellos estudiados en cartílago de rata por estos autores, con rangos calculados en cartílago humano (54,97-7,61 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.h.) en función de su degradación, respecto a los hallados en rata (32,1-10,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ p.h.).

Los resultados de la cuantificación de GAGs sulfatados (% sGAGs p.h. y p.s.), mostraron correlaciones positivas significativas con los parámetros Raman SGAGs y PGs (Figura 55), lo que sirve como validación de los resultados obtenidos para estos

parámetros y de la asignación de las señales. Estas correlaciones fueron fuertes con el parámetro SGAGs ($\rho=0,683$ con respecto al % sGAGs p.h. y $\rho=0,587$ con respecto al % sGAGs p.s.), y con el parámetro PGs ($\rho=0,595$ con respecto al % sGAGs p.h. y $\rho=0,524$ con respecto al % sGAGs p.s.).

El ensayo utilizado para la determinación de GAGs cuantifica los GAGs sulfatados, por lo que es de esperar una mejor correlación con el parámetro SGAGs, directamente relacionado con los grupos sulfato, que con el resto de los parámetros relacionados con los GAGs. En el caso del parámetro TGAGs, las correlaciones obtenidas con la cuantificación normalizada tanto con el peso húmedo como seco no fueron significativas ($p=0,075$ y $p=0,175$, respectivamente). Esta ausencia de significancia puede ser debida a la mayor variabilidad obtenida para este parámetro ya observada en el análisis cuantitativo.

Validación de parámetros ColD/F, H/Col frente a contenido bioquímico *Hyp*

En cuanto al colágeno, varias enfermedades que afectan a los tejidos conectivos provocan su síntesis deficiente, cambios en el entrecruzamiento de las fibras, o su desnaturalización o degradación (Rýglová *et al.*, 2017). La estructura de la molécula sigue un patrón *Gly-X-Y*, donde X e Y son frecuentemente *Pro* e *Hyp* (Responte *et al.*, 2007). Esta secuencia estabiliza la estructura de hélice α , mayormente por los enlaces de hidrógeno intramoleculares formados por la *Hyp* (Angele *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Maity *et al.*, 2019).

A nivel molecular, varios estudios en cartílago OA apuntan o bien a un contenido de Col que se mantiene estable mediante los procesos de síntesis/degradación, o a un incremento de Col deficiente durante la OA, como repuesta maladaptativa (Gibson *et al.*, 2001; Aigner y McKenna, 2002; Pearle *et al.*, 2005; Temple-Wong *et al.*, 2009).

La cuantificación de *Hyp* es comúnmente utilizada para detectar inespecíficamente el colágeno total (Hosseini *et al.*, 2013), pero, durante la OA, la síntesis deficiente de diferentes tipos de colágenos por parte de los condrocitos afecta de alguna forma al contenido de *Hyp*, el cual es menor en cartílago OA (Temple-Wong *et al.*, 2009). Estos hechos concuerdan con el descenso en el contenido de este aminoácido observado en las muestras OA (Figuras 47 y 53), con correlaciones significativas tanto con el grado K-L ($\rho=-0,307$ y $p=0,041$ con respecto al p.h.) como *MS* ($\rho=-0,537$ y $p=0,010$ con respecto a p.h. y $\rho=-0,392$ y $p=0,006$ con respecto al p.s), salvo en el caso de los resultados expresados como % *Hyp* p.s. con el grado K-L ($p=0,230$) (Figuras 48 y 54).

El descenso más notorio al expresar los resultados respecto al peso húmedo se explica en parte por el aumento del contenido de agua en el tejido OA, debido al aumento de su permeabilidad por la pérdida de la integridad de la red de colágeno (Bhosale *et al.*, 2008; Hosseininia *et al.*, 2013). Este descenso del contenido de *Hyp* se observó tanto en las muestras OA medido radiológicamente (grado K-L) como histomorfológicamente (MS), con valores comprendidos entre 27,49-3,82 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (peso húmedo).

La cuantificación bioquímica de *Hyp* mostró una tendencia inversa a los parámetros Raman de desorganización del colágeno (CoID/F) y mineralización/matriz colagenosa (H/Col) (Figuras 36 y 38), lo que relaciona el descenso de *Hyp* tanto con el aumento de la desorganización del colágeno (CoID/F) como con el aumento de la relación matriz mineralizada/colagenosa (H/Col). Las correlaciones obtenidas respecto a estos parámetros confirmaron que esta relación es significativa en ambos casos (Figura 56).

En cuanto al parámetro CoID/F, ambas correlaciones obtenidas, tanto con los resultados de *Hyp* expresados en % p.h. y % p.s, fueron débiles y significativas ($\rho=-0,289$ y $p=0,0485$ y $\rho=-0,296$ y $p=0,0434$, respectivamente). Este resultado puede explicarse por el efecto del descenso de este aminoácido en la cadena en el proceso de degradación. Al ser la *Hyp* responsable de la estabilización de la estructura de triple hélice α (Maity *et al.*, 2019), su disminución produce un consecuente menor grado de entrecruzamiento y desestabilización de la red de colágeno. La relación del contenido de *Hyp* con grandes estructuras de hélice α , permite al mismo tiempo asociar que su descenso pueda ser también debido a la síntesis de otro tipo de colágenos con dominios de esta estructura organizada menores que el Col-II, como es el caso del colágeno tipo VI, que contiene 52-78 residuos de *Hyp* por cada 1000 aminoácidos (Chu *et al.*, 1987) respecto a los 99-104 por cada 1000 del Col-II (Angele *et al.*, 2004; Hollander *et al.*, 1994).

En lo que respecta a la correlación con el parámetro H/Col, los resultados mostraron correlaciones débiles ($\rho=-0,317$ y $p=0,034$ con los resultados expresados como % *Hyp* p.h. y $\rho=-0,405$ y $p=0,006$ con los resultados expresados como % *Hyp* p.s.), que podrían estar relacionadas con el proceso de nucleación de cristales que se produce en torno a las fibras de colágeno en cartílago OA (Yan *et al.*, 2020), lo que hace disminuir el contenido relativo de colágeno al acumularse depósitos cristalinos en la estructura interna del tejido.

6.4. Identificación de perfiles y modelos predictivos de OA

Los modelos de regresión logística son útiles en clínica para evaluar el riesgo de un paciente de padecer o no una determinada enfermedad en función de diversas variables relacionadas, identificando el impacto de cada una de estas variables en el riesgo o probabilidad final. Estos modelos permiten la constitución de nomogramas, escalas predictivas construidas sobre una determinada cohorte representativa, que pueden emplear los clínicos de forma directa y sencilla para evaluar el riesgo de pacientes futuros de padecer una determinada enfermedad para valorar la realización de otro tipo de pruebas diagnósticas (Utsunomiya *et al.*, 2019).

De esta forma, este trabajo es el primero en el que se establecen modelos predictivos para la OA mediante parámetros Raman a través de modelos de regresión logística y curvas *ROC*. Esta metodología fue anteriormente empleada en otras patologías como el cáncer gástrico o alteraciones en el ligamento cruzado anterior (*ACL*) (Chen *et al.*, 2014; Matsunaga *et al.*, 2019).

Para ello, se analizó en primer lugar la existencia de diferentes perfiles entre las muestras pertenecientes al estudio a través del análisis clúster, tomando en cuenta tanto el global de muestras como el subconjunto de muestras de cartílago de cabeza femoral.

Análisis clúster

El análisis clúster por el método k-medias ya había sido utilizado anteriormente para agrupar mediante ER regiones de tejidos biológicos de diferente o similar composición (Kong *et al.*, 2013; Berghlot *et al.*, 2019) por lo que fue la metodología utilizada. Para ello se seleccionaron los parámetros Raman SGAGs, CoID/F y GMF, representativos de cada uno de los eventos que ocurren en el tejido a nivel molecular como son el descenso de GAGs, la desorganización del colágeno, y la mineralización del tejido (Pearle *et al.*, 2005; Bay-Jensen *et al.*, 2010; Goldring *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2014; Rýglová *et al.*, 2017). En lo que respecta a la mineralización, se optó por la variable GMF por corresponder, entre los parámetros de mineralización propuestos, al ratio en el que se encontraron un menor número de datos anómalos, y porque la banda de 960 cm^{-1} es la más descrita por otros autores en el cartílago erosionado o hipertrófico (Esmonde-White *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2011; Kunstar *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta estos parámetros, se obtuvieron dos perfiles diferentes y coincidentes tanto al analizar el subconjunto de cartílago de cabeza femoral como el global de muestras: un perfil de “gravedad baja” que se corresponde mayoritariamente

con muestras de grado K-L 0-II y *MS* 0-8 y otro de “gravedad elevada” que se corresponde mayoritariamente con muestras de grado K-L III-IV y *MS* 9-13.

Al analizar la muestra global, el mayor número de muestras disponibles en nuestra cohorte procedentes de grados de OA elevados y con perfil mineralizado en comparación con muestras sanas o de OA leve afecta el análisis, al provocar una tendencia a que los grupos se generen en torno a valores de mineralización más próximos a valores de tejido OA. Esto conduce a que las muestras de OA K-L 0-II pertenezcan mayoritariamente a un mismo clúster y que incluso más muestras de grado K-L elevado se incluyan en el clúster de gravedad baja en el análisis de la muestra global.

Modelos de regresión logística

Para evaluar la capacidad predictiva de los biomarcadores ópticos propuestos (SGAGs, CoID/F, GMF) se realizaron análisis de regresión logística, y se compararon las distintas curvas *ROC* obtenidas. A partir de estos análisis se obtuvieron los correspondientes nomogramas.

Tomando como variable respuesta los rangos de las variables referencia empleadas previamente definidos por los clústeres (K-L III-IV y *MS* 9-13), se realizaron análisis de regresión logística multivariados y se construyeron las diferentes curvas *ROC*, tomando en cuenta los parámetros Raman tanto como variables continuas como dicotómicas en función de los puntos de corte establecidos (modelos continuos o codificados, respectivamente).

De forma general, los parámetros escogidos para constituir estos modelos influyen en la probabilidad de pertenecer la muestra a un paciente de OA severa de forma que valores altos de CoID/F y GMF incrementan esta probabilidad, mientras que valores altos de SGAGs disminuyen la probabilidad de OA severa, lo que se corresponde con los principales eventos de degradación que ocurren en el tejido OA: descenso de GAGs, desordenación de las fibras de colágeno, y mineralización (Pearle *et al.*, 2005; Martel-Pelletier *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2020) .

Grado K-L como variable respuesta

Tomando como respuesta el grado K-L se obtuvieron, tanto para el modelo construido con variables continuas como codificadas, valores de *AUC*<0,8, tanto tomando el conjunto global de muestras como el subconjunto de muestras de cabeza femoral. Se puede deducir de estos resultados que los modelos predictivos son muy

buenos, ya que ofrecen una probabilidad alta de discriminar grados K-L elevados (III-IV).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes modelos de variables continuas vs codificadas ($p=0,5479$ para el global y $p=0,1017$ para el subconjunto de cabeza femoral), ni tampoco entre los modelos constituidos con el global de muestras vs subconjunto cabeza femoral (Tabla 50). La única diferencia entre modelos es la pérdida de significancia del parámetro GMF al tomar para el análisis el subconjunto de cartílago de cabeza femoral (Tablas 46 y 48), lo cual puede venir dado por la disminución del tamaño muestral. El parámetro ColD/F tampoco fue significativo en el modelo de variables continuas sobre la muestra global ($p=0,0729$), y en el modelo de variables codificadas sobre el subconjunto de cabeza femoral ($p=0,0651$), pero igualmente se incluyeron como parámetros en el análisis multivariable tanto ColD/F como GMF por considerarlos de relevancia clínica en el diagnóstico. En ninguno de los casos las variables sexo y edad resultaron significativas en los diferentes modelos construidos.

Los modelos constituidos tomando el grado K-L como variable respuesta mostraron una sensibilidad elevada (superior al 82%) en todos los casos, mientras que la especificidad fue inferior (62-79%). Esto se refleja en modelos predictivos más sensibles que específicos, siendo en el caso de la OA más relevante tener una buena sensibilidad para su detección y posterior tratamiento paliativo. El éxito en la correcta clasificación de las muestras de la cohorte de estudio en muestras de K-L 0-II (VPN) o muestras de K-L III-IV (VPP) superó en todos los casos el 70% (VPN=70-90% y VPP=74-84%) (Tablas 37,39, 47 y 49).

Escala MS como variable respuesta

Tomando como variable respuesta el MS 9-13, la principal diferencia que se observa es la pérdida de significancia de la variable GMF, que únicamente contribuye al modelo construido en base a las variables codificadas sobre la muestra global de forma próxima a la significancia ($p=0,0597$), aunque con una tendencia inversa al resto de modelos, indicando que valores de mineralización menores incrementan el riesgo de degradación de cartílago según su MS. Una explicación para esta falta de significancia es que, aunque la mineralización/calcificación del cartílago es un evento que se produce en su degradación (Goldring *et al.*, 2010; Esmonde-White *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2014), la escala MS no la evalúa como parámetro (Pascual Garrido *et al.*, 2009), por lo que no son variables directamente relacionadas. El parámetro GMF debería ser estudiado en más profundidad para evaluar su validez en estos modelos predictivos tomando como

referencia el *MS*, pues los resultados de los *OR* teniendo en cuenta las variables codificadas en esta cohorte, tanto para el global de muestras como para el subconjunto de cabeza femoral, no se corresponden con las evidencias clínicas, como son la mayor mineralización del cartílago OA y esclerosis subcondral (Bay-Jensen *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2013; Hawellek *et al.*, 2016). Esta contradicción puede deberse a la falta de significancia de este parámetro, pues en los IC95% se puede comprobar como también se incluyen valores superiores al 1, de la misma forma que en los modelos de variables continuas también el menor IC95% se encuentra por debajo de 1. Aunque se eligió el parámetro GMF como representativo de la mineralización, se podrían incluir otros parámetros estudiados relacionados (GMC, CPPD, C/H, H/Col), para estudiar el impacto de parámetros relacionados con la mineralización en la predicción de un *MS* elevado.

Los modelos construidos tomando el *MS* 9-13 como respuesta, presentaron valores de $AUC > 0,8$, constituyendo modelos con una capacidad predictiva muy buena de *MS* elevados (9-13), tanto tomando los parámetros como variables continuas como codificadas (Tablas 42, 44, 52 y 54). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes modelos de variables continuas vs codificadas ($p=0,8380$ para el global y $p=0,5140$ para el subconjunto de cabeza femoral), ni tampoco entre los modelos constituidos con el global de muestras vs subconjunto cabeza femoral (Tabla 55).

Los modelos construidos tomando el *MS* como variable respuesta sobre el conjunto global de muestras, mostraron una sensibilidad de 67-72% y especificidad en el rango 76-81%. Esto sugiere una mejora de la especificidad con respecto a los modelos tomando el K-L como variable respuesta y un descenso en la sensibilidad del modelo. Al generar los modelos partiendo del subconjunto de cartílago de cabeza femoral, de nuevo se obtuvieron valores altos de sensibilidad (89-95%) manteniendo la especificidad en un rango similar (75-79%), obteniendo para este subconjunto de muestras, modelos predictivos muy buenos ($AUC=0,883$ en el modelo de variables continuas y $AUC=0,900$ en el modelo de variables codificadas) (Tablas 52 y 54). El éxito en la correcta clasificación de las muestras de la cohorte de estudio en muestras de *MS* 0-8 (VPN) o muestras de *MS* 9-13 (VPP) oscila entre los rangos VPN=73-95% y VPP=56-77% (Tablas 42, 44, 52 y 54).

En resumen, los modelos obtenidos permiten predecir, mediante los parámetros Raman SGAGs, CoID/F y GMF, si el cartílago analizado pertenece a pacientes con OA

avanzada, pero no se obtuvieron evidencias de que la ER permita el diagnóstico de la OA temprana en la cohorte estudiada.

Limitaciones

La principal limitación de este estudio y que afecta a los diferentes apartados de esta tesis doctoral, fue la baja disponibilidad de muestras representativas de cartílago OA sano y que, parte de estas, evaluadas clínicamente como grado K-L 0 presentaban lesiones micro y macroscópicas. A estas limitaciones se suman las inherentes a las escalas de referencia utilizadas, como son la incapacidad de analizar el cartílago de forma directa en una radiografía, o la mayor variabilidad del MS a la hora de evaluar OA leve a moderada (Ostergaard *et al.*, 1999; Pauli *et al.*, 2012). Esto afectó a la evaluación del potencial de la ER como herramienta para el diagnóstico temprano de la OA al no encontrar diferencias significativas entre muestras sanas y OA leve.

Para confirmar los resultados obtenidos y la constitución de nomogramas más representativos sería necesario replicar este estudio con un mayor tamaño muestral de pacientes, especialmente sanos, o realizar un ensayo clínico llevando a cabo un seguimiento sobre una determinada cohorte.

Otro factor que tener en cuenta sería la edad. Las muestras de este estudio pertenecen fundamentalmente a pacientes mayores de 60 años y, teniendo en cuenta que la edad es un factor de riesgo de padecer OA, así como de que se produzca mineralización en el cartílago (Mitsuyama *et al.*, 2007), sería interesante disponer de un tamaño muestral mayor de pacientes con menos de 60 años, para valorar el impacto de esta variable en los modelos predictivos. Sin embargo, tener pacientes de ambos rangos de edad, tanto sanos como OA, es una tarea complicada teniendo en cuenta los datos epidemiológicos y la estrecha relación de la enfermedad con la avanzada edad (Shane Anderson *et al.*, 2010).

Conclusiones

7. Conclusiones

Conclusión 1: La espectroscopía Raman permite la obtención de una huella molecular característica del cartílago articular humano, que incluye tanto señales Raman específicas como inespecíficas. El cartílago OA muestra variaciones en la huella molecular con respecto al sano en varias señales, a partir de las cuales se pudo presentar un potencial perfil biomarcador para el diagnóstico de la OA.

Conclusión 2: La espectroscopía Raman permite la detección de diferencias entre los distintos grados de severidad (K-L) y degradación (MS) del cartílago articular durante la OA. Se validan los parámetros SGAGs, PGs, ColD/F y H/Col como biomarcadores ópticos.

2.1: Se identificaron en cartílago OA el descenso de GAGs (SGAGs, PGs), el aumento de la desorganización del colágeno (ColD/F), y mineralización del tejido (CPPD, GMF, GMC, C/H, H/Col), presentando los parámetros SGAGs, PGs, ColD/F y H/Col correlaciones significativas respecto a las escalas de referencia utilizadas.

2.2: Las limitaciones de la presente cohorte no permitieron apoyar la hipótesis de un diagnóstico diferencial de OA en función de las regiones anatómicas estudiadas (cabeza femoral, cóndilo femoral y platillo tibial).

2.3: El análisis del cartílago intacto y adyacente a la lesión muestra rasgos de degradación del tejido, como la reducción de SGAGs.

Conclusión 3: La cuantificación bioquímica de GAGs sulfatados y colágeno total valida los parámetros Raman SGAGs, PGs, ColD/F y H/Col de entre los diferentes biomarcadores propuestos.

3.1: Los resultados obtenidos para los parámetros SGAGs y PGs fueron validados mediante la cuantificación bioquímica, obteniendo correlaciones positivas y significativas.

3.2: El contenido de colágeno medido en función de la *Hyp* disminuye en las muestras OA, correlacionándose débilmente con la desorganización de la estructura secundaria de las fibras (ColD/F) y con el parámetro H/Col.

Conclusión 4: Los parámetros SGAGs, ColD/F y GMF permiten diferenciar dos perfiles de severidad de OA, denominados “severidad baja” y “severidad elevada”. La probabilidad de padecer una “OA leve-moderada” (K-L 0-II, MS 0-8) o “OA severa” (K-L

III-IV y *MS* 9-13) puede ser clínicamente estimada a través de nomogramas predictivos con base en los parámetros Raman descritos.

4.1: Analizando tanto el conjunto global de muestras, como el subconjunto de cabeza femoral, éstas se agrupan en dos perfiles distintos mediante análisis clúster, teniendo en cuenta los parámetros SGAGs, CoID/F y GMF: el clúster “severidad baja” que se compone mayoritariamente de muestras K-L 0-II y *MS* 0-8, y el clúster “severidad elevada” que se compone de muestras de K-L III-IV y *MS* 9-13.

4.2: Tomando como variables respuesta tanto el K-L III-IV como el *MS* 9-13, se obtienen modelos predictivos muy buenos ($AUC > 0,8$) tanto para los parámetros Raman continuos como tomando variables dicotómicas en función de los puntos de corte. La capacidad predictiva de los distintos modelos constituidos es similar.

Bibliografía

8. Bibliografía

- Abhishek, A., Curran, D. J., Bilwani, F., Jones, A. C., Towler, M. R., & Doherty, M. (2015). In vivo detection of monosodium urate crystal deposits by Raman spectroscopy-a pilot study. *Rheumatology (United Kingdom)*, *55*(2), 379–380. doi: 10.1093/rheumatology/kev339
- Abramczyk, H., Brozek-Pluska, B., Surmacki, J., Jablonska-Gajewicz, J., & Kordek, R. (2012). Raman “optical biopsy” of human breast cancer. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *108*(1–2), 74–81. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2011.10.004
- Acebes, C., Roman-Blas, J. A., Delgado-Baeza, E., Palacios, I., & Herrero-Beaumont, G. (2009). Correlation between arthroscopic and histopathological grading systems of articular cartilage lesions in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *17*(2), 205–212. doi: 10.1016/j.joca.2008.06.010
- Aguilar, H., Rodríguez-Domínguez, M. Coello, B., Caeiro-Rey, J.R. Stefanov, S., Rogríguez-Valencia, C. López, E., López-Álvarez, M. Chiussi, S., Serra, J. & González, P. (2015). Espectroscopía Raman para el análisis de tejido vivo y biocerámicas de origen biológico y sintético. En González, P. (Ed). Biomateriales: Diseño, producción y caracterización. Biblos Clube de Lectores S.L., pp 33-52
- Afara, I. O. Iuwaseu., Prasadam, I., Moody, H., Crawford, R., Xiao, Y., & Oloyede, A. (2014). Near infrared spectroscopy for rapid determination of Mankin score components: a potential tool for quantitative characterization of articular cartilage at surgery. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, *30*(9), 1146–1155. doi: 10.1016/j.arthro.2014.04.097
- Afara, I. O., Prasadam, I., Arabshahi, Z., Xiao, Y., & Oloyede, A. (2017). Monitoring osteoarthritis progression using near infrared (NIR) spectroscopy. *Scientific Reports*, *7*(1), 11463. doi: 10.1038/s41598-017-11844-3
- Aigner, T., & McKenna, L. (2002). Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, *59*(1), 5–18. doi: 10.1007/s00018-002-8400-3
- Albro, M. B., Bergholt, M. S., St-Pierre, J. P., Vinals Guitart, A., Zlotnick, H. M., Evita, E. G., & Stevens, M. M. (2018). Raman spectroscopic imaging for quantification of depth-dependent and local heterogeneities in native and engineered cartilage. *NPJ Regenerative Medicine*, *3*(1), 3. doi: 10.1038/s41536-018-0042-7
- Altman, R., Alarcón, G., Appelrouth, D., Bloch, D., Borenstein, D., Brandt, K., Brown, C., Cooke, T. D., Daniel, W., Feldman, D., Greenwald, R., Hochberg, M., Howell, D., Ike, R., Kapila, P., Kaplan, D., Koopman, W., Marino, C., McDonald, E., ... Wolfe, F. (1991). The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis & Rheumatism*, *34*(5), 505–514. doi: 10.1002/art.1780340502
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T. D., Greenwald, R., & Hochberg, M. (1986). Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis and Rheumatism*, *29*(8), 1039–1049. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3741515>

- Altman, R. D., & Gold, G. E. (2007). Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthritis and Cartilage*, *15*(SUPPL. A), A1–A56. doi: 10.1016/j.joca.2006.11.009
- Angele, P., Abke, J., Kujat, R., Faltermeier, H., Schumann, D., Nerlich, M., Kinner, B., Englert, C., Ruszczak, Z., Mehrl, R., & Mueller, R. (2004). Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, *25*(14), 2831–2841. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.066
- Ansari, S., Khorshidi, S., & Karkhaneh, A. (2019). Engineering of gradient osteochondral tissue: From nature to lab. *Acta Biomaterialia*, *87*, 41–54. doi: 10.1016/j.actbio.2019.01.071
- Antony, J., McGuinness, K., O'Connor, N. E., & Moran, K. (2016). Quantifying radiographic knee osteoarthritis severity using deep convolutional neural networks. *2016 23rd International Conference on Pattern Recognition (ICPR)*, 0(March 2019), 1195–1200. doi: 10.1109/ICPR.2016.7899799
- Asher, S., & Johnson, C. (1984). Raman spectroscopy of a coal liquid shows that fluorescence interference is minimized with ultraviolet excitation. *Science*, *225*(4659), 311–313. doi: 10.1126/science.6740313
- Awonusi, A., Morris, M. D., & Tecklenburg, M. M. J. (2007). Carbonate assignment and calibration in the Raman spectrum of apatite. *Calcified Tissue International*, *81*(1), 46–52. doi: 10.1007/s00223-007-9034-0
- Bay-Jensen, A. C., Hoegh-Madsen, S., Dam, E., Henriksen, K., Sondergaard, B. C., Pastoureau, P., Qvist, P., & Karsdal, M. A. (2010). Which elements are involved in reversible and irreversible cartilage degradation in osteoarthritis? *Rheumatology International*, *30*(4), 435–442. doi: 10.1007/s00296-009-1183-1
- Bayliss, M. T., & Ali, S. Y. (1978). Age-related changes in the composition and structure of human articular-cartilage proteoglycans. *Biochemical Journal*, *176*(3), 683–693. doi: 10.1042/bj1760683
- Bazin, D., Daudon, M., Combes, C., & Rey, C. (2012). Characterization and some physicochemical aspects of pathological microcalcifications. *Chemical Reviews*, *112*(10), 5092–5120. doi: 10.1021/cr200068d
- Beattie, K. A., Boullous, P., Pui, M., O'Neill, J., Inglis, D., Webber, C. E., & Adachi, J. D. (2005). Abnormalities identified in the knees of asymptomatic volunteers using peripheral magnetic resonance imaging. *Osteoarthritis and Cartilage*, *13*(3), 181–186. doi: 10.1016/j.joca.2004.11.001
- Bergholt, Mads S., Albro, M. B., & Stevens, M. M. (2017). Online quantitative monitoring of live cell engineered cartilage growth using diffuse fiber-optic Raman spectroscopy. *Biomaterials*, *140*, 128–137. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.06.015
- Bergholt, Mads S., St-Pierre, J.-P., Offeddu, G. S., Parmar, P. A., Albro, M. B., Puetzer, J. L., Oyen, M. L., & Stevens, M. M. (2016). Raman Spectroscopy Reveals New Insights into the Zonal Organization of Native and Tissue-Engineered Articular Cartilage. *ACS Central Science*, *2*(12), 885–895. doi: 10.1021/acscentsci.6b00222
- Bergholt, Mads Sylvest, Zheng, W., Lin, K., Wang, J., Xu, H., Ren, J. L., Ho, K. Y., Teh, M., Yeoh, K. G., & Huang, Z. (2015). Characterizing variability of in vivo Raman spectroscopic properties of different anatomical sites of normal colorectal tissue

- towards cancer diagnosis at colonoscopy. *Analytical Chemistry*, 87(2), 960–966. doi: 10.1021/ac503287u
- Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin*, 87(1), 77–95. doi: 10.1093/bmb/ldn025
- Bi, X., Walsh, A., Mahadevan-Jansen, A., & Herline, A. (2011). Development of Spectral Markers for the Discrimination of Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Using Raman Spectroscopy. *Diseases of the Colon & Rectum*, 54(1), 48–53. doi: 10.1007/DCR.0b013e3181fcf68d
- Billinghurst, R. C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., Chen, J., Van Wart, H., & Poole, A. R. (1997). Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, 99(7), 1534–1545. doi: 10.1172/JCI119316
- Bonifacio, A., Beleites, C., Vittur, F., Marsich, E., Semeraro, S., Paoletti, S., & Sergio, V. (2010). Chemical imaging of articular cartilage sections with Raman mapping, employing uni- and multi-variate methods for data analysis. *The Analyst*, 135(12), 3193. doi: 10.1039/c0an00459f
- Bougeard, D., Buback, M., & Cao, A. (1995). *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications* (B. Schrader (ed.); pp. 63–186). Weinheim:VCH: John Wiley & Sons.
- Braun, H. J., & Gold, G. E. (2012). Diagnosis of osteoarthritis: imaging. *Bone*, 51(2), 278–288. doi: 10.1016/j.bone.2011.11.019
- Buchwald, T., Niciejewski, K., Kozielski, M., Szybowicz, M., Siatkowski, M., & Krauss, H. (2012). Identifying compositional and structural changes in spongy and subchondral bone from the hip joints of patients with osteoarthritis using Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 17(1), 017007. doi: 10.1117/1.JBO.17.1.017007
- Buckwalter, J. A., Mankin, H. J., & Grodzinsky, A. J. (2005). Articular Cartilage and Osteoarthritis. *Instructional Course Lectures*, 54, 465–480. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952258>
- Burguera, E. F., Calvo, L. G., Pereira, C. R., Javier, F., García, B., Cristina, J., & Magalhães, S. (2016). *Regenerative Medicine Approaches for Osteoarthritis*. 1–15.
- Butler, H. J., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., Dorney, J., Esmonde-White, K., Fullwood, N. J., Gardner, B., Martin-Hirsch, P. L., Walsh, M. J., McAinsh, M. R., Stone, N., & Martin, F. L. (2016). Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*, 11(4), 664–687. doi: 10.1038/nprot.2016.036
- Carvalho, C. S., Martin, A. A., Santo, A. M. E., Andrade, L. E. C., Pinheiro, M. M., Cardoso, M. A. G., & Raniero, L. (2011). A Rheumatoid arthritis study using Raman spectroscopy. *Theoretical Chemistry Accounts*, 130(4–6), 1211–1220. doi: 10.1007/s00214-011-0905-0
- Casal-Beiroa, P., Blanco, F.J. & Magalhães, J. (2020a) Raman spectroscopy for cartilage damage severity, degradation and repair assessment. En González, P. (Ed.) *Avances en la Bioingeniería para el envejecimiento saludable*, pp 43-54, Universidade de Vigo, Vigo, España

- Casal-Beiroa, P., González, P., Blanco F.J. & Magalhaes, J.(2020b). Molecular analysis of the destruction of articular joint tissues by Raman spectroscopy. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. doi: 10.1080/14737159.2020.1782747
- Casal-Beiroa, P., Balboa-Barreiro, V., Pértega-Díaz, S., González, P., Oreiro, N., Blanco, F. J., & Magalhaes, J. (2020c). Raman spectroscopy for osteoarthritis severity and cartilage degradation assessment - defining optical biomarkers using an ex vivo model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 28(2020), S326–S327. doi: 10.1016/j.joca.2020.02.504
- Casal-Beiroa, Paula, Balboa-Barreiro, V., Goyanes, N., Filgueira-Fernández, P., González, P., Pertega, S., Blanco, F. J., & Magalhães, J. (2019). FRI0505 CORRELATIONS BETWEEN CARTILAGE MOLECULAR COMPOSITION DETERMINED BY RAMAN SPECTROSCOPY AND MANKIN SCORE: IMPACT OF INTER AND INTRA-VARIABILITY. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(Suppl 2), 947 LP – 948. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-eular.5972
- Casal Beiroa, P., Burguera, E. F., Hermida Gomez, T., Goyanes, N., Oreiro Villar, N., Blanco, F. J., Gonzalez, P., & Magalhaes, J. (2018). Optical biomarkers for the early diagnosis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26(2018), S191. doi: 10.1016/j.joca.2018.02.409
- Casal-Beiroa, P. (2017) Caracterización del cartílago articular humano por espectroscopía Raman (Trabajo Fin de Máster), Universidade da Coruña, A Coruña, España.
- Chen, Y., Dai, J., Zhou, X., Liu, Y., Zhang, W., & Peng, G. (2014). Raman spectroscopy analysis of the biochemical characteristics of molecules associated with the malignant transformation of gastric mucosa. *PLoS ONE*, 9(4). doi: 10.1371/journal.pone.0093906
- Chiou, H. J., Hung, S. C., Lin, S. Y., Wei, Y. S., & Li, M. J. (2009). Correlations among mineral components, progressive calcification process and clinical symptoms of calcific tendonitis. *Rheumatology*, 49(3), 548–555. doi: 10.1093/rheumatology/kep359
- Chu, M.-L., Mann, K., Deutzmann, R., Privula-Conway, D., Hsu-Chen, C.-C., Bernard, M. P., & Timpl, R. (1987). Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones. *European Journal of Biochemistry*, 168(2), 309–317. doi: 10.1111/j.1432-1033.1987.tb13422.x
- Cillero-Pastor, B., Eijkel, G., Kiss, A., Blanco, F. J., & Heeren, R. M. A. (2012). Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry-Based Molecular Distribution Distinguishing Healthy and Osteoarthritic Human Cartilage. *Analytical Chemistry*, 84(21), 8909–8916. doi: 10.1021/ac301853q
- Coello, B., López-Álvarez, M., Rodríguez-Domínguez, M., Serra, J., & González, P. (2015). Quantitative evaluation of the mineralization level of dental tissues by Raman spectroscopy. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 1(4), 045204. doi: 10.1088/2057-1976/1/4/045204
- Cordero, E., Latka, I., Matthäus, C., Schie, I. W., & Popp, J. (2018). In-vivo Raman spectroscopy: from basics to applications. *Journal of Biomedical Optics*, 23(07), 1. doi: 10.1117/1.JBO.23.7.071210
- Crow, P., Molckovsky, A., Stone, N., Uff, J., Wilson, B., & Wongkeesong, L. M. (2005).

- Assessment of fiberoptic near-infrared raman spectroscopy for diagnosis of bladder and prostate cancer. *Urology*, 65(6), 1126–1130. doi: 10.1016/j.urology.2004.12.058
- Dehring, K. A., Smukler, A. R., Roessler, B. J., & Morris, M. D. (2006). Correlating changes in collagen secondary structure with aging and defective type II collagen by Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 60(4), 366–372. doi: 10.1366/000370206776593582
- DiDomenico, C. D., Kaghazchi, A., & Bonassar, L. J. (2019). Measurement of local diffusion and composition in degraded articular cartilage reveals the unique role of surface structure in controlling macromolecular transport. *Journal of Biomechanics*, 82, 38–45. doi: 10.1016/j.jbiomech.2018.10.019
- Ding, H., Dupont, A. W., Singhal, S., Scott, L. D., Guha, S., Younes, M., Ye, Y., & Bi, X. (2017). Effect of physiological factors on the biochemical properties of colon tissue – an in vivo Raman spectroscopy study. *Journal of Raman Spectroscopy*, 48(7), 902–909. doi: 10.1002/jrs.5140
- Dochow, S., Fatakdawala, H., Phipps, J. E., Ma, D., Bocklitz, T., Schmitt, M., Bishop, J. W., Margulies, K. B., Marcu, L., & Popp, J. (2016). Comparing Raman and fluorescence lifetime spectroscopy from human atherosclerotic lesions using a bimodal probe. *Journal of Biophotonics*, 9(9), 958–966. doi: 10.1002/jbio.201500341
- Donell, S. (2019). Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Reviews*, 4(6), 221–229. doi: 10.1302/2058-5241.4.180102
- Durcan, L., Bolster, F., Kavanagh, E. C., & McCarthy, G. M. (2014). The Structural Consequences of Calcium Crystal Deposition. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 40(2), 311–328. doi: 10.1016/j.rdc.2014.01.007
- Esmonde-White, K. (2014). Raman spectroscopy of soft musculoskeletal tissues. *Applied Spectroscopy*, 68(11), 1203–1218. doi: 10.1366/14-07592
- Esmonde-White, K. A., Esmonde-White, F. W. L., Morris, M. D., & Roessler, B. J. (2011). Fiber-optic Raman spectroscopy of joint tissues. *The Analyst*, 136(8), 1675–1685. doi: 10.1039/c0an00824a
- Fawcett, T. (2006). An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters*, 27(8), 861–874. doi: 10.1016/j.patrec.2005.10.010
- Fox, A. J. S., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 1(6), 461–468. doi: 10.1177/1941738109350438
- Fuerst, M., Bertrand, J., Lammers, L., Dreier, R., Echtermeyer, F., Nitschke, Y., Rutsch, F., Schäfer, F. K. W., Niggemeyer, O., Steinhagen, J., Lohmann, C. H., Pap, T., & Rütter, W. (2009). Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 60(9), 2694–2703. doi: 10.1002/art.24774
- Gamsjaeger, S., Klaushofer, K., & Paschalis, E. P. (2014). Raman analysis of proteoglycans simultaneously in bone and cartilage. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(9), 794–800. doi: 10.1002/jrs.4552
- Gautam, R., Samuel, A., Sil, S., Chaturvedi, D., Dutta, A., Ariese, F., & Umapathy, S. (2015). Raman and mid-infrared spectroscopic imaging: Applications and advancements. *Current Science*, 108(3), 341–356. Retrieved from

<http://www.jstor.org/stable/24216561>

- Gelse, K. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *55*(12), 1531–1546. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002
- Gibson, G. J., Verner, J. J., Nelson, F. R. T., & Lin, D.-L. (2001). Degradation of the cartilage collagen matrix associated with changes in chondrocytes in osteoarthritis. Assessment by loss of background fluorescence and immunodetection of matrix components. *Journal of Orthopaedic Research*, *19*(1), 33–42. doi: 10.1016/S0736-0266(00)00008-5
- Goldring, M. B., & Goldring, S. R. (2010). Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1192*, 230–237. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x
- Guilak, F. (2006). The Pericellular Matrix as a Transducer of Biomechanical and Biochemical Signals in Articular Cartilage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1068*(1), 498–512. doi: 10.1196/annals.1346.011
- Guilak, Farshid. (2000). The deformation behavior and viscoelastic properties of chondrocytes in articular cartilage. *Biorheology*, *37*(1–2), 27–44.
- Gunasekaran, S., Anbalagan, G., & Pandi, S. (2006). Raman and infrared spectra of carbonates of calcite structure. *Journal of Raman Spectroscopy*, *37*(9), 892–899. doi: 10.1002/jrs.1518
- Guymer, E., Baranyay, F., Wluka, A. E., Hanna, F., Bell, R. J., Davis, S. R., Wang, Y., & Cicuttini, F. M. (2007). A study of the prevalence and associations of subchondral bone marrow lesions in the knees of healthy, middle-aged women. *Osteoarthritis and Cartilage*, *15*(12), 1437–1442. doi: 10.1016/j.joca.2007.04.010
- Han, L., Grodzinsky, A. J., & Ortiz, C. (2011). Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix. *Annual Review of Materials Research*, *41*(1), 133–168. doi: 10.1146/annurev-matsci-062910-100431
- Haugen, I. K., Lillegraven, S., Slatkowsky-Christensen, B., Haavardsholm, E. A., Sesseng, S., Kvien, T. K., Van Der Heijde, D., & Bøyesen, P. (2011). Hand osteoarthritis and MRI: Development and first validation step of the proposed Oslo Hand Osteoarthritis MRI score. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *70*(6), 1033–1038. doi: 10.1136/ard.2010.144527
- Hawellek, T., Hubert, J., Hischke, S., Krause, M., Bertrand, J., Pap, T., Püschel, K., Rütter, W., & Niemeier, A. (2016). Articular cartilage calcification of the hip and knee is highly prevalent, independent of age but associated with histological osteoarthritis: evidence for a systemic disorder. *Osteoarthritis and Cartilage*, *24*(12), 2092–2099. doi: 10.1016/j.joca.2016.06.020
- Hayashi, D., Roemer, F. W., & Guermazi, A. (2016). Imaging for osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, *59*(3), 161–169. doi: 10.1016/j.rehab.2015.12.003
- Hoemann, C. D., Sun, J., Chrzanowski, V., & Buschmann, M. D. (2002). A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage. *Analytical Biochemistry*, *300*(1), 1–10. doi: 10.1006/abio.2001.5436
- Hoff, P., Buttgerit, F., Burmester, G. R., Jakstadt, M., Gaber, T., Andreas, K., Matziolis, G., Perka, C., & Röhner, E. (2013). Osteoarthritis synovial fluid activates pro-

- inflammatory cytokines in primary human chondrocytes. *International Orthopaedics*, 37(1), 145–151. doi: 10.1007/s00264-012-1724-1
- Hollander, A. P., Heathfield, T. F., Webber, C., Iwata, Y., Bourne, R., Rorabeck, C., & Poole, A. R. (1994). Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *Journal of Clinical Investigation*, 93(4), 1722–1732. doi: 10.1172/JCI117156
- Hosseini, S., Lindberg, L. R., & Dahlberg, L. E. (2013). Cartilage collagen damage in hip osteoarthritis similar to that seen in knee osteoarthritis; a case–control study of relationship between collagen, glycosaminoglycan and cartilage swelling. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14(1), 18. doi: 10.1186/1471-2474-14-18
- Hosu, C. D., Moisiu, V., Stefanescu, A., Antonescu, E., Leopold, L. F., Leopold, N., & Fodor, D. (2019). Raman spectroscopy applications in rheumatology. *Lasers in Medical Science*, 34(4), 827–834. doi: 10.1007/s10103-019-02719-2
- Hunter, D. J., Arden, N., Conaghan, P. G., Eckstein, F., Gold, G., Grainger, A., Guermazi, A., Harvey, W., Jones, G., Hellio Le Graverand, M. P., Laredo, J. D., Lo, G., Losina, E., Mosher, T. J., Roemer, F., Zhang, W., & OARSI OA Imaging Working Group. (2011). Definition of osteoarthritis on MRI: results of a Delphi exercise. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(8), 963–969. doi: 10.1016/j.joca.2011.04.017
- Hunter, D. J., Guermazi, A., Lo, G. H., Grainger, A. J., Conaghan, P. G., Boudreau, R. M., & Roemer, F. W. (2011). Evolution of semi-quantitative whole joint assessment of knee OA: MOAKS (MRI Osteoarthritis Knee Score). *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(8), 990–1002. doi: 10.1016/j.joca.2011.05.004
- Hwang, H., & Kim, H. (2015). Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26035–26054. doi: 10.3390/ijms161125943
- Kafienah, W., & Sims, T. J. (2004). Biochemical methods for the analysis of tissue-engineered cartilage. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 238(February), 217–230. doi: 10.1385/1-59259-428-x:217
- Karsdal, M. A., Michaelis, M., Ladel, C., Siebuhr, A. S., Bihlet, A. R., Andersen, J. R., Guehring, H., Christiansen, C., Bay-Jensen, A. C., & Kraus, V. B. (2016). Disease-modifying treatments for osteoarthritis (DMOADs) of the knee and hip: lessons learned from failures and opportunities for the future. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(12), 2013–2021. doi: 10.1016/j.joca.2016.07.017
- Kellgren, J., & Lawrence, J. (1957). Radiological assessment of osteo-arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 16(4), 494–502. doi: 10.1136/ard.16.4.494
- Khan, A. F., Awais, M., Khan, A. S., Tabassum, S., Chaudhry, A. A., & Rehman, I. U. (2013). Raman spectroscopy of natural bone and synthetic apatites. *Applied Spectroscopy Reviews*, 48(4), 329–355. doi: 10.1080/05704928.2012.721107
- Kirsch, M., Schackert, G., Salzer, R., & Krafft, C. (2010). Raman spectroscopic imaging for in vivo detection of cerebral brain metastases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(4), 1707–1713. doi: 10.1007/s00216-010-4116-7
- Knudson, C. B., & Knudson, W. (2001). Cartilage proteoglycans. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 12(2), 69–78. doi: 10.1006/scdb.2000.0243
- Kraus, V. B., Blanco, F. J., Englund, M., Karsdal, M. A., & Lohmander, L. S. (2015). Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials

- and clinical use. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(8), 1233–1241. doi: 10.1016/j.joca.2015.03.036
- Kumar, R., Grønhaug, K. M., Afseth, N. K., Isaksen, V., de Lange Davies, C., Drogset, J. O., & Lilledahl, M. B. (2015). Optical investigation of osteoarthritic human cartilage (ICRS grade) by confocal Raman spectroscopy: a pilot study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(26), 8067–8077. doi: 10.1007/s00216-015-8979-5
- Kunstar, A., Leijten, J., van Leuveren, S., Hilderink, J., Otto, C., van Blitterswijk, C. A., Karperien, M., & van Apeldoorn, A. A. (2012). Recognizing different tissues in human fetal femur cartilage by label-free Raman microspectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 17(11), 116012. doi: 10.1117/1.JBO.17.11.116012
- Lasko, T. A., Bhagwat, J. G., Zou, K. H., & Ohno-Machado, L. (2005). The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. *Journal of Biomedical Informatics*, 38(5), 404–415. doi: 10.1016/j.jbi.2005.02.008
- Latka, I., Dochow, S., Krafft, C., Dietzek, B., & Popp, J. (2013). Fiber optic probes for linear and nonlinear Raman applications - Current trends and future development. *Laser and Photonics Reviews*, 7(5), 698–731. doi: 10.1002/lpor.201200049
- Levillain, A., Boulocher, C., Kaderli, S., Viguier, E., Hannouche, D., Hoc, T., & Magoaric, H. (2015). Meniscal biomechanical alterations in an ACLT rabbit model of early osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(7), 1186–1193. doi: 10.1016/j.joca.2015.02.022
- Li, B., Yang, S., & Akkus, O. (2014). A customized Raman system for point-of-care detection of arthropathic crystals in the synovial fluid. *The Analyst*, 139(4), 823–830. doi: 10.1039/c3an02062b
- Lim, N. S. J., Hamed, Z., Yeow, C. H., Chan, C., & Huang, Z. (2011). Early detection of biomolecular changes in disrupted porcine cartilage using polarized Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 16(1), 017003. doi: 10.1117/1.3528006
- Liu, H. Y., Li, D., & Guo, S. D. (2007). Studies on collagen from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Chemistry*, 101(2), 621–625. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.01.059
- Lourido, L., Ayoglu, B., Fernández-Tajes, J., Oreiro, N., Henjes, F., Hellström, C., Schwenk, J. M., Ruiz-Romero, C., Nilsson, P., & Blanco, F. J. (2017). Discovery of circulating proteins associated to knee radiographic osteoarthritis. *Scientific Reports*, 7(1), 137. doi: 10.1038/s41598-017-00195-8
- Lourido, L., Calamia, V., Mateos, J., Fernández-Puente, P., Fernández-Tajes, J., Blanco, F. J., & Ruiz-Romero, C. (2014). Quantitative proteomic profiling of human articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Journal of Proteome Research*, 13(12), 6096–6106. doi: 10.1021/pr501024p
- Lui, H., Zhao, J., McLean, D., & Zeng, H. (2012). Real-time raman spectroscopy for in vivo skin cancer diagnosis. *Cancer Research*, 72(10), 2491–2500. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4061
- Lüssea, S., Claassen, H., Gehrke, T., Hassenpflug, J., Schünke, M., Heller, M., & Glüer, C. C. (2000). Evaluation of water content by spatially resolved transverse relaxation times of human articular cartilage. *Magnetic Resonance Imaging*, 18(4), 423–430. doi: 10.1016/S0730-725X(99)00144-7

- Magee, N. D., Villaumie, J. S., Marple, E. T., Ennis, M., Elborn, J. S., & McGarvey, J. J. (2009). Ex vivo diagnosis of lung cancer using a Raman miniprobe. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(23), 8137–8141. doi: 10.1021/jp900379w
- Maity, P. P., Dutta, D., Ganguly, S., Kapat, K., Dixit, K., Chowdhury, A. R., Samanta, R., Das, N. C., Datta, P., Das, A. K., & Dhara, S. (2019). Isolation and mass spectrometry based hydroxyproline mapping of type II collagen derived from *Capra hircus* ear cartilage. *Communications Biology*, 2(1), 146. doi: 10.1038/s42003-019-0394-6
- Maldonado, M., & Nam, J. (2013). The Role of Changes in Extracellular Matrix of Cartilage in the Presence of Inflammation on the Pathology of Osteoarthritis. *BioMed Research International*, 2013, 1–10. doi: 10.1155/2013/284873
- Mandair, G. S., Dehring, K. A., Roessler, B. J., & Morris, M. D. (2006). Detection of potential osteoarthritis biomarkers using surface enhanced Raman spectroscopy in the near-infrared. *Biomedical Vibrational Spectroscopy III: Advances in Research and Industry*, 6093, 60930H. doi: 10.1117/12.644790
- Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippiello, L., & Zarins, A. (1971). Biochemical and Metabolic Abnormalities in Articular Cartilage from Osteo-Arthritic Human Hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *Journal of Bone Joint Surgery Am*, 53(3), 523–537.
- Mansfield, J. C., & Winlove, C. P. (2017). Lipid distribution, composition and uptake in bovine articular cartilage studied using Raman micro-spectrometry and confocal microscopy. *Journal of Anatomy*, 231(1), 156–166. doi: 10.1111/joa.12624
- Mansour, J. M. (2003). Biomechanics of cartilage. *Kinesiology: The Mechanics and Pathomechanics of Human Movement*, 2, 69–83.
- Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J. P., & Roughley, P. J. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 22(2), 351–384. doi: 10.1016/j.berh.2008.02.001
- Matsunaga, R., Takahashi, Y., Takahashi, R. H., Nagao, T., Shishido, T., Tateiwa, T., Pezzotti, G., & Yamamoto, K. (2019). A new method for diagnosing biochemical abnormalities of anterior cruciate ligament (ACL) in human knees: A Raman spectroscopic study. *Acta Biomaterialia*, 99, 284–294. doi: 10.1016/j.actbio.2019.09.016
- McConnell, S., Kolopack, P., & Davis, A. M. (2001). The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC): a review of its utility and measurement properties. *Arthritis and Rheumatism*, 45(5), 453–461. doi: 10.1002/1529-0131(200110)45:5<453::aid-art365>3.0.co;2-w
- McDevitt, C. A. (1973). Biochemistry of articular cartilage. Nature of proteoglycans and collagen of articular cartilage and their role in ageing and in osteoarthrosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 32(4), 364–378. doi: 10.1136/ard.32.4.364
- McGregor, H. C., Short, M. A., McWilliams, A., Shaipanich, T., Ionescu, D. N., Zhao, J., Wang, W., Chen, G., Lam, S., & Zeng, H. (2017). Real-time endoscopic Raman spectroscopy for in vivo early lung cancer detection. *Journal of Biophotonics*, 10(1), 98–110. doi: 10.1002/jbio.201500204
- Mitsuyama, H., Healey, R. M., Terkeltaub, R. A., Coutts, R. D., & Amiel, D. (2007). Calcification of human articular knee cartilage is primarily an effect of aging rather

- than osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(5), 559–565. doi: 10.1016/j.joca.2006.10.017
- Mort, J. S., Geng, Y., Fisher, W. D., & Roughley, P. J. (2016). Aggrecan heterogeneity in articular cartilage from patients with osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 1–10. doi: 10.1186/s12891-016-0944-8
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2007). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42(5), 493–541. doi: 10.1080/05704920701551530
- Musumeci, G., Aiello, F. C., Szychlińska, M. A., Di Rosa, M., Castrogiovanni, P., & Mobasher, A. (2015). Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 6093–6112. doi: 10.3390/ijms16036093
- Nagai, K., Nakamura, T., & Fu, F. H. (2018). The diagnosis of early osteoarthritis of the knee using magnetic resonance imaging. *Annals of Joint*, 3(2), 110–110. doi: 10.21037/aoj.2018.12.05
- Nelson, B. B., Kawcak, C. E., Barrett, M. F., McIlwraith, C. W., Grinstaff, M. W., & Goodrich, L. R. (2018). Recent advances in articular cartilage evaluation using computed tomography and magnetic resonance imaging. *Equine Veterinary Journal*, 50(5), 564–579. doi: 10.1111/evj.12808
- Nguyen, C., Bazin, D., Daudon, M., Chatron-Colliet, A., Hannouche, D., Bianchi, A., Côme, D., So, A., Busso, N., Lioté, F., & Ea, H.-K. (2013). Revisiting spatial distribution and biochemical composition of calcium-containing crystals in human osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Research & Therapy*, 15(5), R103. doi: 10.1186/ar4283
- Nieminen, M. T., Casula, V., Nevalainen, M. T., & Saarakkala, S. (2019). Osteoarthritis year in review 2018: imaging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(3), 401–411. doi: 10.1016/j.joca.2018.12.009
- Noguerol, T. M., Raya, J. G., Wessell, D. E., Vilanova, J. C., Rossi, I., & Luna, A. (2019). Functional MRI for evaluation of hyaline cartilage extracellular matrix, a physiopathological-based approach. *British Journal of Radiology*, 92(1103). doi: 10.1259/bjr.20190443
- Ostergaard, K., Andersen, C. B., Petersen, J., Bendtzen, K., & Salter, D. M. (1999). Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58(4), 208–213. doi: 10.1136/ard.58.4.208
- Pappas, G. P., Vogelsong, M. A., Staroswiecki, E., Gold, G. E., & Safran, M. R. (2016). Magnetic Resonance Imaging of Asymptomatic Knees in Collegiate Basketball Players. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 26(6), 483–489. doi: 10.1097/JSM.0000000000000283
- Pascual Garrido, C., Hakimiyan, A. A., Rappoport, L., Oegema, T. R., Wimmer, M. A., & Chubinskaya, S. (2009). Anti-apoptotic treatments prevent cartilage degradation after acute trauma to human ankle cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(9), 1244–1251. doi: 10.1016/j.joca.2009.03.007
- Patil, C. A., Kirshnamoorthi, H., Ellis, D. L., Van Leeuwen, T. G., & Mahadevan-Jansen, A. (2011). A clinical instrument for combined Raman spectroscopy-optical

- coherence tomography of skin cancers. *Lasers in Surgery and Medicine*, 43(2), 143–151. doi: 10.1002/lsm.21041
- Pauli, C., Whiteside, R., Heras, F. L., Nestic, D., Koziol, J., Grogan, S. P., Matyas, J., Pritzker, K. P. H., D’Lima, D. D., & Lotz, M. K. (2012). Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(6), 476–485. doi: 10.1016/j.joca.2011.12.018
- Pearle, A. D., Warren, R. F., & Rodeo, S. A. (2005). Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine*, 24(1), 1–12. doi: 10.1016/j.csm.2004.08.007
- Pelletier, M. J. (2003). Quantitative analysis using Raman spectrometry. *Applied Spectroscopy*, 57(1), 20A-42A. doi: 10.1366/000370203321165133
- Pence, I. J., Beaulieu, D. B., Horst, S. N., Bi, X., Herline, A. J., Schwartz, D. A., & Mahadevan-Jansen, A. (2017). Clinical characterization of in vivo inflammatory bowel disease with Raman spectroscopy. *Biomedical Optics Express*, 8(2), 524. doi: 10.1364/BOE.8.000524
- Pereira, D., Ramos, E., & Branco, J. (2014). Osteoarthritis. *Acta Médica Portuguesa*, 28(1), 99. doi: 10.20344/amp.5477
- Peterfy, C. G., Guermazi, A., Zaim, S., Tirman, P. F. J., Miaux, Y., White, D., Kothari, M., Lu, Y., Fye, K., Zhao, S., & Genant, H. K. (2004). Whole-organ magnetic resonance imaging score (WORMS) of the knee in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(3), 177–190. doi: 10.1016/j.joca.2003.11.003
- Poole, A. R., Nelson, F., Dahlberg, L., Tchetina, E., Kobayashi, M., Yasuda, T., Laverty, S., Squires, G., Kojima, T., Wu, W., & Billingham, R. C. (2003). Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochemical Society Symposium*, 23(70), 115–123. doi: 10.1042/bss0700115
- Poole, C. A. (1997). Articular cartilage chondrons: Form, function and failure. *Journal of Anatomy*, 191(1), 1–13. doi: 10.1017/S0021878297002185
- Pritzker, K. P. H., Gay, S., Jimenez, S. A., Ostergaard, K., Pelletier, J. P., Revell, K., Salter, D., & van den Berg, W. B. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(1), 13–29. doi: 10.1016/j.joca.2005.07.014
- Pullig, O., Weseloh, G., & Swoboda, B. (1999). Expression of type VI collagen in normal and osteoarthritic human cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 7(2), 191–202. doi: 10.1053/joca.1998.0208
- Quinn, T.M., Häuselmann, H.-J., Shintani, N., & Hunziker, E. B. (2013). Cell and matrix morphology in articular cartilage from adult human knee and ankle joints suggests depth-associated adaptations to biomechanical and anatomical roles. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(12), 1904–1912. doi: 10.1016/j.joca.2013.09.011
- Quinn, Thomas M., Hunziker, E. B., & Häuselmann, H. J. (2005). Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(8), 672–678. doi: 10.1016/j.joca.2005.04.011
- Ramalho, J., Semelka, R. C., Ramalho, M., Nunes, R. H., AlObaidy, M., & Castillo, M. (2016). Gadolinium-based contrast agent accumulation and toxicity: An update. *American Journal of Neuroradiology*, 37(7), 1192–1198. doi: 10.3174/ajnr.A4615

- Responde, D. J., Natoli, R. M., & Athanasiou, K. A. (2007). Collagens of articular cartilage: Structure, function, and importance in tissue engineering. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 35(5), 363–411. doi: 10.1615/CritRevBiomedEng.v35.i5.20
- Rhee, D. K., Marcelino, J., Baker, M., Gong, Y., Smits, P., Lefebvre, V., Jay, G. D., Stewart, M., Wang, H., Warman, M. L., & Carpten, J. D. (2005). The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *Journal of Clinical Investigation*, 115(3), 622–631. doi: 10.1172/JCI22263
- Richardson, W., Wilkinson, D., Wu, L., Petrigliano, F., Dunn, B., & Evseenko, D. (2015). Ensemble multivariate analysis to improve identification of articular cartilage disease in noisy Raman spectra. *Journal of Biophotonics*, 8(7), 555–566. doi: 10.1002/jbio.201300200
- Rocha, B., Ruiz-Romero, C., & Blanco, F. J. (2017). Mass spectrometry imaging: A novel technology in rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology*, 13(1), 52–63. doi: 10.1038/nrrheum.2016.184
- Roemer, F. W., Hunter, D. J., Winterstein, A., Li, L., Kim, Y. J., Cibere, J., Mamisch, T. C., & Guermazi, A. (2011). Hip Osteoarthritis MRI Scoring System (HOAMS): Reliability and associations with radiographic and clinical findings. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(8), 946–962. doi: 10.1016/j.joca.2011.04.003
- Ryabchikov, O., Guo, S., & Bocklitz, T. (2019). Analyzing Raman spectroscopic data. *Physical Sciences Reviews*, 4(2), 1–16. doi: 10.1515/psr-2017-0043
- Rýglová, Š., Braun, M., & Suchý, T. (2017). Collagen and Its Modifications-Crucial Aspects with Concern to Its Processing and Analysis. *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(6), 1600460. doi: 10.1002/mame.201600460
- Saarakkala, S., Julkunen, P., Kiviranta, P., Mäkitalo, J., Jurvelin, J. S., & Korhonen, R. K. (2010). Depth-wise progression of osteoarthritis in human articular cartilage: investigation of composition, structure and biomechanics. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(1), 73–81. doi: 10.1016/j.joca.2009.08.003
- Sarin, J. K., Te Moller, N. C. R., Mancini, I. A. D., Brommer, H., Visser, J., Malda, J., van Weeren, P. R., Afara, I. O., & Töyräs, J. (2018). Arthroscopic near infrared spectroscopy enables simultaneous quantitative evaluation of articular cartilage and subchondral bone in vivo. *Scientific Reports*, 8(1), 13409. doi: 10.1038/s41598-018-31670-5
- Shane Anderson, A., & Loeser, R. F. (2010). Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 24(1), 15–26. doi: 10.1016/j.berh.2009.08.006
- Silver, F. H., Bradica, G., & Tria, A. (2002). Elastic energy storage in human articular cartilage: estimation of the elastic modulus for type II collagen and changes associated with osteoarthritis. *Matrix Biology*, 21(2), 129–137. doi: 10.1016/S0945-053X(01)00195-0
- Socrates, G. (2005). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts* (3rd ed.). England, UK: John Wiley & Sons, LTD.
- Söder, S., Hambach, L., Lissner, R., Kirchner, T., & Aigner, T. (2002). Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular

- cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(6), 464–470. doi: 10.1053/joca.2002.0512
- Soellner, S. T., Goldmann, A., Muelheims, D., Welsch, G. H., & Pachowsky, M. L. (2017). Intraoperative validation of quantitative T2 mapping in patients with articular cartilage lesions of the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 25(11), 1841–1849. doi: 10.1016/j.joca.2017.07.021
- Takahashi, Y., Sugano, N., Takao, M., Sakai, T., Nishii, T., & Pezzotti, G. (2014). Raman spectroscopy investigation of load-assisted microstructural alterations in human knee cartilage: Preliminary study into diagnostic potential for osteoarthritis. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.02.014
- Taylor, A. M., Jenks, D. D., Kammath, V. D., Norman, B. P., Dillon, J. P., Gallagher, J. A., Ranganath, L. R., & Kerns, J. G. (2019). Raman Spectroscopy identifies differences in ochronotic and non-ochronotic cartilage; a potential novel technique for monitoring ochronosis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(8), 1244–1251. doi: 10.1016/j.joca.2019.04.012
- Temple-Wong, M. M., Bae, W. C., Chen, M. Q., Bugbee, W. D., Amiel, D., Coutts, R. D., Lotz, M., & Sah, R. L. (2009). Biomechanical, structural, and biochemical indices of degenerative and osteoarthritic deterioration of adult human articular cartilage of the femoral condyle. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(11), 1469–1476. doi: 10.1016/j.joca.2009.04.017
- Unal, M., Akkus, O., Sun, J., Cai, L., Erol, U. L., Sabri, L., & Neu, C. P. (2019). Raman spectroscopy-based water content is a negative predictor of articular human cartilage mechanical function. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(2), 304–313. doi: 10.1016/j.joca.2018.10.003
- Utsunomiya, H., Briggs, K. K., Dornan, G. J., Bolia, I. K., Locks, R., & Philippon, M. J. (2019). Predicting Severe Cartilage Damage in the Hip: A Model Using Patient-Specific Data From 2,396 Hip Arthroscopies. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 35(7), 2051–2060.e13. doi: 10.1016/j.arthro.2019.02.033
- Valdés, R., Stefanov, S., Chiussi, S., López-Alvarez, M., & González, P. (2014). Pilot research on the evaluation and detection of head and neck squamous cell carcinoma by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(7), 550–557. doi: 10.1002/jrs.4498
- Varady, N. H., & Grodzinsky, A. J. (2016). Osteoarthritis year in review 2015: mechanics. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(1), 27–35. doi: 10.1016/j.joca.2015.08.018
- Wang, D., Hamm, L. M., Bodnar, R. J., & Dove, P. M. (2012). Raman spectroscopic characterization of the magnesium content in amorphous calcium carbonates. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(4), 543–548. doi: 10.1002/jrs.3057
- Wells, T., Davidson, C., Mörgelin, M., Bird, J. L. E., Bayliss, M. T., & Dudhia, J. (2003). Age-related changes in the composition, the molecular stoichiometry and the stability of proteoglycan aggregates extracted from human articular cartilage. *Biochemical Journal*, 370(1), 69–79. doi: 10.1042/BJ20020968
- West, P. A., Bostrom, M. P. G., Torzilli, P. A., & Camacho, N. P. (2004). Fourier Transform Infrared Spectral Analysis of Degenerative Cartilage: An Infrared Fiber Optic Probe and Imaging Study. *Applied Spectroscopy*, 58(4), 376–381. doi: 10.1366/000370204773580194

- Yan, J., Qin, W., Xiao, B., Wan, Q., Tay, F. R., Niu, L., & Jiao, K. (2020). Pathological calcification in osteoarthritis: an outcome or a disease initiator? *Biological Reviews*, 9. doi: 10.1111/brv.12595
- Yuan, X. L., Meng, H. Y., Wang, Y. C., Peng, J., Guo, Q. Y., Wang, A. Y., & Lu, S. B. (2014). Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: Potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(8), 1077–1089. doi: 10.1016/j.joca.2014.05.023
- Zhang, J., Fan, Y., He, M., Ma, X., Song, Y., Liu, M., & Xu, J. (2017). Accuracy of Raman spectroscopy in differentiating brain tumor from normal brain tissue. *Oncotarget*, 8(22), 36824–36831. doi: 10.18632/oncotarget.15975
- Zhang, Z. (2015). Chondrons and the Pericellular Matrix of Chondrocytes. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 21(3), 267–277. doi: 10.1089/ten.teb.2014.0286