



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Cuantificación y distribución de IL 17A e IL 20 como marcadores pronóstico en pacientes con osteoartritis temprana de rodilla

María Alejandra Roa Bohórquez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2024

Cuantificación y distribución de IL 17A e IL 20 como marcadores pronóstico en pacientes con osteoartritis temprana de rodilla

María Alejandra Roa Bohórquez

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacología

Directora:

Angela Patricia Rojas Rojas MSc, PhD.

Profesora Asociada. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. Grupo Investigación: Biología Celular y Autoinmunidad

Codirector:

Federico Rondón Herrera, MD.

Especialista medicina Interna y Reumatología. Profesor Titular. Facultad de Medicina. Coordinador Unidad de Reumatología. Grupo Investigación Biología Celular y Autoinmunidad

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2024

Declaración de obra original


Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



María Alejandra Roa Bohórquez

*“In theory, theory and practice are the same.
In practice, they are not.”*

Albert Einstein.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por su infinito amor y bondad. A mi madre y mis hermanos por acompañarme con amor y ser inspiración en cada etapa de mi vida.

A la Profesora, Angela Patricia Rojas y al Doctor Federico Rondón por su dirección, su tiempo, motivación y por transmitirme sus conocimientos durante el desarrollo de este trabajo.

Al grupo de investigación de Biología celular y autoinmunidad; al grupo de investigación en Farmacogenética del cáncer por el apoyo que recibí durante la realización de los experimentos y a la Convocatoria para el fortalecimiento de alianzas interdisciplinarias de investigación y creación artística de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia 2018 que brindó la financiación para la realización del proyecto “*Evaluación de la producción de IL-17 e IL-20 en sinoviocitos de pacientes con osteoartrosis temprana de rodilla*”.

Resumen

La osteoartritis (OA) es la enfermedad articular más frecuente a nivel mundial y una de las principales enfermedades degenerativas que causan discapacidad. Su origen es multifactorial, siendo más habitual en la etapa de envejecimiento y en pacientes que padecen obesidad, por lo que constituyen dos aspectos que en la actualidad y a corto plazo se mantienen en aumento. La OA se diagnostica con una base clínica apoyada de la evaluación sintomática y de herramientas de imagen. Sin embargo, a pesar de su alta prevalencia suele diagnosticarse cuando el daño en la articulación es importante y no se obtiene una respuesta terapéutica satisfactoria con el tratamiento farmacológico establecido, conllevando a requerir intervenciones quirúrgicas que en la mayoría de los casos implican reemplazo articular para mejorar la calidad de vida del paciente en términos de alivio del dolor además de mantener la independencia en la realización de sus actividades diarias. Por esta razón, surge la necesidad de proponer alternativas que permitan establecer un pronóstico de la enfermedad en etapas tempranas, facilitando el inicio de un tratamiento oportuno cuando todavía no se ha extendido el daño en toda la articulación, al igual que monitorear la respuesta al tratamiento en función del tiempo tomando como base dos características importantes de la OA que corresponden a la degeneración del cartílago y al proceso inflamatorio subyacente que promueven su cronicidad e involucra la secreción de diferentes citoquinas proinflamatorias en el microambiente sinovial dentro de las cuales están interleuquina 17A (IL-17A) e interleuquina 20 (IL-20), las cuales son componentes proinflamatorios del sistema inmune que participan en la comunicación intercelular y desempeñan funciones específicas según el sistema y proceso orgánico en el que estén implicadas. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el componente inflamatorio relacionado con los niveles de IL-17A e IL-20 mediante la estandarización de cultivos de sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS) y de células mesenquimales (MSC) a partir de muestras de tejido sinovial provenientes de pacientes con OA temprana de rodilla. Posteriormente, se evaluó la localización y distribución de IL-17A e IL-20 por técnica de microscopía de fluorescencia y luego se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de IL-17A e IL-20 en sobrenadantes de cultivo de FLS y MSC. En conjunto, los resultados presentados demuestran mediante técnicas de microscopía y de inmunoensayo que las células FLS y MSC son componentes que ejercen un rol importante en el proceso inflamatorio generado en la OA temprana de rodilla, pues se evidenció la producción de IL-17A e IL-20 en FLS y MSC en respuesta al estímulo inflamatorio inducido con TNF- α comparado con células control de acuerdo con las diferencias en la intensidad media de fluorescencia; la distribución de IL-17A, IL-20 y de CD-90 mediante microscopía de fluorescencia se observó a nivel citoplasmático y perinuclear evidenciando una variación en la intensidad de fluorescencia en las que contenían el anticuerpo de interés.

Respecto a la cuantificación por técnica ELISA se obtuvo una concentración promedio de 0,0850 pg/mL para IL-17A; y de 0,0157 pg/mL para IL-20. A partir de los resultados con la prueba ELISA no se identificaron diferencias entre los niveles de las muestras evaluadas con o sin estímulo de TNF- α , en tanto, la intensidad de producción a nivel intracelular de IL-17A e IL-20 por técnica de microscopía de fluorescencia permitieron evidenciar la presencia de estas citoquinas en un ambiente inflamatorio, así que considerando la participación de IL-17A e IL-20 durante la etapa temprana de la OA, podrían ser marcadores de apoyo pronóstico cuyos niveles son indicativo de la inflamación de bajo grado de la articulación. Estudios posteriores que contemplen un mayor número de pacientes serían necesarios para establecer su utilidad.

Palabras clave: Osteoartritis; Inflamación; sinoviocitos; Células Mesenquimales; Biomarcador; Interleuquina-17A; Interleuquina-20.

Abstract

Quantification and distribution of IL 17A and IL 20 as prognostic markers in patients with early knee osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease worldwide and one of the main degenerative diseases that cause disability. Its origin is multifactorial, being more common in the aging stage and in patients who suffer from obesity, which is why they constitute two aspects that currently and in the short term continue to increase. OA is diagnosed on a clinical basis supported by symptomatic evaluation and imaging tools. However, despite its high prevalence, it is usually diagnosed when the damage to the joint is significant and a satisfactory therapeutic response is not obtained with the established pharmacological treatment, leading to the need for surgical interventions that in most cases involve joint replacement to improve the patient's quality of life in terms of pain relief as well as maintaining independence in carrying out daily activities. For this reason, the need arises to propose alternatives that allow establishing a prognosis of the disease in early stages, facilitating the start of timely treatment when the damage has not yet spread throughout the joint, as well as monitoring the response to treatment as a function of time based on two important characteristics of OA that correspond to the degeneration of the cartilage and the underlying inflammatory process that promote its chronicity and involves the secretion of different proinflammatory cytokines in the synovial microenvironment within which are interleukin 17A (IL-17A) and interleukin 20 (IL-20), which are pro-inflammatory components of the immune system that participate in intercellular communication and perform specific functions depending on the system and organic process in which they are involved. In accordance with the above, the objective of this work was to determine the inflammatory component related to the levels of IL-17A and IL-20 by standardizing cultures of fibroblast-like synoviocytes (FLS) and mesenchymal cells (MSC) from synovial tissue samples from patients with early knee OA. Subsequently, the localization and distribution of IL-17A and IL-20 was evaluated by fluorescence microscopy technique and then quantification of the levels of IL-17A and IL-20 in FLS and MSC culture supernatants was carried out. Altogether, the results presented demonstrate through microscopy and immunoassay techniques that FLS and MSC cells are components that play an important role in the inflammatory process generated in early knee OA, since the production of IL-17A and IL-20 in FLS and MSC in response to the inflammatory stimulus induced with TNF- α compared to control cells according to the differences in the mean fluorescence intensity; the distribution of IL-17A, IL-20 and CD-90 by microscopy Fluorescence was observed at the cytoplasmic and perinuclear level, evidencing

a variation in the fluorescence intensity in those that contained the antibody of interest. Regarding the quantification by ELISA technique, an average concentration of 0.0850 pg/mL was obtained for IL-17A; and 0.0157 pg/mL for IL-20 from the results with the ELISA test, no differences were identified between the levels of the samples evaluated with or without TNF- α stimulation, meanwhile, the intensity of production at intracellular level of IL-17A and IL-20 by fluorescence microscopy technique allowed us to demonstrate the presence of these cytokines in an inflammatory environment, so considering the participation of IL-17A and IL-20 during the early stage of OA, they could be prognostic supportive markers whose levels are indicative of low-grade inflammation of the joint. Subsequent studies that include a larger number of patients would be necessary to establish its usefulness.

Keywords: Osteoarthritis; Inflammation; Synoviocytes; Mesenchymal Cells; Biomarker; Interleukin-17A; Interleukin-20.

Contenido

Lista de figuras	11
Lista de gráficas	13
Lista de Símbolos y abreviaturas	14
Introducción	15
Planteamiento del problema	16
Justificación	17
Hipótesis	20
Marco teórico	21
Características de la membrana sinovial en osteoartritis	21
Citoquinas inflamatorias en Osteoartritis.....	23
Células mesenquimales en tejido sinovial.....	26
Objetivos	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos	28
Metodología	29
Población de estudio.....	29
Tamaño de muestra.....	29
Criterios de inclusión.....	29
Criterios de exclusión.....	30
Selección de pacientes	30
Aspectos éticos, ambientales y legales.....	32
Cultivos de Sinoviocitos similares a fibroblastos y células mesenquimales de tejido sinovial	33
Microscopía de fluorescencia.....	35
Cuantificación de IL-17A mediante técnica ELISA	36
Cuantificación de IL-20 mediante Test ELISA.....	37
Análisis estadístico	38
Resultados y Discusión	39
Estandarización de cultivos primarios de sinoviocitos	39
Microscopía de fluorescencia.....	50
Cuantificación de IL-17A e IL-20 por Test ELISA.....	60
Conclusiones	64
Recomendaciones	66
Prospectiva	67
Bibliografía	68
Anexos	77

Lista de figuras

Figura 1. Arquitectura de la articulación sinovial..	22
Figura 2. Funciones efectoras de las células Th-17 a nivel de los procesos patológicos en la artritis.....	24
Figura 3. Vía de JAK-STAT y su participación en la inflamación.	25
Figura 4. Biología de la forma TNF- α transmembrana y TNF- α soluble.....	25
Figura 5. Aspecto macroscópico de la biopsia de tejido sinovial.	40
Figura 6. Aspecto microscópico de la biopsia sinovial procesada.	41
Figura 7. Aspecto microscópico de la migración de células desde el explante hacia la placa de cultivo.....	43
Figura 8. Micrografías de FLS a partir de biopsia sinovial de paciente con AR temprana de rodilla	44
Figura 9. Micrografías en placa de cultivo de células FLS y MSC a partir de biopsia sinovial de paciente con OA temprana de rodilla.	46
Figura 10. Seguimiento cronológico del crecimiento en cultivo de células MSC a partir de biopsia sinovial de paciente con OA temprana de rodilla.	47
Figura 11. (A-B) Adipocitos esféricos maduros compuestos por gotas lipídicas.	48
Figura 12. Microscopía de luz de células FLS en pacientes con OA temprana de rodilla y de fibroblastos piel de individuo sano.....	49
Figura 13. Estímulo de TNF- α a diferentes concentraciones en células MSC provenientes de pacientes con OA temprana de rodilla.	50
Figura 14. Microscopía de Fibroblastos de piel provenientes de biopsia de individuo sano para la evaluación constitutiva de CD-90.	51
Figura 15. Microscopía de FLS provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla.	53
Figura 16. Microscopía de MSC provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla estímulo de TNF-Alfa de 24 horas	54
Figura 17. Microscopía de MSC provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla con estímulo de TNF-Alfa de 72 horas	55
Figura 18. Microscopía de fluorescencia confocal de FLS provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla.	56
Figura 19. Controles negativos de fluorescencia en FLS provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla.	57
Figura 20. Controles negativos de fluorescencia en MSC provenientes de biopsia de paciente con OA temprana de rodilla.	58

Lista de gráficas

Gráfica 1. Intensidad Media de fluorescencia *Mean Gray Value* para células MSC y FLS

Gráfica 2. Curva patrón estándar para IL-17A

Gráfica 3. Curva patrón estándar para IL-20

Gráfica 4. Concentraciones de IL-17A obtenidas en Sobrenadantes de cultivo de MSC y FLS.

NA: Sin estímulo de TNF- α ; A: Estímulo con TNF- α

Gráfica 5. Concentraciones de IL-20 obtenidas en sobrenadantes de cultivo de MSC y FLS.

NA: Sin estímulo de TNF- α ; A: Estímulo con TNF- α

Gráfica 6. Estandarización de la concentración de TNF- α

Gráfica 7. Concentración de IL-17A e IL-20 en líquido sinovial

Lista de Símbolos y abreviaturas

AR	Artritis reumatoide
CD-90	Cluster de diferenciación 90
DIC	Differential Interference Contrast Microscopy (Contraste de interferencia diferencial).
FLS	Fibroblast like synoviocytes
FITC	Fluorescein IsoTioCyanate
IFP	Infrapatellar fat pad (Almohadilla Grasa de Infrapatelar)
IL-17A	Interleuquina-17A
IL-20	Interleuquina-20
IL-1 β	Interleuquina-1 β
IL-6	Interleuquina-6
IL-23	Interleuquina-23
JAK-STAT	Janus quinasa - Vía del activador de la transcripción
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MS	Membrana Sinovial
MSC	Mesenchymal Stem Cell
OA	Osteoartritis
PBS	Phosphate Buffer Saline
RANKL	Receptor activador del factor nuclear kappa B
SBF	Suero Bovino Fetal
TNF- α	Tumoral Necrosis Factor- Alpha (Factor de necrosis tumoral alfa).

Introducción

La osteoartritis (OA) es una enfermedad crónica propiciada por múltiples factores tales como la obesidad y el envejecimiento, la cual afecta las articulaciones de las manos, cadera, hombros y rodillas y ocurre en mayor medida en aquellas articulaciones que soportan peso correspondientes a la cadera, tobillos y rodillas provocando degeneración del cartílago y cambios a nivel histológico, estructural, bioquímico y fisiológico alrededor del hueso conllevando a alteraciones en la estructura articular y a síntomas tales como dolor, rigidez, sensibilidad y pérdida de la movilidad cuya intensidad suele aumentar conforme avanza el curso de la enfermedad. Estas características son restricciones funcionales que conllevan a una discapacidad progresiva atribuida a las fallas mecánicas subyacentes en los pacientes que la padecen al igual que al impacto ocasionado por el dolor el cual dificulta la movilidad, afecta el estado anímico y limita la realización de actividades físicas [1].

Un aspecto importante para realizar un tratamiento óptimo de la OA radica en la identificación y pronóstico oportunos. Sin embargo, no se suelen realizar de forma temprana dado que generalmente se logra diagnosticar en un estadio avanzado de la enfermedad debido a que el nivel de inflamación es de bajo grado, de lenta progresión y a que su diagnóstico se apoya en la evaluación radiográfica la cual en muchas ocasiones no muestra los cambios estructurales y a nivel de cartílago, además puede que no se evidencie el estrechamiento del espacio articular; dicha evaluación se complementa con la descripción sintomática y por lo tanto no siempre se obtienen hallazgos que sugieran el daño articular en curso.

Actualmente, la prevalencia de la OA se mantiene en aumento, ya que hasta la fecha no se cuenta con herramientas que permitan establecer un pronóstico de la enfermedad en estadios tempranos así que surge la necesidad de comprender los procesos biológicos y fisiopatológicos que desencadenan la OA y que permitan establecer elementos clave para su pronóstico, diagnóstico y tratamiento, esto incluye aspectos tales como la identificación de daños en el cartílago, cambios en el microambiente sinovial y el componente inflamatorio.

El componente inflamatorio en la OA implica la presencia de citoquinas, dentro de las que se destacan Interleuquina 17A (IL-17A) e Interleuquina 20 (IL-20) que son citoquinas fundamentales en la patogénesis y progresión de la OA ya que orquestan cambios de tipo catabólico que favorecen el cuadro inflamatorio, la degradación del cartílago articular al igual que daños locales a nivel tisular.

Planteamiento del problema

La osteoartritis (OA) es una de las formas más comunes de artritis y la enfermedad musculoesquelética más frecuente para la cual en la actualidad se busca ampliar el estudio y comprensión acerca de su patogénesis y progresión ya que representa desafíos en cuanto a establecer su pronóstico y diagnóstico especialmente cuando los pacientes que la padecen se encuentran en estadios tempranos.

Para el contexto colombiano, según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), la población de la tercera edad en el año 2006 representaba un 9% de la población general y en el año 2021 incrementó a un estimado del 13,9% del total de la población colombiana, lo cual se traduce en un aumento en la probabilidad de padecer enfermedades crónicas tales como la obesidad que junto con el proceso de envejecimiento son factores de riesgo para padecer OA al igual que desarrollar otras deficiencias físicas, dado que es una afección más frecuente entre las personas mayores y con sobrepeso [2].

No obstante, su inicio también se ha venido determinando en pacientes jóvenes menores de 40 años, por lo que no es exclusiva en pacientes de la tercera edad como se ha considerado tradicionalmente. Se espera entonces que con los cambios en la pirámide poblacional que conlleva un aumento en la proporción de la población de la tercera edad y/o en condición de sobrepeso incremente a su vez la prevalencia de la OA y, por lo tanto, se requiere proponer nuevos métodos que contribuyan al establecimiento del diagnóstico y pronóstico oportunos, ya que en Colombia la demanda de los servicios sanitarios es cada vez mayor [3].

El diagnóstico de la OA se basa en los síntomas, signos físicos, manifestaciones radiográficas y pruebas de laboratorio, pero en ocasiones con estas pruebas no se obtienen resultados fuera del rango normal que sean posibles indicadores de enfermedad, así que abordar el componente inflamatorio que hace parte de la patogénesis y el desarrollo de la OA mediante la monitorización de los niveles de IL-17A e IL-20 resulta ser un enfoque que podría contribuir a determinar el pronóstico de la enfermedad [4].

Justificación

Actualmente, la identificación de pacientes con riesgo de progresión en el padecimiento de OA es compleja, pues en ocasiones los hallazgos radiográficos y otros elementos que hacen parte de la evaluación clínica no reflejan anomalías presentes en el cartílago y el hueso lo cual impide establecer un pronóstico de la OA de manera rutinaria e impide monitorear los cambios generados por la enfermedad en función del tiempo. Por lo tanto, en la actualidad se han propuesto otras herramientas emergentes tales como los marcadores bioquímicos que contribuyen al establecimiento del pronóstico de la OA temprana de rodilla y permiten conocer la progresión de la OA en el tiempo.

Los biomarcadores son parámetros que permiten determinar el pronóstico de una enfermedad ya que hacen posible establecer mediciones relacionadas con su progresión, monitorear los efectos y respuesta al tratamiento farmacológico asignado. En el contexto de las enfermedades reumáticas, los biomarcadores pueden ser de varios tipos, como por ejemplo marcadores genéticos, productos de la expresión génica, anticuerpos, citoquinas o anomalías tisulares o celulares que pueden ser identificadas mediante diferentes técnicas dentro de las cuales se encuentran la inmunohistoquímica y los cultivos celulares que se pueden llevar a cabo a partir de la biopsia sinovial [5].

Los biomarcadores en la OA son moléculas que participan en el ciclo fisiológico de la matriz del tejido conjuntivo las cuales pueden estar relacionadas con cambios de tipo catabólico o anabólico que favorecen la inflamación a través de la activación o alteración de distintas rutas biológicas [5].

Uno de los objetivos más importantes de la medición de biomarcadores es identificar daños a nivel del cartílago durante las primeras etapas de la enfermedad cuando aún no se han evidenciado por ejemplo mediante técnicas de imagen, pues cuando se detecta la degeneración a nivel articular frecuentemente la OA se encuentra en estadios avanzados, por lo tanto la evaluación de biomarcadores podría contribuir a la caracterización predictiva y/o pronóstica a lo largo de las distintas etapas de la enfermedad. Además del reconocimiento temprano, el seguimiento de la actividad, la determinación de la gravedad, la predicción del pronóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento instaurado que también constituyen otros propósitos los cuales resaltan la importancia de la medición de biomarcadores [6].

Los biomarcadores que permiten conocer el grado de inflamación de la OA pueden utilizarse para identificar la velocidad de progresión de la enfermedad, tal es el caso de las citoquinas proinflamatorias en las cuales se ha observado niveles aumentados en pacientes que padecen OA, dentro de las cuales sobresalen IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17A e IL-20, ya que debido al aumento en la permeabilidad de la membrana sinovial, son mediadores de inflamación importantes que favorecen tanto el inicio como la perpetuación de la OA. De esta manera la evaluación de biomarcadores contribuye a la predicción del inicio temprano, al manejo de la carga de la enfermedad y permiten determinar el pronóstico de la OA acelerando así el establecimiento de estrategias farmacoterapéuticas adaptadas al nivel de gravedad de la enfermedad [5].

El linaje de *células T helper 17* (Th17) es un subconjunto de células T efectoras de memoria que están implicadas en la inducción de la inflamación y la destrucción de los tejidos. Las células Th17 han sido consideradas células patogénicas que ejercen un papel fundamental en trastornos inflamatorios crónicos, las cuales producen de forma preferencial interleuquinas que participan en la respuesta inflamatoria crónica y el daño tisular en las articulaciones afectadas por la artritis, dentro de las cuales se encuentran IL-17, IL-21 e IL-22, junto con IL-23 que corresponde a una citoquina proinflamatoria involucrada en la diferenciación y activación de las células Th17 para la producción de IL-17 [7].

La producción de IL-17 afecta la diferenciación de los osteoclastos al inducir la expresión del ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa-B (*RANKL*) en la superficie de los osteoblastos y FLS, los cuales contribuyen al desarrollo y la progresión de enfermedades reumáticas [7].

IL-17A influye en la respuesta inflamatoria crónica y el daño tisular en las articulaciones afectadas por la OA que de acuerdo con lo reportado en literatura, se han encontrado niveles elevados de IL-17A en el líquido sinovial de pacientes con OA los cuales se correlacionan positivamente con la gravedad de la enfermedad, dado que una de sus funciones es estimular FLS y condrocitos en la OA para promover la producción y secreción de citoquinas, estimular la producción de diversos factores que causan la destrucción del cartílago como por ejemplo metaloproteinasas de matriz (MMPs) y promover la infiltración sinovial. Así pues, los niveles elevados de IL-17A en pacientes con OA de rodilla se asocian con un aumento en la duración de la enfermedad [7].

Otra de las interleuquinas de importancia en la OA es interleuquina-20 (IL-20), un miembro de la familia de citoquinas IL-10 que intermedia la señalización intracelular, la cual se encuentra involucrada en el proceso patológico de enfermedades inflamatorias crónicas ya que induce inflamación, angiogénesis, quimiotaxis y apoptosis, y por ende favorece la

patogénesis de la artritis, pues en condiciones de homeostasis los fibroblastos FLS se mantienen quiescentes pero son activados y adquieren un fenotipo agresivo dentro del cuadro de inflamación que hace parte de la OA y de esta manera se convierten en células diana de IL-17A e IL-20 durante la patogénesis de las enfermedades articulares. Esto sugiere que IL-17A e IL-20 en conjunto con otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α , podrían ejercer un efecto sinérgico en la respuesta inflamatoria inicial y conllevar a la progresión del daño del cartílago y a la destrucción ósea en la patogénesis de la OA.

Hipótesis

La producción de IL-17A e IL-20 por FLS y MSC de tejido sinovial, es un indicador del componente inflamatorio en pacientes diagnosticados con OA temprana de rodilla.

Marco teórico

La osteoartritis se deriva de la palabra griega osteo- cuyo significado es “hueso”, artritis: *arthr-* que significa “articulación” y el sufijo *-itis* que implica la presencia de inflamación [8]. La OA es la forma más común de artritis que afecta principalmente las articulaciones que soportan peso, una de estas corresponde a la rodilla provocando degeneración del cartílago y cambios alrededor del hueso que a su vez conlleva a alteraciones en toda la estructura articular e implica síntomas tales como dolor, rigidez e inflamación de las articulaciones, estas características son restricciones funcionales que conllevan a una discapacidad progresiva. Así también, su identificación y pronóstico generalmente se realiza en un estadio avanzado de la enfermedad debido a que su lenta progresión e inflamación de bajo grado dificultan establecer su diagnóstico apoyado en la descripción sintomática y evaluación radiográfica [9].

Hoy en día existen varios tratamientos disponibles para la OA enfocados en el efecto analgésico, antiinflamatorio, en la corrección de las deformidades que puedan surgir y en la protección de la función articular para mejorar la calidad de vida de los pacientes con OA. Las medidas consisten en una combinación de tratamientos farmacológicos, no farmacológicos y en ciertos casos intervenciones quirúrgicas que son necesarias cuando la estrategia terapéutica establecida es fallida o insuficiente aun cuando el régimen terapéutico se elige de acuerdo con la edad, sexo, peso corporal, factores de riesgo, población, gravedad de la lesión y expectativas del tratamiento. Sin embargo, hasta la fecha no se cuenta con una cura definitiva para la OA [10].

Características de la membrana sinovial en osteoartritis

La membrana sinovial (MS) es un tejido mesenquimatoso especializado que recubre los espacios de las articulaciones diartrodiales, bursas y las vainas de los tendones que son componentes que poseen huesos, tejido blando y líquido sinovial como se representa en la Figura 1. la cual incluye dos capas la capa íntima, compuesta por una o dos láminas de macrófagos o sinoviocitos tipo A y sinoviocitos tipo B FLS “*Fibroblast-like synoviocytes*”, y la capa subíntima, compuesta por dos o tres capas de sinoviocitos dispuestos sobre el tejido conectivo, que secretan colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular, con escasos macrófagos y linfocitos, células adiposas y vasos sanguíneos, que proporcionan nutrientes al medio sinovial [11,12].

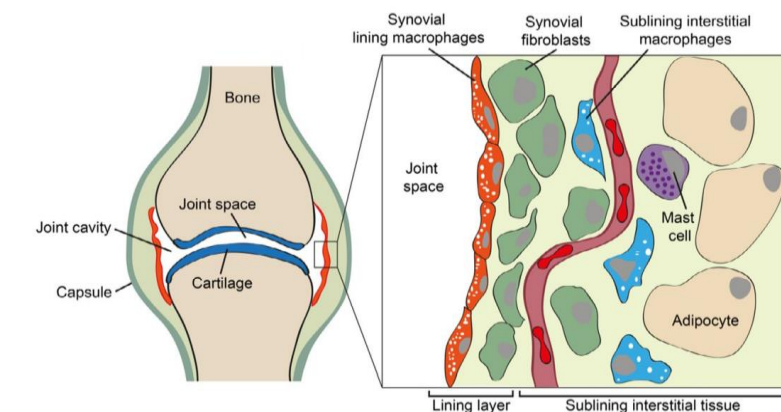


Figura 1. Arquitectura de la articulación sinovial. Tomado de Culemann et al., 2019 [13].

Una de las funciones que ejerce la MS es la producción de líquido sinovial que está compuesto por proteínas plasmáticas, azúcares, lípidos, moléculas lubricantes, factores de crecimiento y citoquinas que constituyen componentes clave para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades reumáticas ya que, en condiciones patológicas inflamatorias, la MS al estar asociada a la invasión del tejido óseo y del cartílago articular provoca la destrucción del cartílago. Una de estas patologías corresponde a la OA pues sus alteraciones están asociadas con daños a nivel de la MS [13].

Uno de los componentes sinoviales de importancia presentes en la articulación corresponde a los sinoviocitos similares a fibroblastos (también conocidos como fibroblastos sinoviales o sinoviocitos tipo B) las células FLS son mediadoras de la patología y del proceso de inflamación de los órganos diana en enfermedades inflamatorias crónicas, están ubicadas en el revestimiento de la capa íntima sinovial y ejercen funciones estructurales en las articulaciones al controlar la composición del líquido sinovial y la matriz extracelular del revestimiento de la articulación. Sin embargo, en diferentes tipos de artritis, estas células muestran un comportamiento patógeno al adquirir un fenotipo invasivo y agresivo que exagera los efectos de la enfermedad tanto al inicio, propagación y prolongación de la inflamación [14].

La fisiopatología específica de la OA no está totalmente dilucidada; uno de los componentes es la inflamación sinovial que influye en los síntomas y los daños estructurales a lo largo de la enfermedad, se ha evidenciado que los mediadores inflamatorios desempeñan un papel fundamental en el inicio y progresión de la OA en las articulaciones afectadas debido a que la inducción de mediadores proinflamatorios en el cartílago, la MS y el hueso subcondral tienen vías de señalización que están interrelacionadas y por lo tanto, los compuestos que regulan la síntesis y/o la actividad de las citoquinas y las moléculas proteolíticas dentro de las que sobresalen IL-17A e IL-20 hacen parte de los tratamientos emergentes que actúan a

través de las vías de señalización que regulan la inflamación y por lo tanto se consideran también dianas de interés para futuros tratamientos de la OA.

Los mediadores inflamatorios, como las citoquinas y quimioquinas se producen a nivel sinovial en la OA y promueven la sinovitis que en algunos casos ocurre desde las primeras etapas de la OA y durante la progresión de la enfermedad. De acuerdo con esto, se plantea que las células sinoviales producen mediadores inflamatorios, activan los condrocitos y favorecen la degradación del cartílago, que en conjunto con la sinovitis son aspectos que se correlacionan con la gravedad de los síntomas y la tasa de degeneración del cartílago [15].

Citoquinas inflamatorias en Osteoartritis

En el sistema inmunitario, las citoquinas se definen como proteínas inmunomoduladoras, que corresponden a moléculas de señalización importantes que coordinan la respuesta inmune al mediar la comunicación entre células incluidas las células epiteliales y fibroblastos a través de sus receptores específicos [16]. Las citoquinas facilitan la inducción de cascadas de inflamación estimulando la expresión de genes que codifican la síntesis de moléculas mediadoras inflamatorias [17]. Para el caso de las enfermedades reumáticas, hay un desequilibrio en la regulación de las citoquinas debido a una producción insuficiente de citoquinas antiinflamatorias y una producción excesiva de citoquinas proinflamatorias que en conjunto desencadenan un estado inflamatorio. La producción de estas interleuquinas se da *según sea necesario* durante la respuesta inmune y su perfil de secreción cambia en el microambiente sinovial en función de la progresión de la enfermedad [18].

Actualmente, las principales citoquinas implicadas en la OA son IL-1 β , TNF- α , IL-6, al igual que IL-17A e IL-20 catalogadas como citoquinas que promueven la inflamación a través de la activación de rutas catabólicas mediadas por la familia de proteínas del *factor nuclear kappaB* (NF- κ B), por lo que los niveles de IL-17A e IL-20 podrían ser potenciales marcadores en el pronóstico de la enfermedad [19]. Estas citoquinas proinflamatorias estimulan a su vez la liberación de otros mediadores inflamatorios durante la patogénesis de la OA favoreciendo la destrucción y degradación del cartílago articular, así que un posible enfoque farmacoterapéutico de la OA consiste en monitorear o bloquear estas citoquinas proinflamatorias empleando estrategias dirigidas hacia las vías de señalización inflamatorias de la OA con el objetivo de mantener un equilibrio dinámico metabólico [20].

IL-17 está constituida por una familia de seis miembros (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F) con un rango de peso molecular entre 20 a 35 kDa. Estructuralmente la familia IL-17 tienen un extremo C conservado con cuatro residuos de cisteína, que forman puentes

disulfuro a nivel intramolecular [21,22]. IL-17A es una glicoproteína de 155 aminoácidos con un peso molecular de 35 kDa, la cual ejerce funciones dicotómicas que consisten en efectos protectores y destructivos debido a que el receptor de IL-17A tiene la capacidad de transformar una respuesta inflamatoria aguda local con potencial protector en un efecto destructivo que favorece la enfermedad y su cronicidad; dichas respuestas proinflamatorias varían dependiendo el tipo celular y las condiciones patológicas [19,23].

En el contexto de la OA, la producción de IL-17A contribuye a la destrucción de la articulación al inducir y perpetuar la inflamación, conllevando a la erosión ósea y daños a nivel del cartílago; por lo tanto en pacientes con OA de rodilla se ha establecido una asociación positiva entre los niveles de IL-17A y la gravedad de la OA de rodilla debido a la capacidad de estimular la expresión de genes asociados con la inflamación que contribuye a la patogénesis de enfermedades autoinmunes e inflamatorias [24].

IL-17A tiene un papel efector importante en las células T-helper (Th)-17 ya que interactúa con el receptor IL-17RA a través del cual media la degradación articular en diferentes tipos de artritis, incluyendo AR y OA, así que el bloqueo de IL-17A protege de los efectos relacionados durante las etapas tempranas y las etapas tardías de enfermedades inflamatorias crónicas dado que IL-17A actúa localmente sobre FLS y osteoblastos contribuyendo a la sinovitis [24,25].

A nivel sinovial IL-17 se asocia con la actividad de la artritis al inducir MMPs en células FLS lo cual promueve la destrucción del cartílago (Figura 2). Además, se ha demostrado que IL-17 induce la liberación de quimiocinas tales como IL-1 β y TNF- α que consisten en moléculas que regulan las respuestas inflamatorias a través de células especializadas a nivel sinovial [25].

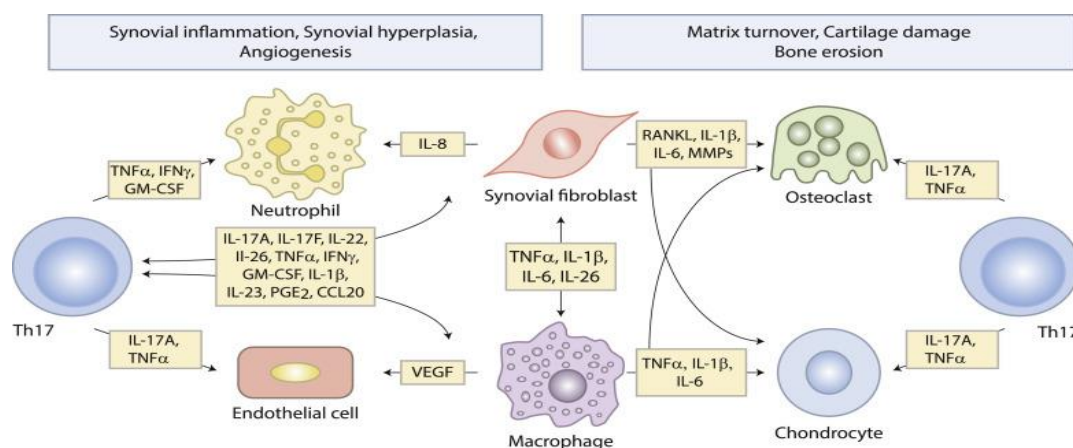


Figura 2. Funciones efectoras de las células Th-17 a nivel de los procesos patológicos en la artritis. Tomado de: Van Hamburg & Tas, 2018 [26].

Interleuquina 20 (IL-20) Es una citoquina de hélice α con un peso molecular de 17 kDa la cual ejerce sus efectos biológicos a través de dos complejos receptores. El primer complejo receptor está compuesto por 2 subunidades IL-20R1 e IL-20R2 y un segundo complejo igualmente con 2 subunidades IL-22R1 e IL-20R2. La unión de IL-20 a sus respectivos complejos receptores, desencadena una actividad proinflamatoria elevada en diferentes tipos celulares incluidas las células FLS [27].

Posterior a la unión de IL-20 a sus receptores, como se representa en la Figura 3. ocurre la activación de la vía de señalización mediante el transductor de señales *Janus quinasa* y la vía del activador de la transcripción (*JAK-STAT*).

Luego de que las proteínas *JAK* fosforilan el receptor, éste puede actuar como sitio de unión para *STAT* que al activarse se dimerizan y se traslada al núcleo, estando allí actúa como un factor de transcripción que es capaz de inducir la expresión de varios mediadores inflamatorios [28].

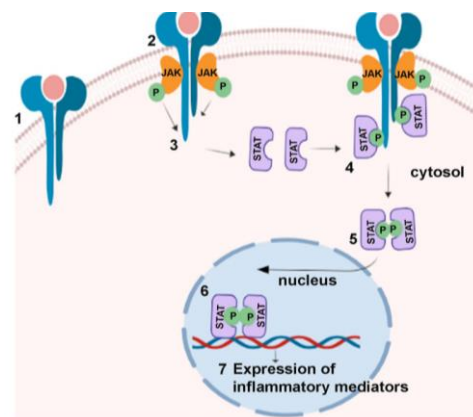


Figura 3. Vía de JAK-STAT y su participación en la inflamación.
Tomado de: George, Shyni, & Raghu, 2020 [28].

IL-20 está asociada con características de desarrollo y patogénesis de diversas enfermedades al promover la inflamación, angiogénesis, quimiotaxis y apoptosis; en el caso de la patogénesis de la OA se ve implicada al actuar sobre las células FLS y células endoteliales [28].

En la cascada de regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias a nivel del tejido sinovial participa el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$), una proteína mediadora de las respuestas inflamatorias, cuya forma precursora es $\text{TNF}\alpha$ transmembrana con un peso molecular de 26 kDa y la forma $\text{TNF}\alpha$ soluble (17 kDa), las dos formas tienen la capacidad de ejercer sus efectos biológicos tras unirse a dos receptores específicos de superficie celular: TNFR1 y TNFR2 como se observa en la Figura 4.

Dichos efectos son pleiotrópicos ya que pueden afectar el crecimiento, diferenciación y metabolismo de todos los tipos de células que contienen núcleo en el cuerpo [29].

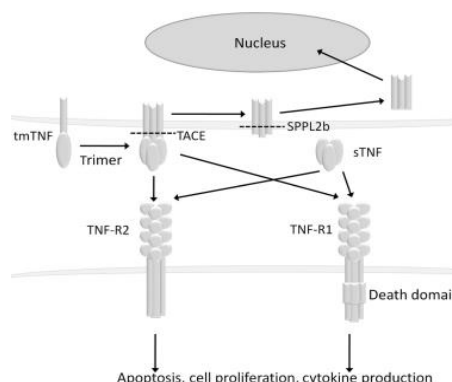


Figura 4. Biología de la forma TNF- α transmembrana y TNF- α soluble.

Tomado de:
(Horiuchi et al., 2010) [29]

Para el caso de la OA, TNF α favorece la destrucción articular, la formación de pannus, la activación de células endoteliales, la amplificación de quimiocinas al igual que la inducción del dolor [30,31].

En pacientes con OA, TNF- α se produce a nivel sinovial a través de la vía de señalización ERK (*proteína quinasa activada por mitógeno*) que determina el mecanismo por el cual diferentes citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-17A e IL-20 participan en las enfermedades reumáticas generando efectos proinflamatorios sobre las células FLS durante la patogénesis de la OA [32].

Células mesenquimales en tejido sinovial

Las células madre mesenquimales (MSC) están presentes en varios tipos de tejidos adultos y son precursoras del linaje mesodérmico de células/tejidos, que incluyen hueso, cartílago, grasa y tejidos conectivos. Pueden ser aisladas de la médula ósea, el tejido adiposo, el tejido/sangre del cordón umbilical, el periostio y en el ambiente sinovial pueden obtenerse a partir de la grasa infrapatelar y del tejido adiposo que se encuentra a nivel local [33,34].

En condiciones de obesidad la proporción del tejido adiposo aumenta, y de acuerdo con diferentes investigaciones se ha propuesto una relación entre el tejido adiposo y la OA de rodilla dado que en individuos obesos existe un mayor riesgo de desarrollo y progresión de la OA debido a la carga excesiva sobre las articulaciones y el cartílago pues un aumento en la carga genera estrés mecánico, además la masa de tejido adiposo ejerce modificaciones a nivel sinovial al estimular la producción de citoquinas proinflamatorias, que sobrepasa las capacidades biológicas normales provocando daños al cartílago e inflamación durante las etapas iniciales y el desarrollo de la OA de rodilla [35].

El aumento en la carga mecánica a nivel de la articulación de la rodilla contribuye a la activación de cascadas de señalización intracelular de citoquinas, factores de crecimiento y MMPs, dado que el tejido adiposo por sí mismo tiene la capacidad de generar un estado inflamatorio cuyos mecanismos metabólicos favorecen la producción de citoquinas inflamatorias dentro de las que se encuentran IL-17A, IL-20 y TNF- α que ocasionan efectos nocivos a lo largo de las diferentes etapas de la OA, esto explica en parte por qué las articulaciones que no soportan carga tales como las articulaciones de los dedos de las manos se ven afectadas por el proceso inflamatorio demostrando formas erosivas propias y fenotipos específicos como por ejemplo, la OA erosiva de manos expresada en los nódulos de *Heberden* y *Bouchard* [36,37].

Uno de los componentes adiposos de la rodilla es la grasa Infrapatelar o también denominada Almohadilla Grasa de Hoffa (IFP) la cual ejerce diferentes funciones protectoras que consisten en brindar estabilidad biomecánica a la articulación, responder al entorno inflamatorio local y ser fuente de células MSC con potencial de capacidad de diferenciación especialmente condrogénico considerando su tejido de origen [38,39].

En condiciones patológicas el entorno celular puede experimentar cambios fenotípicos debidos a la inflamación y la sobreestimulación mecánica lo cual favorece la aparición de la OA y en este escenario, la IFP podría ejercer funciones destructivas debido a su relación con la estabilidad mecánica, pues en sobrepeso la IFP sufre modificaciones en su composición y funcionamiento lo cual podría desencadenar lesiones articulares y favorecer el cuadro inflamatorio de la OA debido a la secreción de citoquinas que se producen en el microambiente sinovial [40].

Objetivos

Objetivo general

Determinar el componente inflamatorio relacionado con los niveles de IL 17A e IL 20 a partir de muestras de tejido sinovial en pacientes con osteoartritis temprana de rodilla.

Objetivos específicos

- Evaluar si existe relación entre los niveles de IL-17A e IL-20 como biomarcadores pronóstico en pacientes con osteoartritis temprana de rodilla.
- Cuantificar IL-17A e IL-20 en sobrenadantes de cultivo de sinoviocitos de pacientes con osteoartritis temprana de rodilla.
- Evaluar la distribución y localización de IL-17A e IL-20 en sinoviocitos.

Metodología

La toma de muestras de tejido sinovial en pacientes con OA temprana de rodilla estuvo a cargo de un médico especialista en reumatología en el Hospital Universitario Nacional de Colombia y los ensayos celulares se realizaron en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia para establecer la caracterización fisiopatológica de las muestras obtenidas a partir de cada paciente correspondientes a: Estandarización de cultivos primarios de sinoviocitos (FLS) y células mesenquimales (MSC) provenientes de tejido sinovial, fibroblastos de piel, análisis por microscopía de luz, microscopía de fluorescencia y Prueba ELISA.

Población de estudio

Pacientes en consulta externa del servicio de Reumatología del Hospital Universitario Nacional de Colombia en la ciudad de Bogotá con diagnóstico clínico y radiológico de OA temprana de rodilla.

Tipo de estudio: Estudio observacional descriptivo tipo serie de casos.

Tamaño de muestra

Los pacientes fueron seleccionados mediante muestreo por conveniencia incluyendo todos los pacientes con diagnóstico clínico de OA de rodilla dando cumplimiento a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para OA de rodilla. Los pacientes se seleccionaron durante el período comprendido entre el mes de octubre de 2022 hasta septiembre de 2023.

Criterios de inclusión

1. Pacientes masculinos o femeninos colombianos.
2. Pacientes procedentes de la consulta externa del servicio de Reumatología del Hospital Universitario Nacional de Colombia.
3. Pacientes con diagnóstico clínico de OA temprana de rodilla que cumplan con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para OA de rodilla (Mayores de 45 años, dolor articular que se intensifica con la actividad, sin rigidez matutina o de presentarla debe ser por un tiempo menor a 30 minutos) persistiendo con dolor intenso, rigidez articular y reducción de la funcionalidad articular con impacto importante en la calidad de vida.
4. Pacientes con persistencia de los síntomas clínicos antes mencionados y limitación funcional.

5. Pacientes con cambios inflamatorios mono-articulares, con compromiso de rodilla dada por edema y sinovitis localizada, derrame articular que requieran artrocentesis para estudio de líquido sinovial o biopsia percutánea con aguja de *Parker Pearson* para diagnóstico histopatológico diferencial de la artropatía inflamatoria.
6. Pacientes con imágenes de radiografía simple de rodilla con diagnóstico de OA con una puntuación de rodilla menor de 2 en la escala de severidad de *Kellgren y Lawrence (K/L)*.
7. Deseo de participar en el estudio si durante la consulta se documentan cambios inflamatorios de OA previa explicación del procedimiento y firma del consentimiento informado (*Anexo 1*).

Criterios de exclusión

1. Pacientes con OA secundaria con cuadro infeccioso activo.
2. Pacientes con diagnóstico de Artritis Reumatoide, Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis reactiva, espondiloartropatías seronegativas, artropatía por depósito de cristales (urato monosódico, hidroxapatita, pirofosfato cálcico).
3. Pacientes con clínica que sugiera cualquier otra condición inflamatoria crónica no sospechosa de OA a criterio del médico tratante e historia de uso de corticoides vía oral o vía intraarticular en los últimos 3 meses previo a la consulta.
4. Negativa del paciente para la participación en el estudio.

Selección de pacientes

El médico tratante realizó una selección de manera prospectiva de pacientes en consulta externa de los servicios de Ortopedia y Reumatología del Hospital Universitario Nacional con diagnóstico de OA temprana de rodilla que cumplieran con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para OA de rodilla, a los pacientes seleccionados se les realizó la toma de muestra de membrana sinovial, esta biopsia consiste en un procedimiento de rutina realizada en pacientes específicos que cuentan con indicación precisa para el diagnóstico de la artropatía inflamatoria.

Teniendo en cuenta que se tomó una muestra biológica de cada paciente, fue necesario solicitar la firma del consentimiento informado, en el cual se brindó explicación a los pacientes acerca de los objetivos del estudio y así mismo obtener la autorización para el procesamiento de la muestra extraída con el fin de realizar el diagnóstico diferencial.

El día en que se realizó cada procedimiento de la biopsia percutánea con aguja, las muestras fueron trasladadas al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia para realizar los análisis planteados en el presente estudio.

Estas muestras fueron transportadas de acuerdo con los lineamientos y especificaciones de las normas técnicas colombianas y el manual de bioseguridad de la OMS, cuyo manejo corresponde a la categoría B: *Transporte de tejidos biológicos no infecciosos*. Dichas muestras suministradas por el médico tratante posterior a su análisis, se procesaron en el laboratorio de investigación Farmacogenética del cáncer del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

Aspectos éticos, ambientales y legales

La participación de los individuos del estudio fue completamente voluntaria, en la cual se solicitó la firma del consentimiento informado donde se encuentra consignada la información necesaria del proyecto, los objetivos, al igual que los riesgos relacionados con la intervención expresados en lenguaje cotidiano. Además, se aclara que el grupo de investigadores no realiza intervención alguna, sino que se hace a través del médico tratante especialista para obtener un fragmento de la muestra extraída para objeto de esta investigación.

En cuanto al manejo de las historias clínicas y demás información recolectada, se mantuvo bajo estrictas normas de confidencialidad.

El presente estudio no pretendió evaluar recursos profilácticos y/o terapéuticos en el tratamiento de la OA temprana de rodilla y, por consiguiente, los pacientes continuaron con el esquema de tratamiento sintomático validado actualmente en las guías de manejo de la enfermedad, además este estudio cumple con los requisitos para la investigación en humanos según la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Esta propuesta de investigación fue aprobada por el comité de ética del Hospital Universitario Nacional con el acta CEI-HUN-ACTA-2022-08 (*Anexo 2*).

Los apartados metodológicos que se describen a continuación corresponden a una recopilación de trabajos previos por parte del grupo de investigación en Biología celular y autoinmunidad enfocados en pacientes con enfermedades reumáticas.

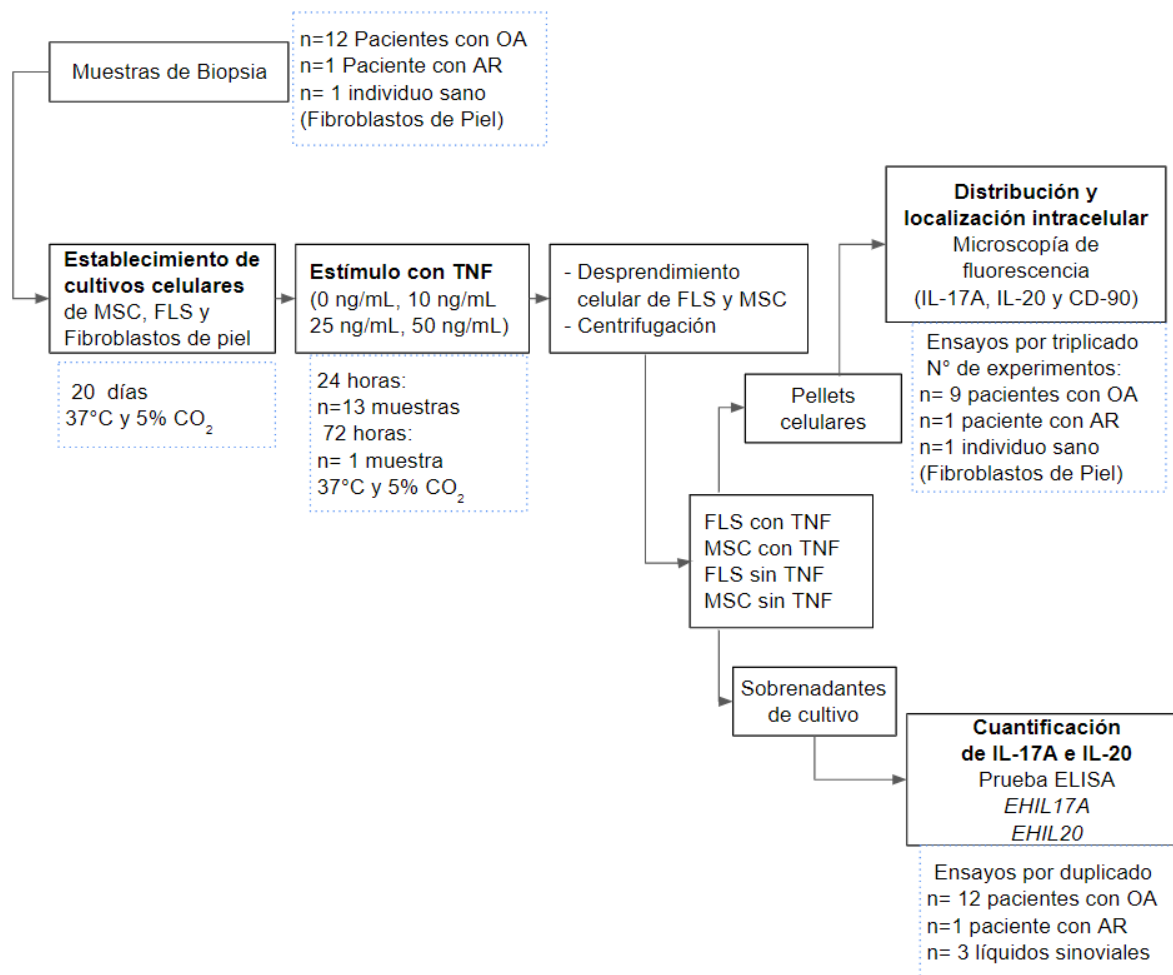


Diagrama propuesto para el desarrollo metodológico de los ensayos celulares.

Cultivos de Sinoviocitos similares a fibroblastos y células mesenquimales de tejido sinovial

Se recolectaron biopsias de tejido sinovial provenientes de pacientes diagnosticados con OA temprana de rodilla (n=12) y Artritis reumatoide (n=1). Cada biopsia fue dispuesta directamente en un tubo Falcon con medio RPMI 1640 conteniendo penicilina-estreptomicina (100 u/mL penicilina y 100 ug/mL estreptomicina) (Gibco) y suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) al 5%. Posteriormente, se realizó la digestión del tejido mediante la adición de Colagenasa tipo II, 0,2 % durante 3 horas en condiciones de incubación a 37°C y 5% CO₂, luego de la digestión enzimática la suspensión resultante se filtró por membrana de nylon para separar el sobrenadante de la biopsia digerida y se centrifugó por 10 minutos a 1500 R.P.M. en centrífuga Eppendorf 5702RH.

Posteriormente, el pellet celular obtenido se resuspendió con medio RPMI 1640 suplementado con SFB (Gibco) al 10% y se sembró en placas de cultivo de 6 pozos. La placa

se mantuvo en incubación con una atmósfera controlada a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar confluencia celular (15-20 días) tiempo durante el cual se realizó monitoreo por microscopía de luz y cambios periódicos del medio de cultivo con el fin de mantener los cultivos celulares en condiciones óptimas de nutrientes, retirar las células no adherentes y el debris celular.

Como método alternativo de cultivo también se empleó la siembra directa del explante de tejido sinovial sin el proceso de digestión con colagenasa tipo II, para lo cual se consideró el aspecto macroscópico de los fragmentos de la biopsia sinovial a partir del cual se realizó una clasificación de los fragmentos que presentaban aspecto de tejido adiposo y los fragmentos con aspecto característico de membrana sinovial, estos dos tipos de fragmentos se sembraron en pozos independientes con el fin de obtener poblaciones celulares de FLS y MSC por separado. En cuanto a las condiciones de cultivo, se realizaron de la misma forma a las establecidas con el tejido sometido a digestión enzimática. Los cultivos celulares se mantuvieron en incubación hasta alcanzar confluencia a una concentración celular de 1×10^5 células/mL.

Posteriormente, una vez los cultivos de las células FLS y MSC alcanzaron confluencia se les confirió un estímulo proinflamatorio mediante la adición de TNF- α (Biolegend), empleando diferentes concentraciones de TNF- α para identificar la mejor respuesta frente al estímulo proinflamatorio ya que esta citoquina potencializa las alteraciones celulares al modular las señales proinflamatorias, que puede manifestarse tanto con la forma de TNF- α soluble al igual que con la forma transmembrana [41], aspecto el cual fue evaluado a nivel intracelular mediante microscopía de fluorescencia.

Las concentraciones de TNF- α incluidas en el experimento fueron determinadas a partir de datos reportados por literatura que contemplaron estudios realizados en células de linaje mesenquimal y linaje fibroblástico [42,43,44], dentro de las cuales se encontraron concentraciones entre el rango de 10 ng/mL hasta los 100 ng/mL y se seleccionaron las concentraciones de (0 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL y 50 ng/mL) durante un tiempo de 24 horas para estimular la producción de las citoquinas IL-17A e IL-20.

Transcurrido el tiempo de estimulación, las células adherentes a la placa de cultivo fueron desprendidas físicamente de la superficie empleando *scraper* y luego se realizó centrifugación por 10 minutos a 1500 R.P.M, obteniendo así dos fracciones: la fracción de los sobrenadantes de cultivo con estímulo de TNF- α (10 ng/ml, 25 ng/ml y 50 ng/ml) y sin estímulo (0 ng/ml) las cuales se almacenaron en tubos Eppendorf y se congelaron a -20°C, hasta completar el procesamiento de muestras de todos los pacientes para llevar a cabo la prueba ELISA al final de los experimentos. En cuanto a la fracción de los pellets celulares obtenidos de las células estimuladas y de las células no estimuladas con TNF- α , se emplearon para el

estudio de distribución y localización a nivel intracelular de IL-17A, IL-20 y CD-90 por microscopía de fluorescencia.

Microscopía de fluorescencia

Para examinar la localización y distribución de IL-17A, IL-20 y CD-90 en células FLS y MSC se empleó la técnica de microscopía de fluorescencia ya que permite conocer la ubicación de dichas proteínas fluorescentes a partir del marcaje con fluoróforos específicos.

Una vez las células FLS y MSC provenientes de las biopsias alcanzaron el 80% de confluencia en cultivo y posterior a la estimulación con TNF- α , se realizaron 9 experimentos en células de pacientes con OA temprana de rodilla, 1 experimento con células provenientes de un paciente con AR y 1 experimento con fibroblastos de piel provenientes de 1 individuo sano. Las células FLS y MSC se sembraron por triplicado para cada ensayo de fluorescencia.

Las células FLS y MSC se sembraron sobre láminas de vidrio con campos de reacción de 6 pozos que corresponden a áreas circulares delimitadas facilitando la siembra de las células sobre la lámina y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se les realizó un primer lavado con PBS estéril a pH 7.4 a 37°C mediante pipeteo manual durante 5 minutos; seguidamente se fijaron las células con solución de formaldehído (*Scharlau 37% w/w*) diluido al 2% en PBS a pH 7.4 durante 30 minutos a 37°C, luego se realizaron lavados con PBS 3X manteniendo agitación suave y constante empleando Shaker orbital *SK-0180-E* a una velocidad de 20 R.P.M. durante 5 minutos.

Posteriormente, se añadió a cada pozo solución de Tritón 0,1% - Metanol 1,0% (*Scharlau Triton X-100, extra pure; Honeywell Methanol HPLC Grade*) en PBS durante 15 minutos, que al ser un detergente suave no iónico permite la permeabilización de las membranas celulares [45], transcurrido el tiempo se realizaron lavados con PBS 3X de acuerdo con la metodología de lavado previamente descrita.

Después se añadió solución de glicina 100 mM durante 10 minutos para bloquear los grupos aldehídos que quedaron sin reaccionar, con el fin de evitar la generación de autofluorescencia y señales de fondo [46]. Posteriormente se realizaron lavados con PBS 3X y se incubaron las láminas con solución de bloqueo (SBF 5% en PBS) durante toda la noche en refrigeración a 4°C. Al día siguiente se agregaron los anticuerpos primarios *CD-90 (Thy-1) Monoclonal Antibody (eBio5E10 (5E10))*, acoplado a FITC, *eBioscience 1:200*; *IL-20 Monoclonal Antibody (OTI2B8) (invitrogen) 1:150*; *IL-17A Monoclonal Antibody (eBio64DEC17) 1:200*, y se incubaron durante toda la noche en refrigeración a 4°C. Se realizaron lavados según la metodología descrita y se adicionó el anticuerpo secundario *Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody acoplada a Alexa Fluor*

488-labeled antibody (BioLegend, San Diego, CA, USA) a una concentración de 2.5 µg/mL. Se realizaron lavados 3X y luego los núcleos de las células fueron contrateñidos con DAPI (*4',6-diamidino-2-fenilindol*) durante 5 minutos en oscuridad.

Finalmente, se realizaron lavados 3X y se adicionó líquido de montaje estéril conteniendo Glicerol + PBS 9:1 ajustado a pH 7.4, con el fin de evitar una rápida aparición de *quenching* fluorescente en los especímenes preparados.

Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio *Zeiss Axio observer A1* con la cámara *AxioCam HR3*. En todos los experimentos de fluorescencia, se incluyeron 3 controles negativos correspondientes al control de autofluorescencia, control de anticuerpo primario, y control de anticuerpo secundario, y las fotografías se procesaron con el Software de imagen FIJI.

Cuantificación de IL-17A e IL-20 mediante técnica ELISA

Para la cuantificación de IL-17A e IL-20, se realizó una prueba ELISA para cada una de las dos interleuquinas empleando dos Kits comerciales para la cuantificación. Se incluyeron las siguientes muestras las cuales fueron evaluadas por duplicado correspondientes a 12 sobrenadantes de cultivo de pacientes con OA temprana de rodilla, 1 sobrenadante de cultivo de 1 paciente con AR y 3 muestras de líquido sinovial de 3 pacientes con OA temprana de rodilla los cuales durante el procedimiento de biopsia sinovial presentaron derrame de líquido articular.

Cuantificación de IL-17A mediante técnica ELISA

Para la cuantificación de IL-17A, se llevó a cabo una prueba ELISA con el KIT *Human IL-17A ELISA EHIL17A* y se siguieron las instrucciones del fabricante Thermo Scientific. a partir de la cual en una placa de 96 pozos se adicionó 50 uL del reactivo anticuerpo biotinilado en la placa. Posteriormente, se sembró 50 uL de los estándares diluidos de *Anti-Human IL-17 Standard* para la curva patrón y de los sobrenadantes de cultivo por duplicado en cada pozo; se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente (20 - 25°C), luego se descartó la solución y se lavó 3 veces con Buffer de lavado adicionando 400 uL en cada pozo con pipeteador multicanal manteniendo agitación suave y constante a 20 R.P.M. con *Shaker orbital SK-0180-E* durante 30 segundos, después se realizó la incubación de *estreptavidina-HRP* adicionando 100 uL en cada pozo permitiendo un tiempo de incubación de 1 hora, pasado el tiempo se descartó el contenido de la placa y se repitió el procedimiento de lavado 3 veces.

Después se sembró 100 uL en cada pozo de la solución sustrato TMB con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió 100 uL de la solución Stop en cada pozo y se realizó la lectura de la placa en el rango de tiempo de los 30 minutos siguientes a la reacción de detención midiendo la absorbancia mediante un lector de placas *Dynex Triad* con el software *Triad Series Concert* a las longitudes de onda de 450 nm y 550 nm.

Cuantificación de IL-20 mediante Test ELISA

Para la cuantificación de IL-20, se llevó a cabo una prueba ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante Thermo Scientific. Se empleó el KIT *Human IL-20 ELISA EHIL20*, a partir del cual en una placa de 96 pozos se adicionó 100 uL de cada estándar para realizar la curva patrón, se sembró 100 uL de cada uno de los sobrenadantes provenientes de las muestras procesadas en el estudio, se cubrió la placa y se mantuvo la reacción durante 2.5 horas a temperatura ambiente manteniendo agitación suave y constante a 20 R.P.M. con *Shaker orbital SK-0180-E*. Luego se descartó la solución y se lavó 4 veces con Buffer de lavado 1X adicionando 300 uL en cada pozo con pipeteador multicanal manteniendo agitación suave y constante a 20 R.P.M. durante 30 segundos.

Posteriormente, se adicionaron 100 uL de anticuerpo biotinilado 1X a cada pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C) manteniendo agitación suave y constante a 20 R.P.M. con Shaker. Seguidamente, se realizaron lavados de acuerdo con la metodología descrita previamente, se adicionó la solución estreptavidina-HRP a cada pozo y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y constante a 20 R.P.M. con Shaker. Se realizaron nuevamente lavados 4X y se agregó 100 uL del sustrato TMB a cada pozo, se incubó durante 30 minutos en condiciones de temperatura ambiente y oscuridad, manteniendo el mismo sistema de agitación previamente mencionado. Después se agregó 50 uL de la solución *Stop* a cada pozo y se realizó la lectura de la placa realizando el mismo protocolo descrito para la cuantificación de IL-17A.

Análisis estadístico

Los resultados de intensidad media de fluorescencia fueron tratados mediante un Test Anova unidireccional, con un nivel de significancia de 95% ($p \leq ,05$); que en conjunto, para analizar las comparaciones entre los grupos de experimentos: IL-17A + Alexa Fluor 488; IL-20 + Alexa Fluor 488; CD-90 en su producción constitutiva y regulada, respecto al grupo control de autofluorescencia se empleó la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los datos obtenidos se analizaron con GraphPad Prism 10.1.2.

Resultados y Discusión

La prevalencia de la OA incrementa con la edad, de los pacientes incluidos en el estudio la mediana de edad fue de 60 años, del total el 86% fueron a mujeres y el 14% hombres, lo cual concuerda con lo reportado por literatura ya que el sexo constituye un factor determinante en la epidemiología de la OA pues en mujeres mayores de 50 años es más frecuente que sufran afectaciones en las articulaciones de las manos, los pies, las rodillas y tienen una mayor tendencia a desarrollar OA generalizada, lo cual podría estar relacionado con el papel que desempeñan las hormonas sexuales y la disminución en el nivel de estrógenos que experimentan las mujeres en etapa posmenopáusica.

También se determinó el Índice de masa corporal (IMC) ya que la condición de obesidad se relaciona con un mayor estrés metabólico y aumento en la carga mecánica en las rodillas, como se representa en la tabla 1. El 57% de los pacientes se encontraban en sobrepeso y solamente el 30% en un rango de peso corporal normal constituyendo de esta manera un factor de riesgo importante para el padecimiento de la OA debido a los cambios metabólicos que favorecen la inflamación [47].

IMC (Kg/m²)	(%)
Desnutrición (<18)	0
Normal (18 - 24,9)	30
Sobrepeso (25 - 29,9)	57
Obesidad (30)	13
Sexo	(%)
Hombres	14
Mujeres	86

Tabla 1. Variables sociodemográficas de los pacientes incluidos en el estudio

Estandarización de cultivos primarios de sinoviocitos

La estandarización de cultivos de FLS y MSC a partir de biopsias de pacientes con OA temprana de rodilla permite la obtención de una fuente homogénea de células, cuya importancia radica en que la OA al ser una enfermedad que presenta inflamación de bajo grado y degradación del cartílago articular implica cambios a nivel celular y molecular. Además, de acuerdo con lo reportado en literatura las células FLS y MSC contribuyen a la inflamación sinovial y a la destrucción articular en la OA pues parte de sus funciones a nivel

sinovial corresponde a sintetizar componentes que hacen parte de la matriz extracelular de los tejidos conectivos necesarios para mantener la homeostasis, al igual que participar en las respuestas de reparación y producción de mediadores inflamatorios.

De acuerdo con lo anterior, para estudiar los cambios a nivel microscópico se establecieron cultivos obtenidos a partir de biopsias sinoviales de 12 pacientes diagnosticados con OA temprana de rodilla y 1 paciente con AR empleando como métodos de cultivo celular el cultivo con digestión enzimática y cultivo directo de explantes de tejido sinovial de los cuales se aislaron células FLS y MSC.

En la Figura 5 (A-C) se presenta las características macroscópicas de las muestras procesadas con aspecto fibroso y adiposo lo cual conllevó a realizar cultivos de manera diferencial para lograr el aislamiento independiente de FLS y MSC. En primer lugar, se evaluó el aspecto de la muestra extraída clasificando aquellos fragmentos que presentaban un color blanquecino con apariencia grasa respecto a los fragmentos de membrana. Según el método de cultivo se sometió la muestra a digestión enzimática, en el que el tejido digerido fue filtrado (Figura 5 B) al igual que el método de cultivo directo de explante (Figura 5 C) en el cual estos fragmentos se sembraron sobre cada uno de los pozos de la placa de cultivo celular.

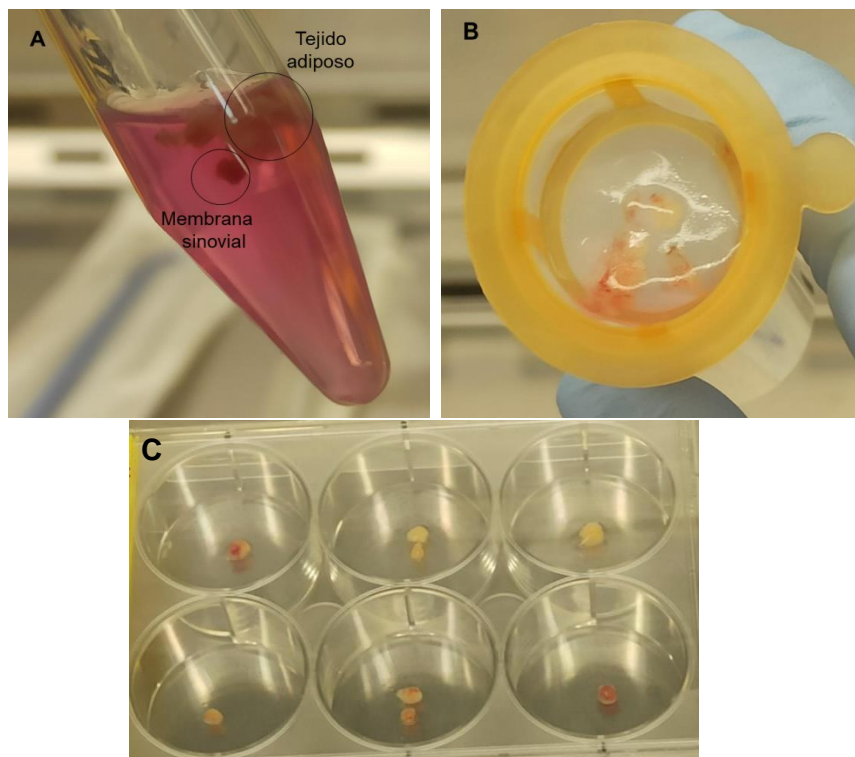


Figura 5. Aspecto macroscópico de la biopsia de tejido sinovial.

- (A) Aspecto macroscópico de la biopsia conteniendo fracciones de tejido adiposo y membrana sinovial (B) Aspecto de la biopsia posterior a la digestión enzimática (C) Clasificación de los fragmentos del explante para iniciar el crecimiento en cultivo.

La composición de los explantes fue determinante para el crecimiento de FLS y MSC a partir de las muestras de tejido sinovial en las cuales se identificaron características morfológicas típicas del linaje fibroblástico mostrando una morfología fusiforme, con núcleos planos y ovalados, la cual se mantuvo durante el periodo de cultivo.

Considerando que la mayoría de las muestras de los pacientes incluidos en el estudio contenían fracciones de tejido adiposo, lo cual se identificó a nivel macroscópico en los fragmentos de color blanco como se observa en la Figura 5(C), a nivel microscópico también se evidenció la presencia de células con características adiposas en diferente estado de madurez correspondientes a adipocitos maduros y células MSC (Figura 6 A), en esta etapa el cultivo se encontraba en un 30% de confluencia celular.

En cuanto al aspecto fibroso de la membrana sinovial, se pueden observar células FLS (Figura 6 B) en un nivel de confluencia celular aproximada del 80% con base a la totalidad de la superficie de la placa la cual se encontraba totalmente tapizada por células adherentes.

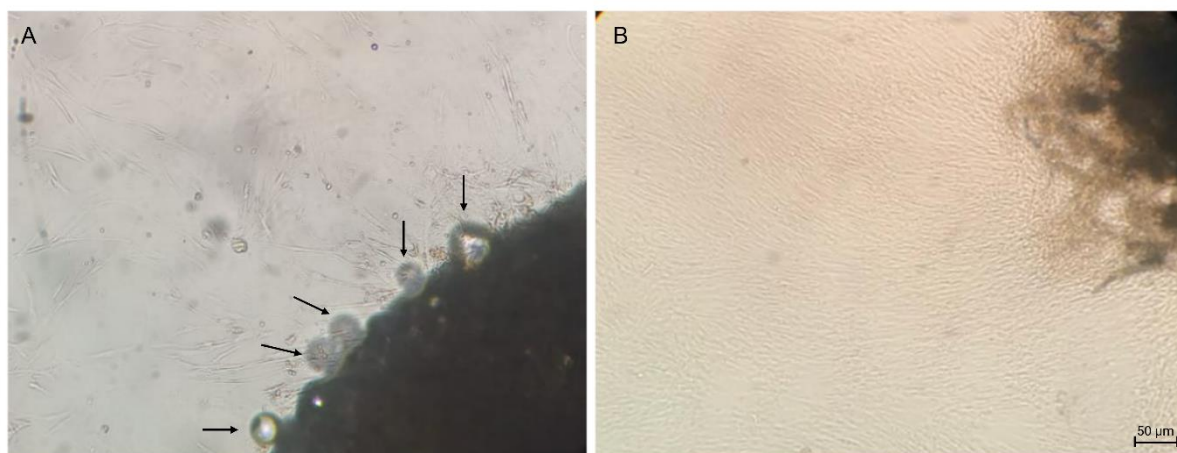


Figura 6. Aspecto microscópico de la biopsia sinovial procesada.

(A) Células MSC junto con células adiposas maduras, las flechas negras señalan adipocitos maduros (B) Biopsia sinovial de paciente con OA temprana de rodilla con. Se presentan células FLS migrando desde el explante. *Magnificación 10X*

Como parte del seguimiento al cultivo celular se encontraron diferencias en la velocidad de crecimiento, para el caso de las células MSC estas tenían una tasa de proliferación mayor en comparación con los FLS derivados de los explantes de membrana sinovial, dicha velocidad de crecimiento aumentó cuando se cultivó el explante directamente sin efecto de la digestión del tejido con la enzima colagenasa tipo II, esta diferencia puede ser atribuida a que el método enzimático en conjunto con los pasos adicionales de lavado y filtración requeridos repercuten sobre la viabilidad celular debido a la actividad lítica y a una menor capacidad de adhesión celular a la placa de cultivo.

En cuanto al método en el cultivo directo del explante, las células al ser transferidas desde condiciones *in vivo* a condiciones *in vitro* manteniendo la presencia de un fragmento de tejido genera un mayor grado de semejanza respecto a su entorno de origen y por ende mejora la estabilidad del microambiente del cultivo, al igual que una mayor tolerancia al estrés provocado por el aislamiento celular en curso.

Los cultivos bidimensionales de células ofrecen una disposición adecuada para la propagación celular en una superficie plana, los cuales permitieron evaluar la migración celular que para el caso de las células de linaje mesenquimal y fibroblástico es una característica importante debido a que se catalogan como células de fuerte migración en las cuales se pueden encontrar extensiones celulares largas [48].

La migración celular involucra el movimiento e interacciones laxas mediadas por uniones adherentes transitorias a nivel intercelular que facilitan la unión mecánica de una célula a otra, así también determinan el comportamiento móvil [49] manteniendo las adherencias entre células con la capacidad de formar grupos con diferente potencial protrusivo de tracción y de retracción que promueven la migración celular en una polaridad anteroposterior. Además, estos contactos célula-célula establecen una tensión mecánica, con una organización espacial determinada en términos de velocidad, persistencia, polaridad y trayectoria [50,51]. Para el caso de las células FLS, en la migración celular las fuerzas intracelulares son impulsadas por el ensamblaje de actina presente en los lamelipodios que conllevan a crear interacciones mediante la extensión de las protuberancias que poseen un alto contenido en actina [52].

La expresión a nivel espacial y temporal de ciertos componentes proteicos tales como miosina, cadherinas e integrinas también influyen en la adhesión y migración celular y en conjunto genera una fuerza de empuje hacia afuera desde el extremo anterior de los fibroblastos y luego un efecto de retracción sobre la porción de la cola mediante un mecanismo de *tug-of-war* "tira y afloja" que hace referencia al proceso de extensión y retracción de los lamelipodios seguido de la translocación, que finalmente se traduce en la movilidad y migración de las células [53,54].

Este comportamiento migratorio descrito se representa en la Figura 7 (A-C) el cual recobra importancia ya que brinda una aproximación acerca del comportamiento celular en el tejido sinovial durante los procesos fisiopatológicos relacionados con la patogénesis de la OA tanto en la degeneración del cartílago como en la morfogénesis y constituye además una aplicación potencial en ingeniería de tejidos.

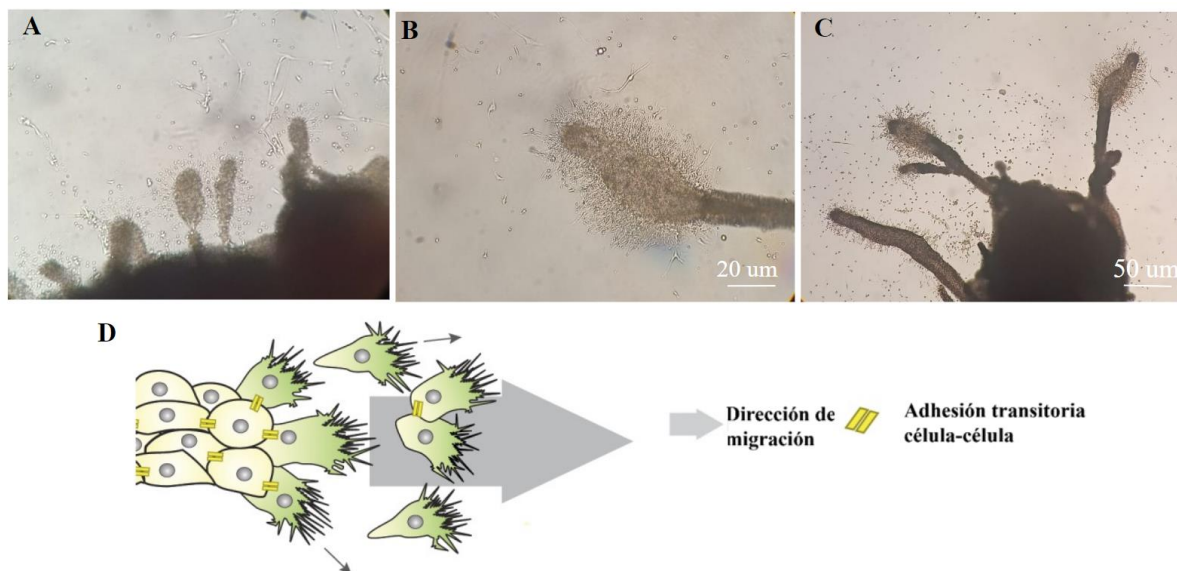


Figura 7. Aspecto microscópico de la migración de células desde el explante hacia la placa de cultivo

(A-C) Micrografías de células emergentes del explante de cultivo. *Magnificación 10X* (B) Micrografía con magnificación 20X (D) Patrón de migración colectiva mesenquimal.

Adaptado de Scarpa E, 2016 [49].

Como parte de la estandarización se llevó a cabo el seguimiento de las tasas de confluencia celular en función del tiempo. En la Figura 8 (A-C) se observan células FLS adherentes a la placa de cultivo en una etapa inicial de crecimiento con una tasa de confluencia del 10% aproximadamente y en la Figura 8 (D) a una confluencia aproximada del 80% nivel de confluencia en el cual se realizó desprendimiento y expansión celular.

Esta muestra de FLS en cultivo celular proviene de un paciente con AR temprana de rodilla empleada como control positivo de inflamación para el posterior análisis de citoquinas, dado que es un tipo de artritis en el cual está ampliamente demostrado un componente inflamatorio que se manifiesta con una mayor severidad en comparación con la inflamación de bajo grado presente en la OA temprana de rodilla.

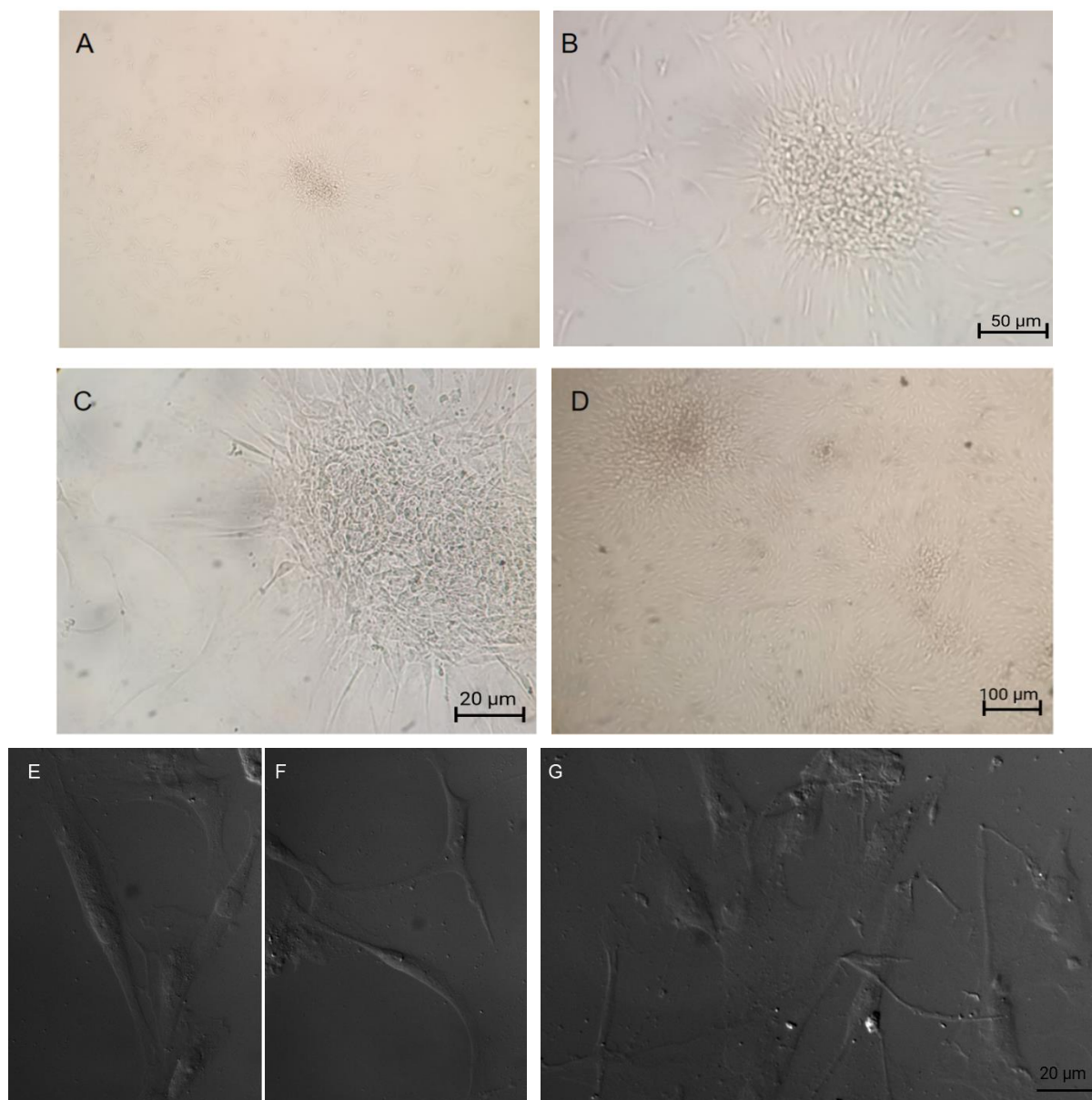


Figura 8. Micrografías de FLS a partir de biopsia sinovial de paciente con AR temprana de rodilla

(A,D) FLS con magnificación 4X (B) FLS con magnificación 10X (C) FLS con magnificación 20X (E-G) Microscopía DIC de FLS estimulados con TNF- α . Magnificación 40X

En la Figura 9 se muestran características en cultivo de dos poblaciones celulares encontradas en el microambiente sinovial de uno de los pacientes con OA. En la Figura 9 (A-B) se observan células MSC aisladas a partir de la fracción adiposa del explante manteniendo una morfología fusiforme, núcleos redondos a ovalados y que en términos comparativos alcanzaron una confluencia celular en un tiempo más corto respecto al tiempo requerido para el crecimiento en cultivo de FLS siendo esta una característica común a todos los cultivos evaluados.

En las Figuras 9 (C-D) se presentan FLS derivados de la porción del explante de membrana sinovial. En la figura 9 (C) se encontró una morfología particular, la cual podría corresponder a FLS en etapa de senescencia, en la que, si bien se mantiene la morfología dictada por la arquitectura del tejido durante esta etapa, las células se vuelven planas y vacuolizadas; dicha vacuolización se asocia con el estrés del retículo endoplásmico causado por modificaciones en el plegamiento de las proteínas [55].

Otro de los cambios a nivel morfológico es que presentan un núcleo fragmentado y con incremento en su tamaño ya que durante esta etapa experimentan remodelación a nivel de la cromatina nuclear y la inducción de un metabolismo oxidativo que a su vez favorece la desorganización de organelos a nivel de su estructura celular probablemente debido a los procesos de autofagia que se encuentran activos.

Las células FLS en etapa de senescencia abandonan su forma ahusada para adoptar una morfología aplanada típica, con procesos celulares elongados y numerosos autofagolisosomas que son indicativo de la activación de las vías de autofagia que hacen parte de fenómenos de estrés y senescencia celular [56].

Se ha propuesto que la senescencia celular está implicada en la OA al ser una etapa que se inicia de forma prematura en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios perjudiciales que hacen parte de la enfermedad. La presencia de células senescentes es provocada por diferentes tensiones a nivel local en la articulación afectada lo que contribuye a la patogénesis de múltiples enfermedades reumáticas tanto en su etapa temprana como durante la progresión en el tiempo debido en parte a que las interacciones establecidas con las demás células sinoviales promueven un estado de inflamación e impiden la capacidad de autoregeneración del tejido [57].

Es importante considerar el estado de senescencia ya que es una característica de las células FLS que favorece la permanencia de la OA y el desarrollo del fenotipo inflamatorio. No obstante, para confirmar que corresponden a células senescentes se propone la realización de estudios adicionales como por ejemplo análisis de scRNA-seq con el fin de determinar los cambios transcripcionales implicados y el fenotipo secretor asociado a la senescencia [57,58].

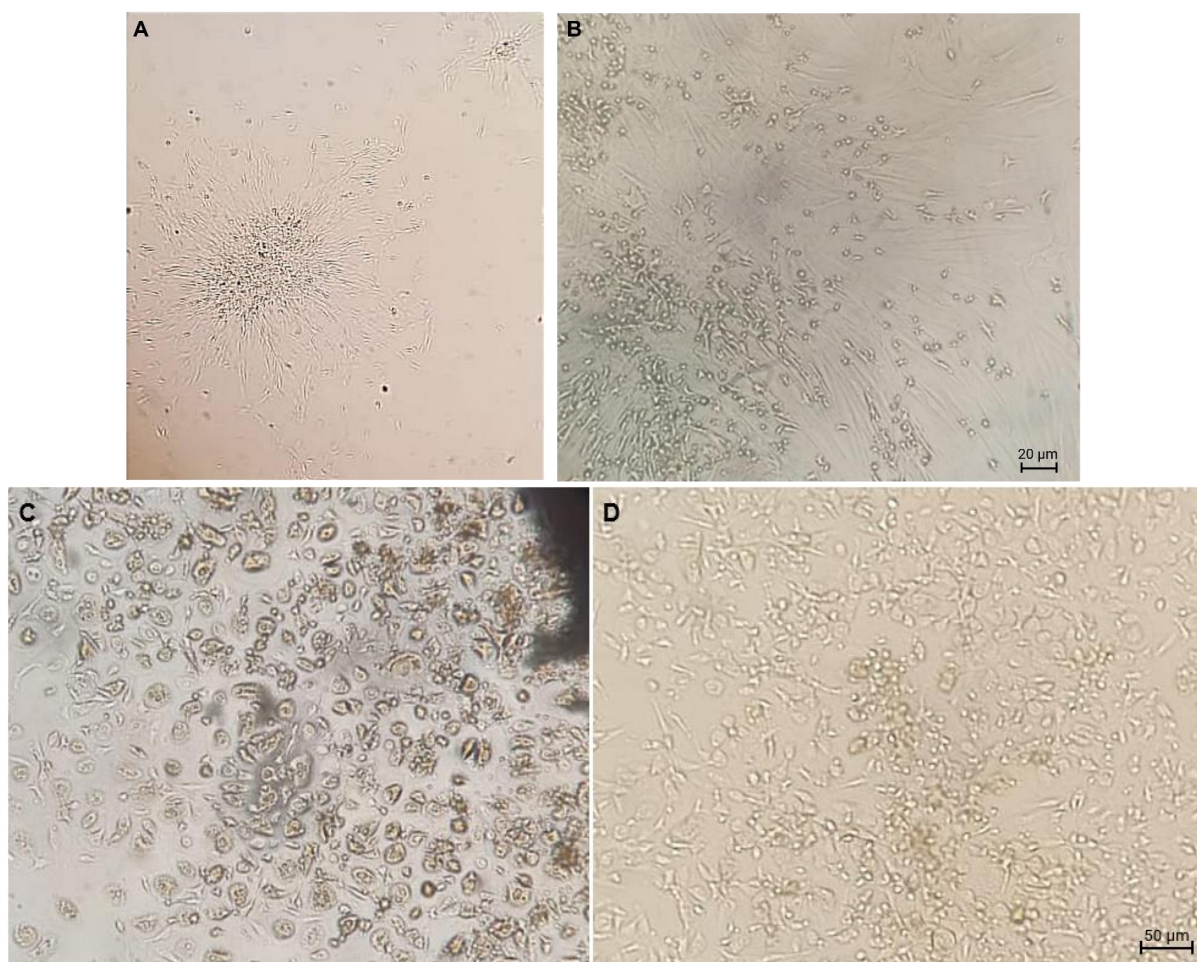


Figura 9. Micrografías en placa de cultivo de células FLS y MSC a partir de biopsia sinovial de paciente con OA temprana de rodilla.

(A-B) MSC obtenidas a partir de explante de tejido adiposo. *Magnificación de 10X y 20X respectivamente* (C) FLS en posible etapa de senescencia. (D) FLS a partir de fragmento de membrana sinovial. *Magnificación 10X*

En la Figura 10 (A-D) se muestran células MSC que hacen parte del tejido sinovial con morfologías alargadas y de huso, las cuales presentaron una mayor capacidad de proliferación celular en comparación con los FLS aislados en cultivo. En la Figura 10 (D) se encontraron células MSC con morfologías poligonales y alargadas, y una coloración particular que podría corresponder a células MSC con potencial de diferenciación condrogénico cuya coloración estaría relacionada con el contenido de colágeno tipo II, colágeno tipo X y proteoglicanos las cuales son biomoléculas que hacen parte del cartílago articular [59].

Cabe resaltar que para verificar el potencial condrogénico se deben llevar a cabo pruebas adicionales que así lo demuestren, tales como verificar la expresión de los antígenos CD44, CD73 y CD105 [60] en conjunto con las condiciones de cultivo celular empleando un medio de cultivo condrogénico que faciliten su aislamiento, al igual que pruebas histológicas de

tinción con azul de toluidina para evidenciar la formación de anillos de matriz extracelular teñida metacromáticamente debido al contenido de proteoglicanos y colágenos que se encuentran a nivel intracelular [61].

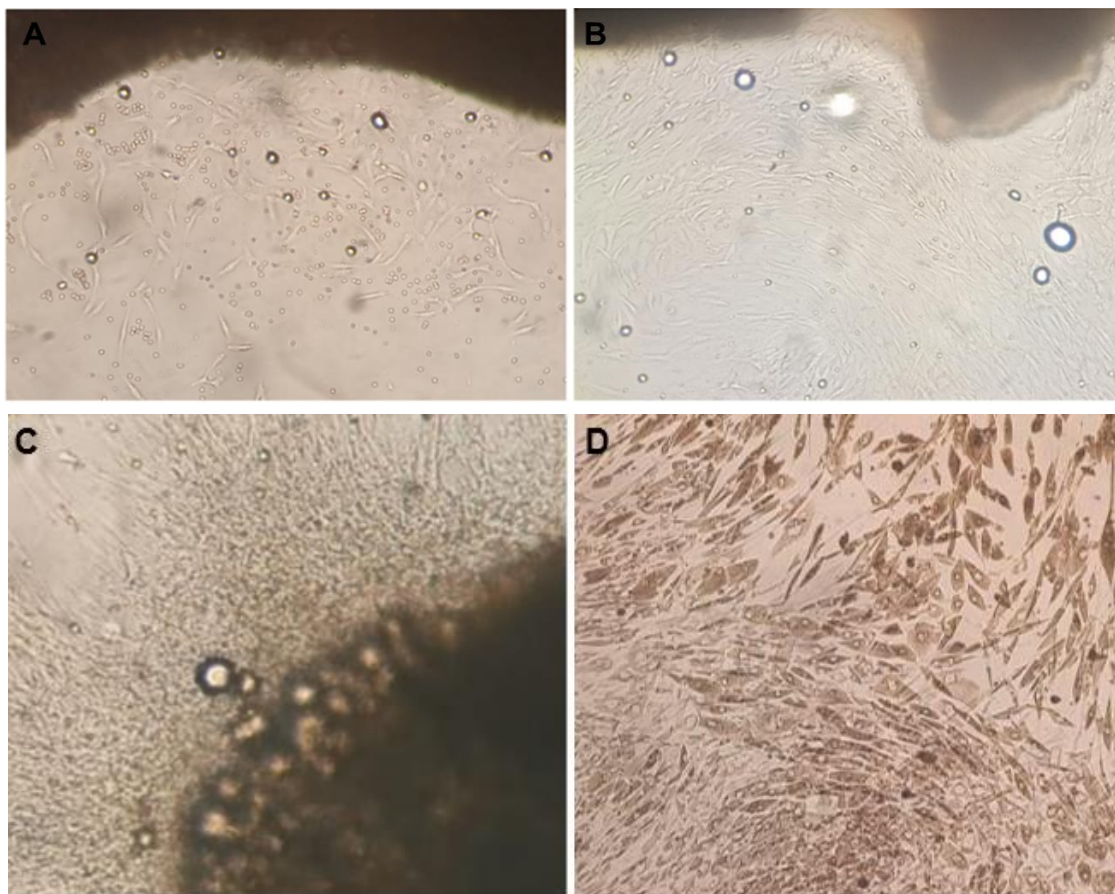


Figura 10. Seguimiento cronológico del crecimiento en cultivo de células MSC a partir de biopsia sinovial de paciente con OA temprana de rodilla.

(A) MSC tras 6 días de cultivo (B) MSC con 9 días de cultivo (C) Fragmento de tejido adiposo con células MSC emergentes del explante transcurridos 21 días de cultivo (D) MSC tras 30 días de cultivo con posible potencial condrogénico. *Magnificación 10X.*

En la Figura 11 (A-B) Se presentan adipocitos maduros con formas esféricas conteniendo una gota lipídica unilocular que ocupa la mayor parte del volumen citoplasmático desplazando a su vez a los demás organelos hacia la periferia [62]. Los adipocitos se presentan en un tono blanco y algunos con una coloración marrón, esta puede atribuirse a mitocondrias que contienen hierro y le otorgan dicho color, para verificar la identificación como adipocitos se requieren llevar a cabo pruebas adicionales de tinción tales como *Oil red* que tiñe células de naturaleza lipídica y por lo tanto permite confirmar su identidad [63].

Los adipocitos son un tipo celular que recobra importancia en la OA debido a que tanto el tejido adiposo a nivel sinovial al igual que la grasa infrapatelar la cual se encuentra próxima a la membrana sinovial son fuente de MSC y de adipocitos maduros los cuales almacenan lípidos y participan en diferentes funciones a nivel metabólico, por ende están implicados en la inflamación de bajo grado en la OA debido a la secreción de adipoquinas y citoquinas proinflamatorias incluidas IL-6, IL-17A; IL-20 y TNF- α entre otras, que ejercen actividad proinflamatoria en el microambiente local promoviendo el mantenimiento de la OA en el tiempo. Además, la obesidad provoca estrés metabólico que promueve la secreción de estas citoquinas [64].

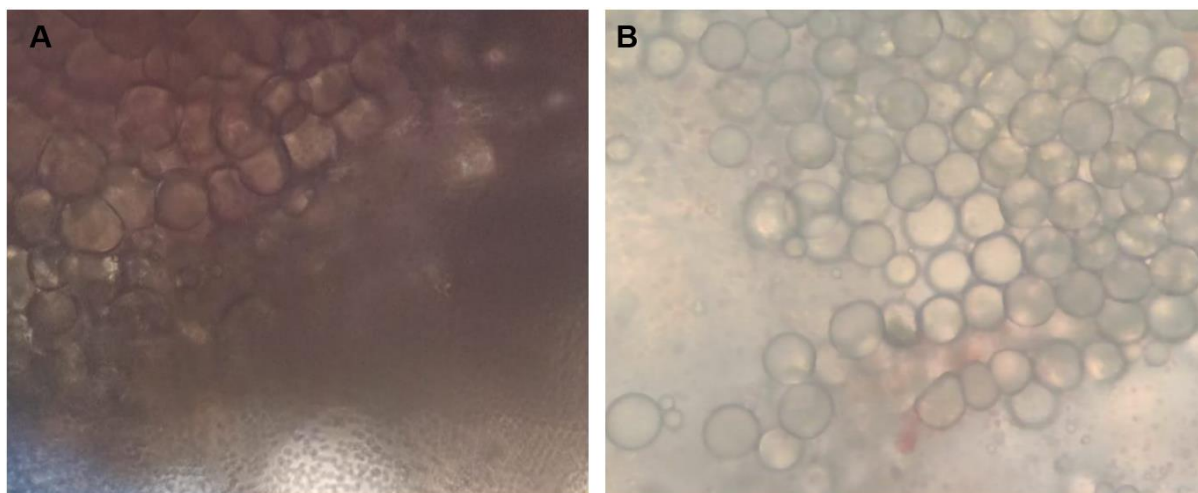


Figura 11. (A-B) Adipocitos esféricos maduros compuestos por gotas lipídicas.

En la Figura 12 (A-B) Se observan FLS provenientes de una de las biopsias de pacientes con OA temprana de rodilla adherentes a la superficie de la placa exhibiendo células con morfologías heterogéneas, algunas estrelladas, en comparación con los fibroblastos alargados en forma de huso provenientes de la piel de un individuo sano (Figura 12 C) que demostraron un patrón de crecimiento en cultivo más homogéneo, lo cual podría estar relacionado con el comportamiento invasivo y agresivo que adquieren las células FLS en pacientes con OA [65]. Por otro lado, se analizaron fibroblastos de piel provenientes de 1 individuo sano como control experimental para evidenciar la producción constitutiva y regulada del marcador de superficie CD-90. En el análisis por microscopía de luz se observó una morfología fusiforme y la capacidad de adherencia a la placa de cultivo.

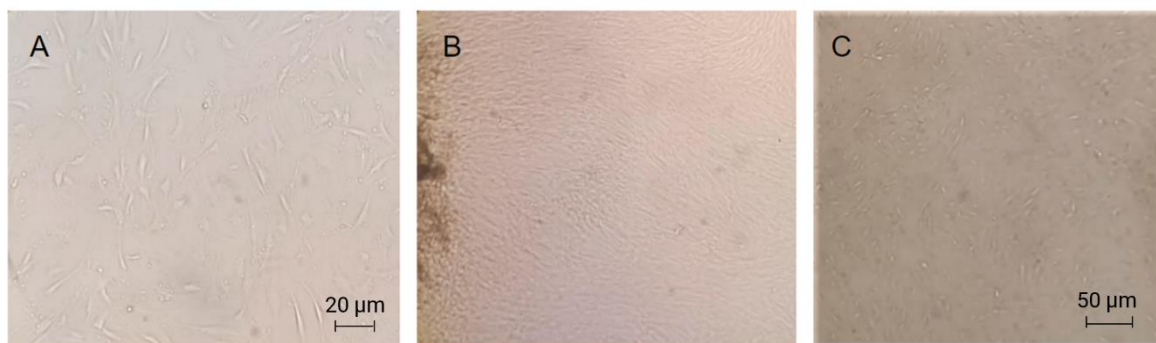


Figura 12. Microscopía de luz de células FLS en pacientes con OA temprana de rodilla y de fibroblastos piel de individuo sano

(A-B) FLS estimulados con TNF- α a partir de biopsia sinovial de paciente con OA temprana de rodilla. *Magnificación 20X*. (C) Fibroblastos de piel en reposo a partir de biopsia de individuo sano. *Magnificación 10X*

La estimulación con TNF- α ha demostrado ser útil para explicar cómo se produce la inflamación en la OA, pues su comportamiento proinflamatorio se produce en respuesta a la lesión del cartílago y otros estímulos. Cuando ocurre una lesión articular, las células FLS y los macrófagos responden produciendo TNF- α , lo que a su vez genera un efecto sinérgico en la producción de otras citoquinas inflamatorias y enzimas catabólicas dentro de las que se encuentran IL-17A, IL-20, al igual que MMPs [66].

Las células FLS y MSC derivadas de pacientes con OA pueden ser estimuladas por TNF- α a través de la activación de la vía de señalización NF- κ B, que induce la producción de enzimas capaces de degradar el cartílago y citoquinas proinflamatorias. Además, TNF- α también puede estimular la producción de MMPs por parte de las células FLS, lo que contribuye a la degradación del cartílago [66], esto indica una diferencia importante entre células FLS de un individuo sano y FLS de pacientes con OA ya que en presencia de la enfermedad tienen una mayor capacidad para producir citoquinas y enzimas que degradan el cartílago articular favoreciendo la progresión de la enfermedad adicional a que las células FLS en OA también tienen una mayor expresión de receptores para TNF- α , lo cual los hace más sensibles a su acción proinflamatoria.

Se evaluó el efecto proinflamatorio en células FLS y MSC adherentes estimuladas con diferentes concentraciones de TNF- α (0, 10, 25 y 50 ng/ml) ya que es una citoquina proinflamatoria que induce cambios en las células, transformando su morfología de células aplanadas y dispersas a células más retraídas y cubiertas de lamelipodios, lo cual se pudo evidenciar en la Figura 13 (A-C), estos cambios corresponden a prolongaciones de la membrana celular producidas por la acción de microfilamentos que tienen un alto contenido de actina, colágeno y glicoproteínas [67].

Las células estimuladas presentaron diferentes ramificaciones de lamelipodios tanto en número como en elongación que corresponden a lamelipodios espinosos de naturaleza lipídica formando redes en patrones irregulares que de acuerdo con lo reportado por literatura, una de sus funciones corresponde a la ingestión de nutrientes y a la locomoción, esto puede contribuir a una mejor interacción celular, pues un aumento en el número de lamelipodios en la superficie de la membrana promueve la comunicación celular, dichos fenómenos de retracción y extensión de lamelipodios se manifestaron en una relación dependiente de la concentración ante el estímulo inflamatorio ejercido por TNF- α . [68,69,70].

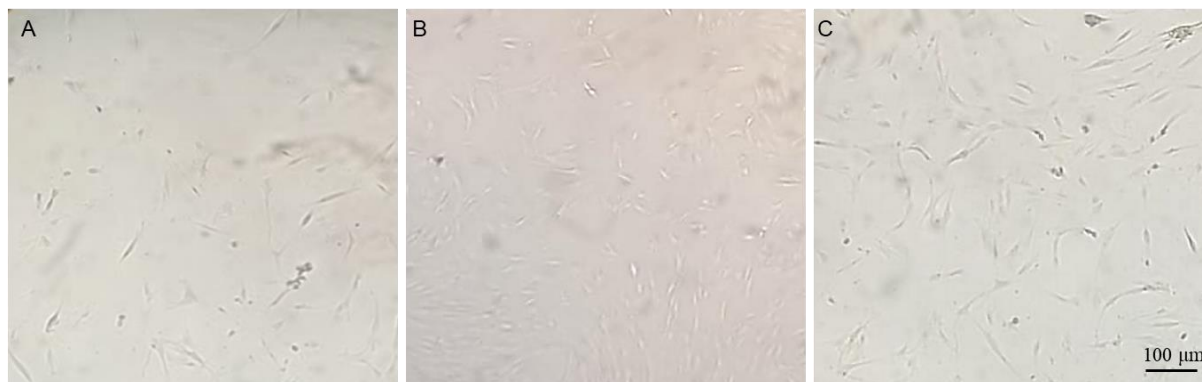


Figura 13. Estímulo de TNF- α a diferentes concentraciones en células MSC provenientes de pacientes con OA temprana de rodilla.

(A) MSC sin estímulo de TNF- α (B) MSC con estímulo de TNF- α 25 ng/mL (C) MSC con estímulo de TNF- α 50 ng/mL. *Magnificación 4X. Las imágenes son representativas de 3 experimentos por triplicado.*

Microscopía de fluorescencia

Con el objetivo de evaluar la distribución y localización intracelular de IL-17A, IL-20 al ser citoquinas que participan en la inflamación a nivel sinovial en OA a través de las células efectoras FLS y MSC, al igual que del marcador CD-90 para verificar el linaje mesenquimal y fibroblástico, posterior al aislamiento en cultivo celular de FLS, MSC y fibroblastos de piel.

Se realizaron en total 11 experimentos por microscopía de fluorescencia correspondientes a 9 experimentos en células de pacientes con OA temprana de rodilla, 1 experimento con células provenientes de un paciente con AR y 1 experimento con fibroblastos de piel provenientes de un individuo sano, para los cuales las células FLS, MSC y fibroblastos se sembraron por triplicado para cada ensayo.

CD-90 (Thy-1) es una glicoproteína de superficie celular conservada de 25 a 37 kDa, altamente N-glicosilada, anclada a glicofosfatidilinositol. Recientemente, CD-90 se ha

identificado como marcador de fibroblastos que suelen proliferar en las zonas perivasculares de los tejidos sinoviales de la OA y se considera que está implicado en la destrucción tisular por genes expresados al alza, relacionados con la diferenciación o activación de osteoclastos tales como el ligando del receptor activador de NF- κ B.

El anticuerpo específico contra CD-90 fue utilizado para evidenciar su producción constitutiva y regulada dado que está presente en células de linaje mesenquimal y de linaje fibroblástico permitiendo confirmar los tipos celulares evaluados en este estudio. En la Figura 14 (A-C) se observa la producción constitutiva de CD-90 en fibroblastos obtenidos a partir de una biopsia de piel de 1 individuo sano.

De acuerdo con lo anterior, se evaluó la producción constitutiva de CD-90 en fibroblastos de piel, al igual que la producción regulada en fibroblastos FLS y células MSC derivadas de pacientes con OA temprana de rodilla estimulados con TNF- α , cuya distribución se observó a nivel citoplasmático con una tendencia a enriquecerse en la región perinuclear lo cual se podría atribuir a que en esta región se ubican el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi que establecen interacciones entre sí durante la síntesis de proteínas [71,72].

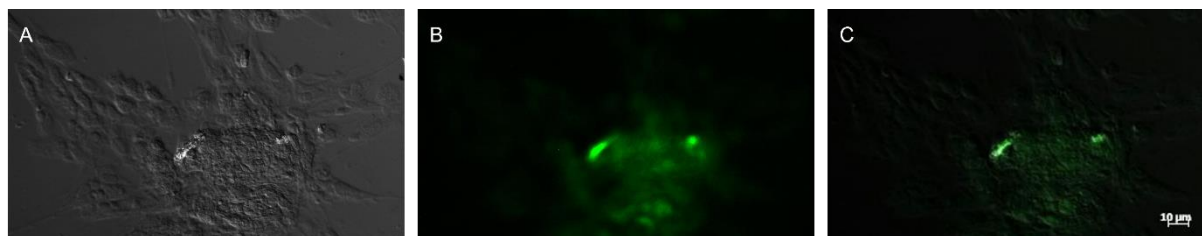


Figura 14. Microscopía de Fibroblastos de piel provenientes de biopsia de individuo sano para la evaluación constitutiva de CD-90.

(A) Microscopía DIC. (B) Fluorescencia del marcador de superficie específico de fibroblastos *CD-90/Thy1 (5E10) [FITC]*; (C) Merge: DIC + Fluorescencia *CD-90/Thy1 (5E10) [FITC]*. Magnificación 40X (Las imágenes son representativas de 1 experimento por triplicado).

Las citoquinas IL-17A IL-20 y el marcador de superficie CD-90 se evidenciaron en FLS y MSC lo que sugiere que estas células podrían ser fuentes importantes de IL-17A e IL-20 en el medio sinovial de pacientes con OA. En la Figura 15 (A-L) y Figura 16 (A-L) se presenta el análisis por microscopía de fluorescencia en las cuales se observa el marcaje de estas citoquinas en células FLS y MSC de forma correspondiente provenientes de pacientes con OA temprana de rodilla.

Para los experimentos de microscopía de fluorescencia se realizaron experimentos en células provenientes de pacientes con OA temprana de rodilla para cada uno de los cuales se emplearon triplicados de cada ensayo (IL-17A, IL-20 y CD-90). Adicionalmente, con el objetivo de evidenciar la ausencia de fluorescencia, se emplearon como control negativo FLS y MSC provenientes de pacientes con OA temprana de rodilla, los cuales fueron sometidos al mismo procesamiento de fijación y lavado, a diferencia de que en lugar de emplear la marcación de anticuerpos primarios y secundarios se adicionó solución de bloqueo, esto se evidencia en la Figura 19 (A-F) y Figura 20 (A-F). Para el caso de IL-17A e IL-20 presentaron una marcación a nivel citoplasmático y dicho patrón de distribución fue común a todos los experimentos realizado en células MSC y FLS.

Microscopía de fluorescencia en FLS a partir de pacientes con OA temprana de rodilla con un tiempo con estímulo de TNF-Alfa de 24 horas

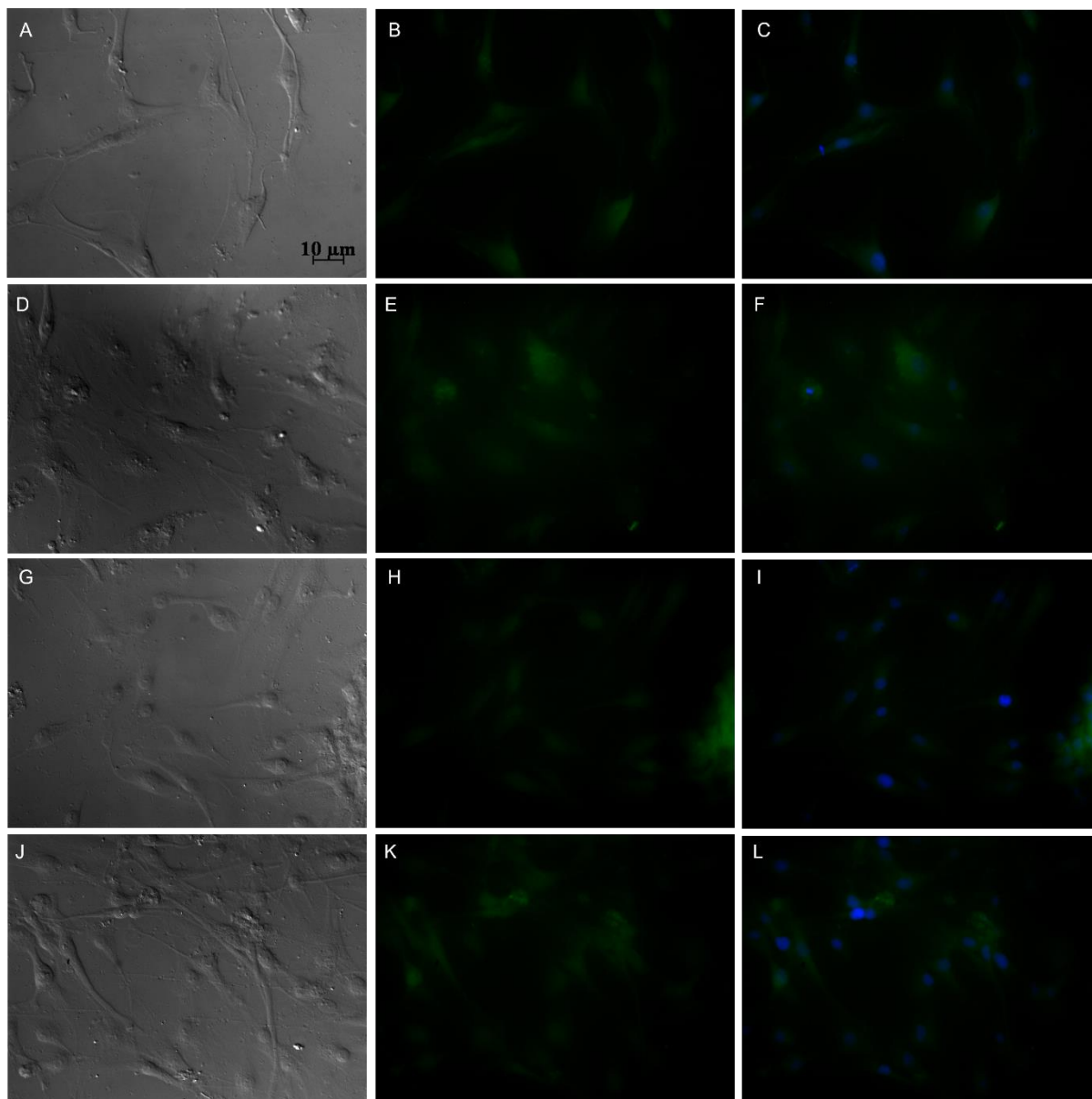


Figura 15. Microscopía de FLS provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla.

(A) DIC para CD-90 NA (B) Fluorescencia para CD-90 NA (C) Merge: DAPI + fluorescencia para CD-90 NA (D) DIC para CD-90 A (E) Fluorescencia para CD-90 A (F) DAPI + fluorescencia para CD-90 A (G) DIC para IL-17A (H) Fluorescencia para IL-17A (I) Merge: DAPI + fluorescencia para IL-17A. (J) DIC para IL-20 (K) Fluorescencia para IL-20 (L) Merge: DAPI + fluorescencia para IL-20. Magnificación 40X (**NA**: Sin estímulo de TNF- α para la evaluación constitutiva de CD-90); (**A**: Con estímulo de TNF- α para la evaluación regulada de CD-90). Magnificación 40X (Las imágenes son representativas de 9 experimentos por triplicado para cada ensayo).

Microscopía de fluorescencia en MSC a partir de pacientes con OA temprana de rodilla con un tiempo de estímulo con TNF-Alfa de 24 horas

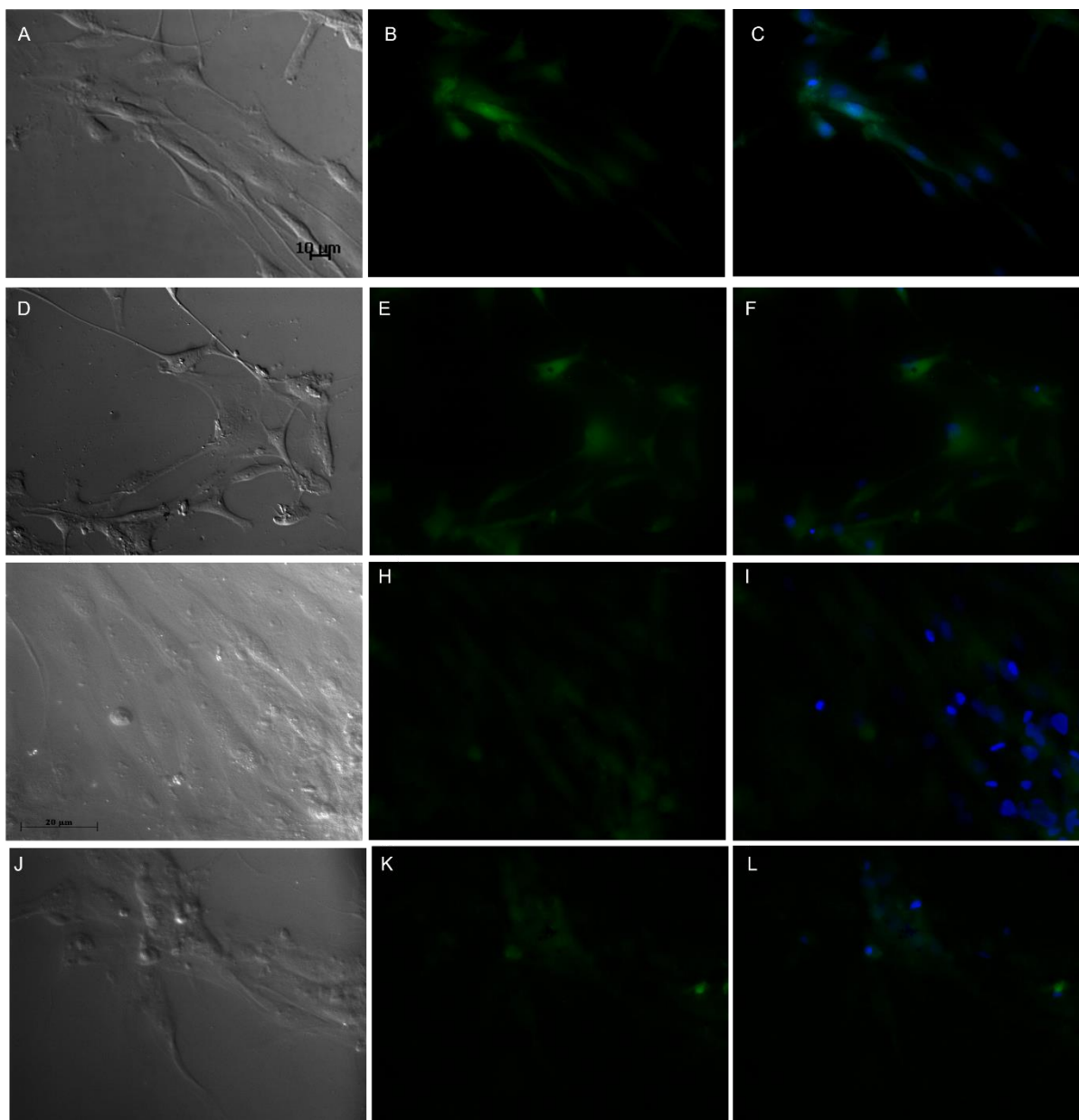


Figura 16. Microscopía de MSC provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla estímulo de TNF-Alfa de 24 horas

(A) DIC para CD-90 NA (B) Fluorescencia para CD-90 NA (C) Merge: DAPI + fluorescencia para CD-90 NA (D) DIC para CD-90 A (E) Fluorescencia para CD-90 A (F) DAPI + fluorescencia para CD-90 A (G) DIC para IL-17A (H) Fluorescencia para IL-17A (I) Merge: DAPI + fluorescencia para IL-17A. (J) DIC para IL-20 (K) Fluorescencia para IL-20 (L) Merge: DAPI + fluorescencia para IL-20. Magnificación 40X (**NA**: Sin estímulo de TNF- α para la evaluación constitutiva de CD-90); (**A**: Con estímulo de TNF- α para la evaluación regulada de CD-90). Magnificación 40X (Las imágenes son representativas de 9 experimentos por triplicado para cada ensayo).

Considerando las posibles diferencias en la producción intracelular del marcador CD-90, se evaluaron células MSC y FLS por microscopía de fluorescencia en ausencia de *TNF- α* (0 ng/mL) y en presencia de *TNF- α* (25 y 50 ng/mL), en las cuales se aumentó el tiempo establecido de la duración de estímulo a 72 horas, para verificar si había una mayor producción de CD-90 debido a que en algunos procesos inflamatorios el tiempo de contacto con el estímulo inflamatorio incrementa la actividad. En la Figura 17 se observa una producción regulada que incrementó con el tiempo de estímulo, además a partir de las micrográficas en DIC de evidencia la morfología fusiforme con un aumento en la longitud de los lamelipodios los cuales promueven las interacciones y la comunicación intercelular.

Microscopía de fluorescencia en MSC a partir de pacientes con OA temprana de rodilla con un tiempo de estímulo con TNF-Alfa de 72 horas

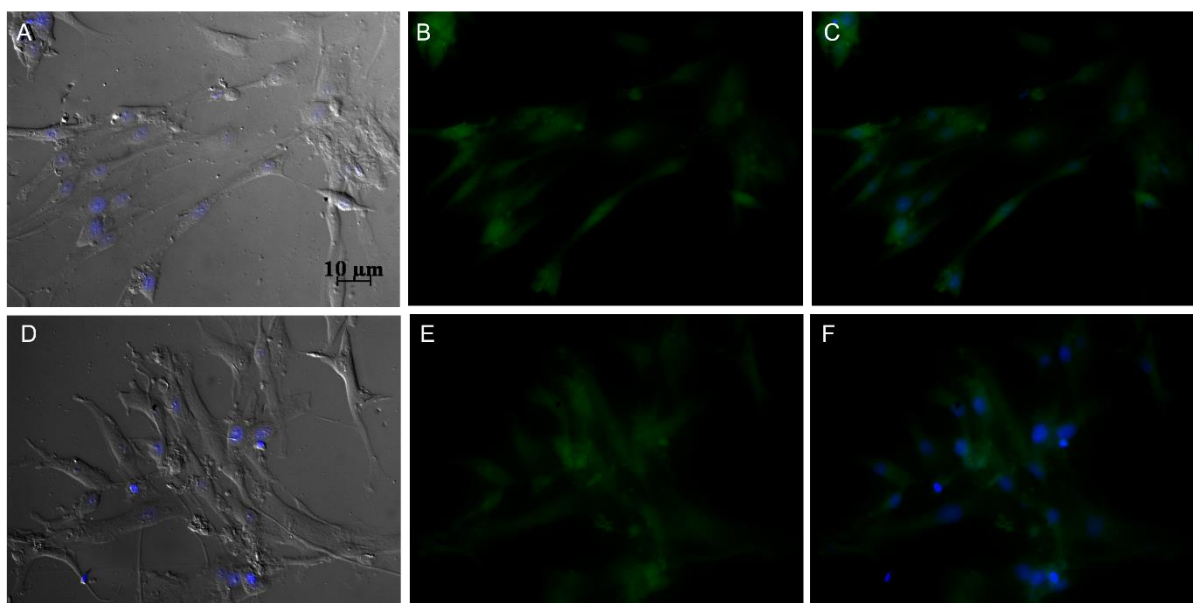


Figura 17. Microscopía de MSC provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla con estímulo de TNF-Alfa de 72 horas

(A) DIC para CD-90 NA (B) Fluorescencia para CD-90 NA (C) Merge: DAPI + fluorescencia para CD-90 NA (D) DIC para CD-90 A (E) Fluorescencia para CD-90 A (F) Merge: DAPI + fluorescencia para CD-90 A. Magnificación 40X. (**NA:** Sin estímulo de *TNF- α* para la evaluación constitutiva de CD-90); (**A:** Con estímulo de *TNF- α* para la evaluación regulada de CD-90).

Magnificación 40X. (Las imágenes son representativas de 9 experimentos por triplicado para ensayo).

Se empleó la técnica de microscopía de fluorescencia confocal para evidenciar la distribución y localización intracelular con un mayor contraste dado que permite generar secciones ópticas desde el plano de interés mejorando la definición en la localización de IL-17A e IL-20 en

células FLS, adicionalmente se obtuvieron imágenes a una mayor magnificación en este caso 60X. Como se observa en la Figura 18, posterior a la separación de canales con el software FIJI la marcación de fluorescencia se presenta en una coloración verde y los núcleos de las células en color azul, a partir de las cuales se sugiere que la localización de IL-17A e IL-20 es a nivel citoplasmático con tendencia al enriquecimiento en las zonas perinucleares.

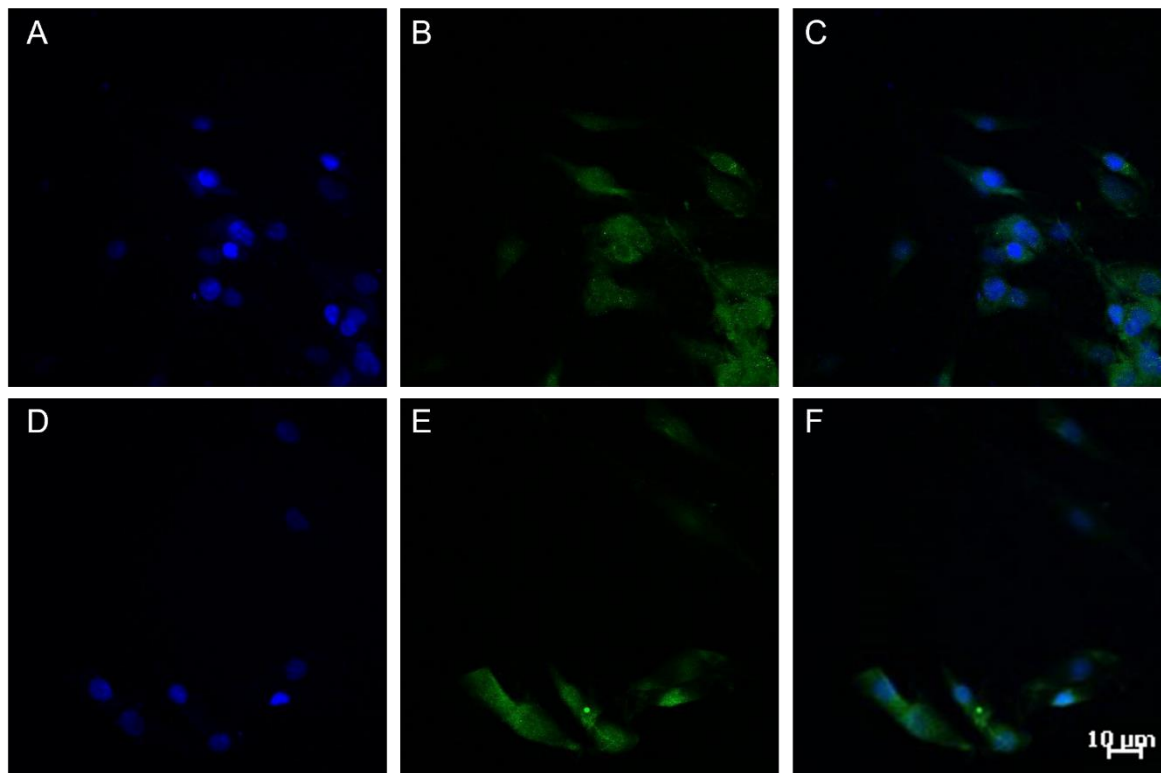


Figura 18. Microscopía de fluorescencia confocal de FLS provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla.

(A) Microscopía DAPI IL-17A + Alexa Fluor 488 (B) Fluorescencia de IL-17A + Alexa Fluor 488 (C) Merge: DAPI + Fluorescencia (D) Microscopía DAPI IL-20 + Alexa Fluor 488 (E) Fluorescencia de IL-20 + Alexa Fluor 488 (F) Merge: DAPI + Fluorescencia. Magnificación 60X. (Las imágenes son representativas de 1 experimento por triplicado para cada ensayo).

Controles de Fluorescencia para células FLS

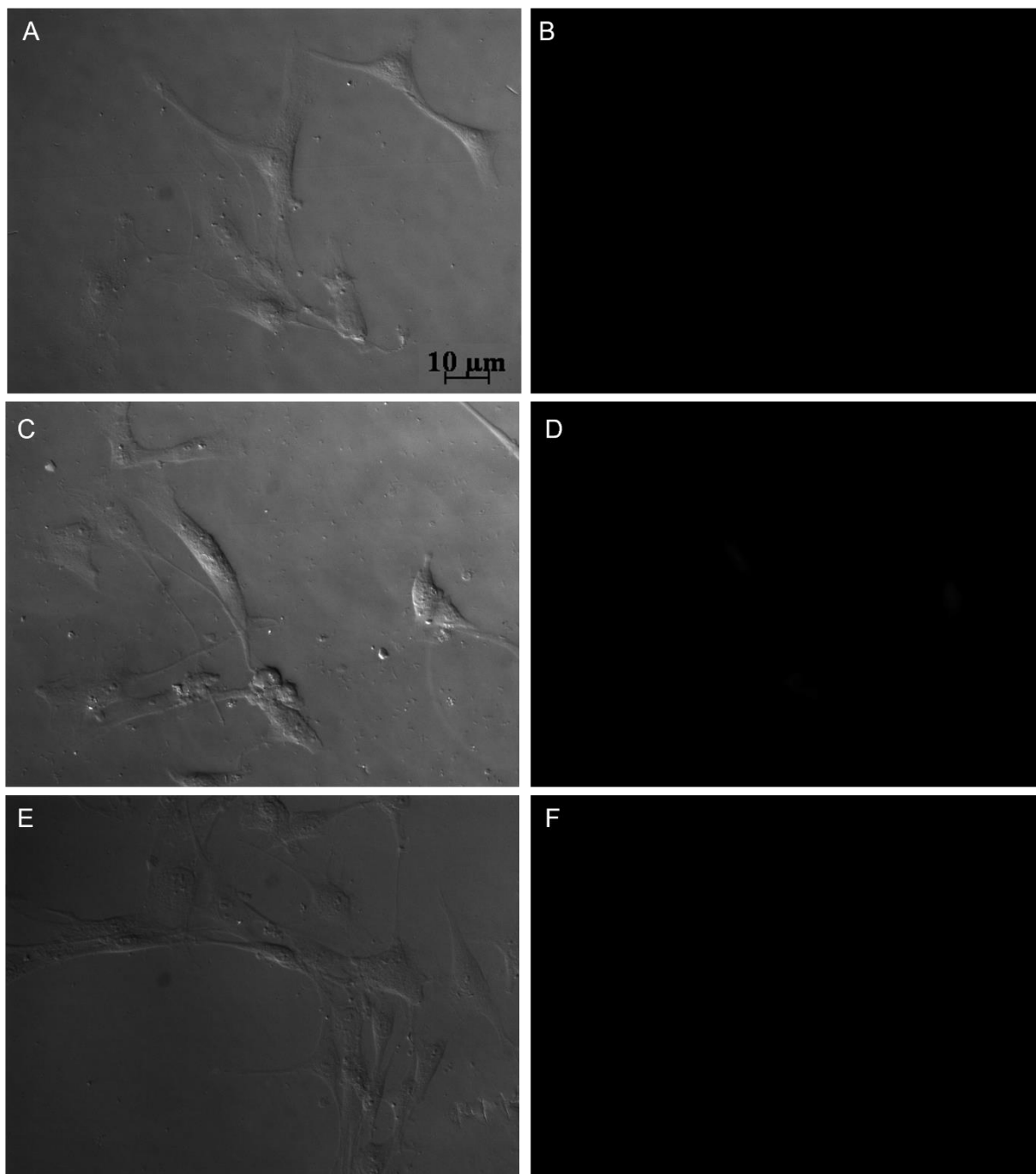


Figura 19. Controles negativos de fluorescencia en FLS provenientes de biopsia de pacientes con OA temprana de rodilla.

(A) Microscopía DIC del Control de anticuerpo primario (B) Microscopía de fluorescencia del Control de anticuerpo primario (C) Microscopía DIC del Control de anticuerpo secundario (D) Microscopía de fluorescencia del Control de anticuerpo secundario (E) Microscopía DIC de Control de autofluorescencia (Anticuerpo primario y secundario) (F) Microscopía de fluorescencia del Control de autofluorescencia (Anticuerpo primario y secundario).
Magnificación 40X. (Las imágenes son representativas de 9 experimentos por triplicado).

Controles de Fluorescencia para MSC

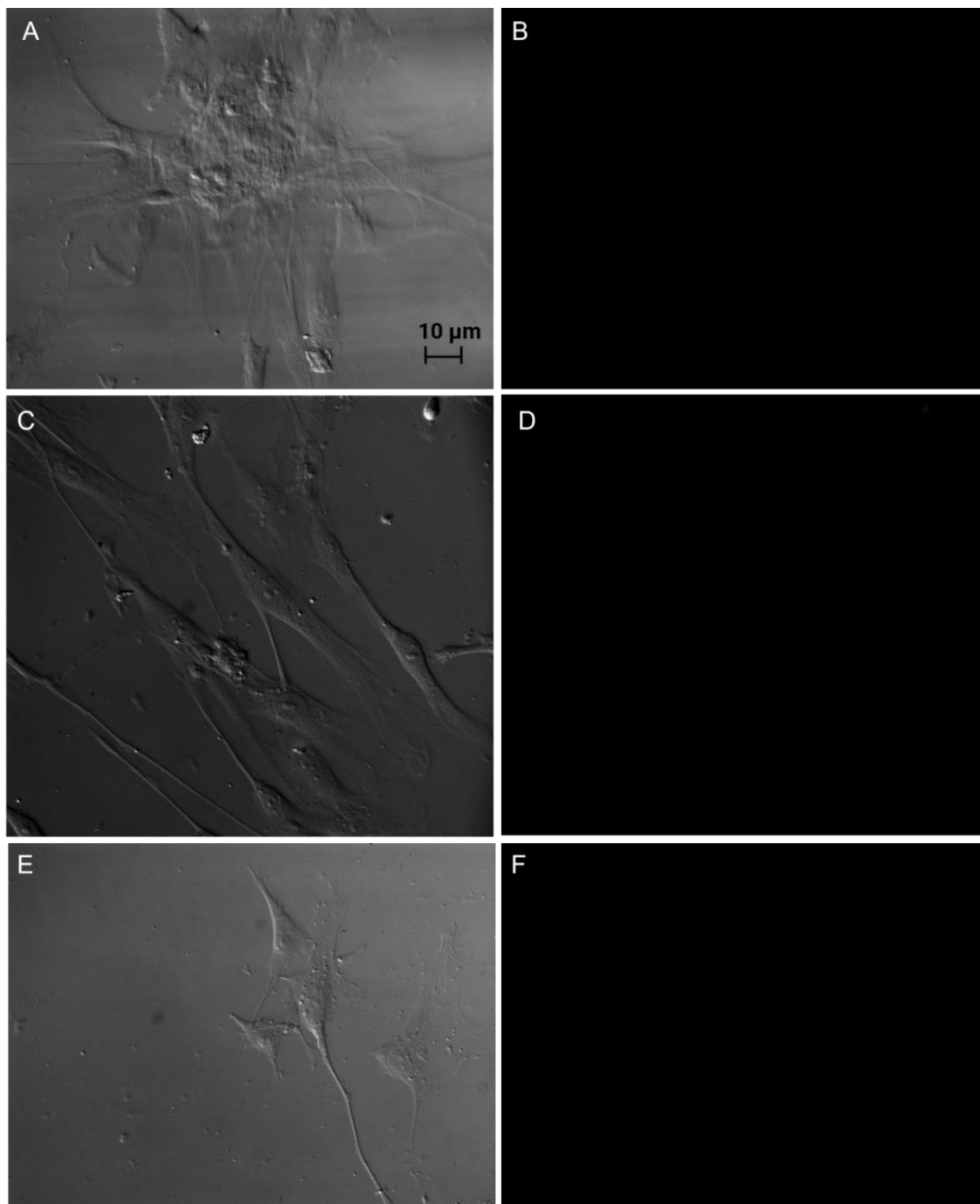
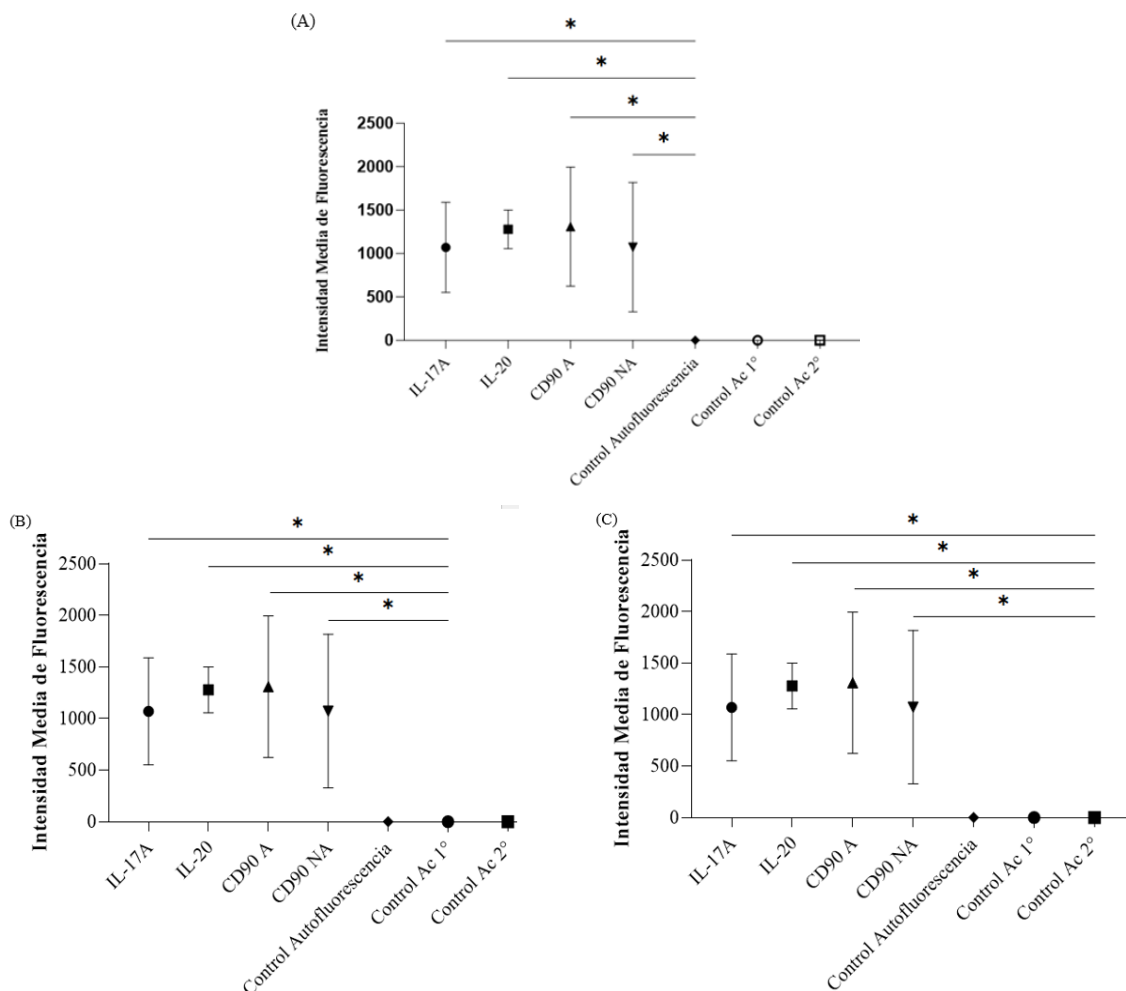


Figura 20. Controles negativos de fluorescencia en MSC provenientes de biopsia de paciente con OA temprana de rodilla.

(A) Microscopía DIC del Control de anticuerpo primario (B) Microscopía de fluorescencia del Control de anticuerpo primario (C) Microscopía DIC del Control de anticuerpo secundario (D) Microscopía de fluorescencia del Control de anticuerpo secundario (E) Microscopía DIC de Control de autofluorescencia (Anticuerpo primario y secundario) (F) Microscopía de fluorescencia del Control de autofluorescencia (Anticuerpo primario y secundario).
Magnificación 40X. (Las imágenes son representativas de 9 experimentos por triplicado).

Intensidad Media de fluorescencia



Gráfica 1. Intensidad Media de fluorescencia Mean Gray Value a partir células MSC y FLS para IL-17A e IL-20

(A) Control de autofluorescencia (B) Control de Anticuerpo primario (C) Control de Anticuerpo secundario (NA: Sin estímulo de $TNF-\alpha$ para la evaluación constitutiva de CD-90); (A: Con estímulo de $TNF-\alpha$ para la evaluación regulada de CD-90) (* $P < 0,05$).

A partir de las fotografías obtenidas por microscopía DIC, DAPI y fluorescencia, se realizó el procesamiento en el Software FIJI, por medio del cual se asignó el pseudocolor en los canales correspondientes de azul con la sonda DAPI para la marcación de núcleos celulares y el pseudocolor en verde para el marcador *CD-90-FITC* y *Alexa Fluor 488*.

Posteriormente, se realizó la semicuantificación de fluorescencia para cada experimento, que consistió en llevar a cabo la lectura de las fotografías las cuales se encontraban en un rango aproximado de 15 células por campo visual, cuyo ensayo se realizó por triplicado, de esta manera se evaluó para cada experimento la variación en intensidad de las células para

determinar los valores medios de grises de los píxeles de la selección de acuerdo con el ROI *Region of Interest* seleccionado, que consistió en el área de cada célula denotada por la variación en intensidad de la escala de grises.

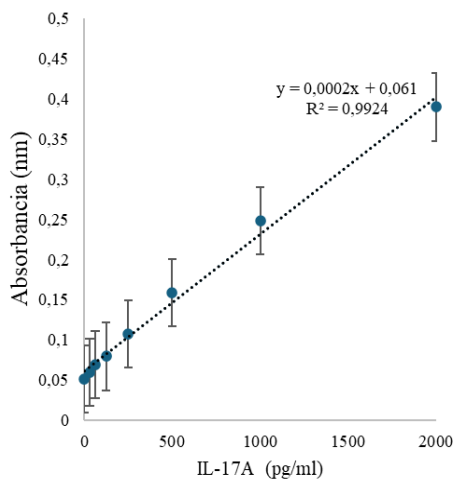
Después, por medio del Software GraphPad Prism 10.1.2 se realizó el análisis estadístico mediante una prueba Anova unidireccional, con la cual se obtuvo un valor de $P < 0,05$ (0,016). Con el objetivo de establecer comparaciones entre los grupos de experimentos: IL-17A + Alexa Fluor 488; IL-20 + Alexa Fluor 488; al igual que CD-90 en su producción constitutiva y regulada, considerando que es un marcador de superficie que se produce en forma constitutiva (*CD-90 NA*) y en forma regulada en respuesta a un estímulo en este caso conferido por TNF- α (*CD-90 A*). Sin embargo, con base en el análisis de la intensidad de fluorescencia no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre estos dos grupos para los campos visuales procesados.

Los experimentos anteriormente mencionados también se compararon respecto al grupo control de autofluorescencia, anticuerpo primario y anticuerpo secundario, mediante la prueba de comparación múltiple de Dunnett, con la cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de las medias evaluados respecto a los grupos control obteniendo valores de P menores a 0,05.

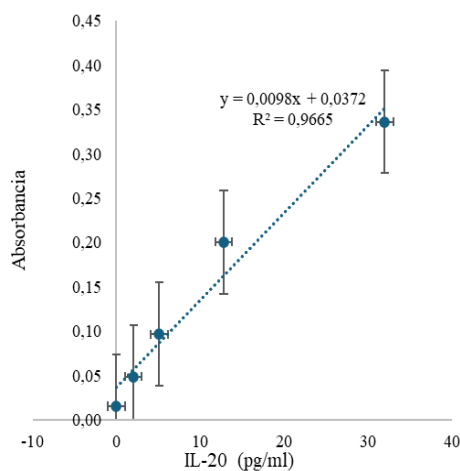
Cuantificación de IL-17A e IL-20 por Test ELISA

Para el ensayo de cuantificación de IL-17A e IL-20 por Test ELISA se incluyeron las muestras evaluadas por duplicado de 12 sobrenadantes de cultivo de pacientes con OA temprana de rodilla, 1 sobrenadante de cultivo de 1 paciente con AR que fueron adquiridos de los cultivos celulares a partir de las biopsias sinoviales de pacientes con OA y 3 muestras de líquido sinovial de 3 pacientes con OA temprana de rodilla con derrame de líquido articular; los líquidos sinoviales provienen de pacientes con OA que al momento de realizar la biopsia sinovial presentaban derrame de líquido articular.

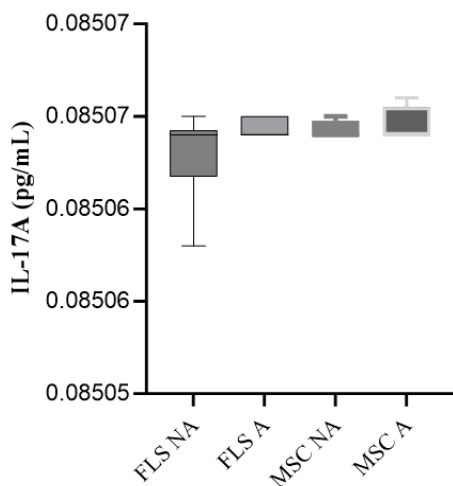
Se establecieron curvas patrón estándar para IL-17A e IL-20 mediante Test ELISA como se puede observar en las gráficas 2 y 3, en el rango de concentración de 0 pg/mL a 2000 pg/mL para IL-17A y de 0 a 32 pg/mL para IL-20. A partir de las cuales se cuantificaron los niveles de IL-17A e IL-20 en las muestras de sobrenadantes de cultivo de FLS y MSC obteniendo un valor promedio de 0,085 ng/mL con una desviación estándar de 0,0015% y en cuanto a los niveles de IL-20 se obtuvo un valor promedio de 0,0157 ng/mL con una desviación estándar de 0,14%. Indicando que los valores muestrales obtenidos tienen una baja dispersión entre los datos.



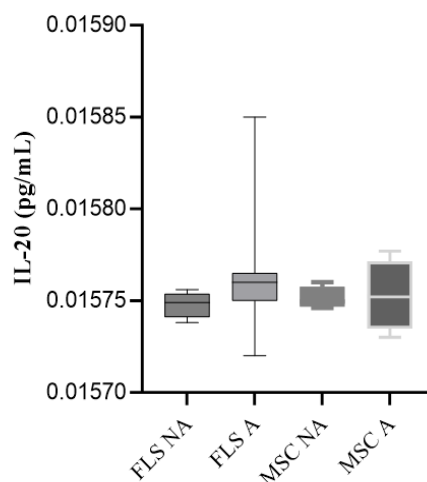
Gráfica 2. Curva patrón estándar para IL-17A.
Rango de concentración (0 pg/mL - 2000 pg/mL)



Gráfica 3. Curva patrón estándar para IL-20.
Rango de concentración (0 pg/mL - 32 pg/mL)

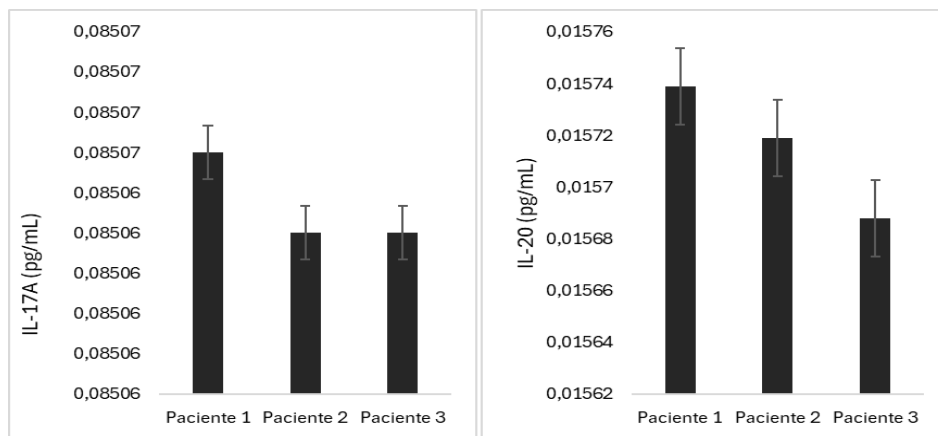


Gráfica 4. Concentraciones de IL-17A obtenidas en Sobrenadantes de cultivo de MSC y FLS. NA: Sin estímulo de TNF- α ; A: Estímulo con TNF- α



Gráfica 5. Concentraciones de IL-20 obtenidas en sobrenadantes de cultivo de MSC y FLS. NA: Sin estímulo de TNF- α ; A: Estímulo con TNF- α

De los pacientes incluidos en este estudio, 3 pacientes durante el procedimiento de biopsia sinovial presentaron derrame de líquido sinovial el cual fue incluido en el Test ELISA con el fin de identificar posibles diferencias en la concentración de IL-17A e IL-20 en comparación a los sobrenadantes de cultivo celular provenientes de las biopsias de los demás pacientes dado que el líquido sinovial extraído desde el microambiente nativo hace parte de la reacción inflamatoria y se caracteriza por tener factores proinflamatorios dentro de su composición.



Gráfica 7. Concentración de IL-17A e IL-20 en líquido sinovial. (Muestras recolectadas de 3 pacientes con OA temprana de rodilla).

Conclusiones

- Las células FLS y MSC ejercen funciones efectoras clave en el tejido sinovial, su aislamiento permitió comprender los cambios moleculares en pacientes con OA temprana de rodilla, proporcionando un modelo celular para determinar los requerimientos y condiciones ambientales óptimas en cultivo celular.
- Las células FLS y MSC permitieron identificar los cambios en respuesta a un estímulo proinflamatorio contribuyendo al estudio del componente de inflamación de bajo grado que hace parte de la OA temprana de rodilla.
- De acuerdo con los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia y del análisis de intensidad media de fluorescencia, se demostró la distribución y localización a nivel intracelular de IL-17A e IL-20 y CD-90 en pacientes con OA que se correlaciona con la existencia de la inflamación de bajo grado a nivel sinovial presente en las etapas tempranas de la OA.
- A partir de los resultados de microscopía de fluorescencia, la producción de IL-17A e IL-20 por parte de las células MSC podría soportar la contribución del tejido adiposo como fuente de este tipo de células en los cambios metabólicos asociados con la patogénesis de la OA.
- Los resultados obtenidos con la prueba ELISA para los niveles de IL-17A e IL-20 demuestran un bajo nivel de secreción en comparación con la semicuantificación a partir de microscopía de fluorescencia, esto concuerda con los reportes de literatura acerca de que los niveles secretados de diferentes factores proinflamatorios incrementan en el microambiente sinovial de una forma localizada con una producción predominante a nivel intracelular [73].
- Este estudio contribuye al conocimiento acerca de cómo la biopsia de tejido sinovial puede ser utilizada para estudiar el microambiente inflamatorio al evaluar cambios moleculares y celulares; también a largo plazo considerar la monitorización de los niveles de IL-17A e IL-20 como posibles marcadores pronóstico en la OA de rodilla y su aproximación hacia la medicina personalizada.
- En Colombia, no se encontró reportada hasta la fecha alguna caracterización sobre la OA temprana de rodilla en células provenientes de pacientes colombianos con la patología, así que este trabajo demuestra aportes al nuevo conocimiento que se

complementa con el estudio titulado *Correlación clínica, imagenológica y patológica del tejido* a partir de muestras de tejido sinovial en pacientes con OA temprana de rodilla que hizo parte del proyecto de investigación al que estuvo adscrito este trabajo.

Recomendaciones

Es recomendable realizar un ensayo con brefeldina A para evaluar las citoquinas a nivel intracelular dado que constituye un método eficaz para visualizar las respuestas celulares debido a que la identificación de IL-17A e IL-20 resultó ser compleja debido a la baja intensidad en la señal obtenida con las técnicas de microscopía de fluorescencia convencional y confocal empleadas, por este motivo podría ser útil para próximos experimentos añadir un inhibidor del transporte como brefeldina A para bloquear la secreción de las interleuquinas producidas y que se acumulen a nivel intracelular, facilitando así su detección [74].

Prospectiva

- Como continuación a este estudio se plantea la importancia de incluir fibroblastos de piel de un Individuo sano como control negativo para estudios histológicos de Hematoxilina/eosina, estudios inmunohistoquímicos, ensayos por microscopía de fluorescencia y Prueba ELISA para IL-17A e IL-20 antes y después del tratamiento con TNF- α .
- Utilizar un número mayor de pacientes con AR como control positivo de inflamación y evaluar en células aisladas FLS y MSC de estos pacientes la producción de IL-17A e IL-20 por microscopía de fluorescencia y Prueba ELISA antes y después del tratamiento con TNF- α .
- Es necesario realizar estudios con un mayor número de pacientes con OA temprana de rodilla y con AR como control positivo de inflamación, para evaluar el componente inflamatorio en la OA, manteniendo una caracterización independiente entre FLS y MSC considerando que el tejido adiposo y la grasa infrapatelar son fuente importante de MSC y adipocitos que influyen en la inflamación de bajo grado de la OA.

Bibliografía

1. Cui, A., Li, H., Wang, D., Zhong, J., Chen, Y., & Lu, H. (2020). Global, regional prevalence, incidence and risk factors of knee osteoarthritis in population-based studies. *EClinicalMedicine*, 29-30, 100587. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100587>
2. Nota Estadística de personas mayores en Colombia: hacia la inclusión y la participación (DANE y Fundación Saldarriaga Concha). Disponible en: <https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/notas-estadisticas/oct-2022-nota-estadistica-personas-mayores-en-colombia.pdf>
3. WHO. Osteoarthritis. Fecha de consulta: 04 de agosto del 2023. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/osteoarthritis>
4. Abdel-Naby, H. M., El-Tawab, S. S., Rizk, M. M., & Aboeladl, N. A. (2022). Is interleukin-17 implicated in early knee osteoarthritis pathogenesis as in rheumatoid arthritis? *Egyptian Rheumatology and Rehabilitation*, 49(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s43166-022-00130-4>
5. Attur, M., Krasnokutsky-Samuels, S., Samuels, J., & Abramson, S. B. (2013). Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*, 25(1), 136–144. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835a9381>
6. Ahmed, U., Anwar, A., Savage, R. S., Costa, M. L., Mackay, N., Filer, A., Raza, K., Watts, R. A., Winyard, P. G., Tarr, J., Haigh, R. C., Thornalley, P. J., & Rabbani, N. (2015). Biomarkers of early stage osteoarthritis, rheumatoid arthritis and musculoskeletal health. *Scientific reports*, 5, 9259. <https://doi.org/10.1038/srep09259>
7. Hashimoto M. Th17 in Animal Models of Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med*. 2017 Jul 21;6(7):73. doi: 10.3390/jcm6070073.
8. Arya RK, Jain V. Osteoarthritis of the knee joint: An overview. *JACM*. 2013;14(2):154-62.
9. Vargas E Silva, N. C. O., Dos Anjos, R. L., Santana, M. M. C., Battistella, L. R., & Marcon Alfieri, F. (2020). Discordance between radiographic findings, pain, and superficial temperature in knee osteoarthritis. *Reumatologia*, 58(6), 375–380. <https://doi.org/10.5114/reum.2020.102002>

10. 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00195-8>
11. Tschon, M., Contartese, D., Pagani, S., Borsari, V., & Fini, M. (2021). Gender and sex are key determinants in osteoarthritis not only confounding variables. A systematic review of clinical data. *Journal of Clinical Medicine*, 10(14), 3178. <https://doi.org/10.3390/jcm10143178>
12. De Sousa, E. B., Casado, P. L., Neto, V. M., Duarte, M. E. L., & Aguiar, D. P. (2014). Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: Latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(5), 112. <https://doi.org/10.1186/scrt501>
13. Gallo Vallejo, F. J., & Ruiz, V. G. (2014). Diagnóstico. Examen del líquido sinovial. *Atención Primaria*, 46, 29-31. [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(14\)70041-1](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(14)70041-1)
14. Køster, D., Egedal, J. H., Lomholt, S., Hvid, M., Jakobsen, M. R., Müller-Ladner, U., Eibel, H., Deleuran, B., Kragstrup, T. W., Neumann, E., & Nielsen, M. A. (2021). Phenotypic and functional characterization of synovial fluid-derived fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Scientific Reports*, 11(1), 22168. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01692-7>
15. Hsu, Y.-H., & Chang, M.-S. (2017). IL-20 in rheumatoid arthritis. *Drug Discovery Today*, 22(6), 960-964. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.08.002>
16. Van Dooren, F. H., Duijvis, N. W., & Te Velde, A. A. (2013). Analysis of cytokines and chemokines produced by whole blood, peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells. *Journal of Immunological Methods*, 396(1-2), 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.08.006>
17. Brzustewicz, E., & Bryl, E. (2015). The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis – Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. *Cytokine*, 76(2), 527-536. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.08.260>
18. Bettencourt, R. B., & Linder, M. M. (2010). Arthrocentesis and therapeutic joint injection: An overview for the primary care physician. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 37(4), 691-702. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2010.07.002>

19. Choi, M.-C., Jo, J., Park, J., Kang, H. K., & Park, Y. (2019). Nf-kb signaling pathways in osteoarthritic cartilage destruction. *Cells*, 8(7), 734. <https://doi.org/10.3390/cells8070734>
20. Nees, T. A., Rosshirt, N., Zhang, J. A., Reiner, T., Sorbi, R., Tripel, E., Walker, T., Schiltewolf, M., Hagmann, S., & Moradi, B. (2019). Synovial cytokines significantly correlate with osteoarthritis-related knee pain and disability: Inflammatory mediators of potential clinical relevance. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1343. <https://doi.org/10.3390/jcm8091343>
21. Ge, Y., Huang, M., & Yao, Y. (2020). Biology of interleukin-17 and its pathophysiological significance in sepsis. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01558>
22. Francisco, V., Pérez, T., Pino, J., López, V., Franco, E., Alonso, A., Gonzalez-Gay, M. A., Mera, A., Lago, F., Gómez, R., & Gualillo, O. (2018). Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. *Journal of Orthopaedic Research*, 36(2), 594-604. <https://doi.org/10.1002/jor.23788>
23. Sun, L., Wang, L., Moore, B. B., Zhang, S., Xiao, P., Decker, A. M., & Wang, H.-L. (2023). IL-17: Balancing protective immunity and pathogenesis. *Journal of Immunology Research*, 2023, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2023/3360310>
24. Kragstrup, T. W., Andersen, T., Heftdal, L. D., Hvid, M., Gerwien, J., Sivakumar, P., Taylor, P. C., Senolt, L., & Deleuran, B. (2018). The il-20 cytokine family in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Frontiers in Immunology*, 9, 2226. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02226>
25. Kouri, V.-P., Olkkonen, J., Nurmi, K., Peled, N., Ainola, M., Mandelin, J., Nordström, D. C., & Eklund, K. K. (2023). IL-17A and TNF synergistically drive expression of proinflammatory mediators in synovial fibroblasts via I κ B ζ -dependent induction of ELF3. *Rheumatology*, 62(2), 872-885. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keac385>
26. Van Hamburg, J. P., & Tas, S. W. (2018). Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*, 87, 69-81. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.006>
27. Tschammer, N. (2015). Interleukins in cancer biology: Their heterogeneous role. By arseniy e. Yuzhalin, anton g. Kutikhin. *ChemMedChem*, 10(8), 1442-1442. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500253>

28. Hsu, Y., Li, H., Hsieh, M., Liu, M., Huang, K., Chin, L., Chen, P., Cheng, H., & Chang, M. (2006). Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54(9), 2722-2733. <https://doi.org/10.1002/art.22039>
29. Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49(7), 1215-1228. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
30. Li, H., Xie, S., Qi, Y., Li, H., Zhang, R., & Lian, Y. (2018). TNF- α increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(6), 4737-4744. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6770>
31. Ayhan, E. (2014). Intraarticular injections (Corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World Journal of Orthopedics*, 5(3), 351. <https://doi.org/10.5312/wjo.v5.i3.351>
32. Shioda, M., Muneta, T., Tsuji, K., Mizuno, M., Komori, K., Koga, H., & Sekiya, I. (2017). TNF α promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. *PLOS ONE*, 12(5), e0177771. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177771>
33. Stocco, E., Barbon, S., Piccione, M., Belluzzi, E., Petrelli, L., Pozzuoli, A., Ramonda, R., Rossato, M., Favero, M., Ruggieri, P., Porzionato, A., Di Liddo, R., De Caro, R., & Macchi, V. (2019). Infrapatellar fat pad stem cells responsiveness to microenvironment in osteoarthritis: From morphology to function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 323. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00323>
34. Knoepfler, P. S. (2009). Deconstructing stem cell tumorigenicity: A roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*, 27(5), 1050-1056. <https://doi.org/10.1002/stem.37>
35. Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.-J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., Splingard, M., Dulong, J., Monnier, D., Gourmelon, P., Gorin, N.-C., Sensebé, L., & on behalf of Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire. (2010). Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: Occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*, 115(8), 1549-1553. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-219907>

36. Leung, G. J., Rainsford, K. D., & Kean, W. F. (2014). Osteoarthritis of the hand I: Aetiology and pathogenesis, risk factors, investigation and diagnosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(3), 339-346. <https://doi.org/10.1111/jphp.12196>
37. Haj-Mirzaian, A., Mohajer, B., Guermazi, A., Conaghan, P. G., Lima, J. A. C., Blaha, M. J., Bingham, C. O., Roemer, F. W., Cao, X., & Demehri, S. (2019). Statin use and knee osteoarthritis outcome measures according to the presence of heberden nodes: Results from the osteoarthritis initiative. *Radiology*, 293(2), 396-404. <https://doi.org/10.1148/radiol.2019190557>
38. Chang, J., Liao, Z., Lu, M., Meng, T., Han, W., & Ding, C. (2018). Systemic and local adipose tissue in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26(7), 864-871. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.03.004>
39. Wisniewska, E., Laue, D., Spinnen, J., Kuhrt, L., Kohl, B., Bußmann, P., Meier, C., Schulze-Tanzil, G., Ertel, W., & Jagielski, M. (2023). Infrapatellar Fat Pad Modulates Osteoarthritis-Associated Cytokine and MMP Expression in Human Articular Chondrocytes. *Cells*, 12(24), 2850. <https://doi.org/10.3390/cells12242850>
40. Stannus, O. P., Jones, G., Blizzard, L., Cicuttini, F. M., & Ding, C. (2013). Associations between serum levels of inflammatory markers and change in knee pain over 5 years in older adults: A prospective cohort study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(4), 535-540. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-201047>
41. Silva, L. B., Dos Santos Neto, A. P., Maia, S. M. A. S., Dos Santos Guimarães, C., Quidute, I. L., Carvalho, A. D. A. T., Júnior, S. A., & Leão, J. C. (2019). The role of $\text{tnf-}\alpha$ as a proinflammatory cytokine in pathological processes. *The Open Dentistry Journal*, 13(1), 332-338. <https://doi.org/10.2174/1874210601913010332>
42. Svensson, M. N. D., Zoccheddu, M., Yang, S., Nygaard, G., Secchi, C., Doody, K. M., Slowikowski, K., Mizoguchi, F., Humby, F., Hands, R., Santelli, E., Sacchetti, C., Wakabayashi, K., Wu, D. J., Barback, C., Ai, R., Wang, W., Sims, G. P., Mydel, P., Bottini, N. (2020). Synoviocyte-targeted therapy synergizes with TNF inhibition in arthritis reversal. *Science Advances*, 6(26), eaba4353. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba4353>
43. Kasamatsu A, Satoh M, Yoshida T, Kosaka T. (2010). Response of human fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid arthritis to inflammatory stimulation: Quality control findings (2+3+4). The Japanese Tissue Culture Association. <https://doi.org/10.11418/jtca.29.167>

44. Wang, Y., & Gao, W. (2021). Effects of TNF- α on autophagy of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and regulation of the NF- κ B signaling pathway. *Immunobiology*, 226(2), 152059. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152059>
45. Mattei, B., Lira, R. B., Perez, K. R., & Riske, K. A. (2017). Membrane permeabilization induced by Triton X-100: The role of membrane phase state and edge tension. *Chemistry and Physics of Lipids*, 202, 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.11.009>
46. Zhang, Z., Fan, H., Richardson, W., Gao, B. Z., & Ye, T. (2023). Management of autofluorescence in formaldehyde-fixed myocardium: Choosing the right treatment. *European Journal of Histochemistry*, 67(4). <https://doi.org/10.4081/ejh.2023.3812>
47. Orozco, Danny Joan et al. Arthritis in elderly. *Rev.Colomb.Reumatol.* [online]. 2007, vol.14, n.1, pp.66-84. ISSN 0121-8123.
48. Adams JC. Fascin protrusions in cell interactions. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 Aug;14(6):221-6. doi: 10.1016/j.tcm.2004.06.002
49. Scarpa E, Mayor R. Collective cell migration in development. *J Cell Biol.* 2016 Jan 18;212(2):143-55. doi: 10.1083/jcb.201508047.
50. Theveneau, E., & Mayor, R. (2011). Can mesenchymal cells undergo collective cell migration? The case of the neural crest: The case of the neural crest. *Cell Adhesion & Migration*, 5(6), 490-498. <https://doi.org/10.4161/cam.5.6.18623>
51. Álvarez, E. (2011). Los fibroblastos sinoviales en la patogenia de la angiogénesis reumatoide.Universidad Complutense de Madrid,
52. Benz, K., Schöbel, A., Dietz, M., Maurer, P., & Jackowski, J. (2019). Adhesion behaviour of primary human osteoblasts and fibroblasts on polyether ether ketone compared with titanium under in vitro lipopolysaccharide incubation. *Materials*, 12(17), 2739. <https://doi.org/10.3390/ma12172739>
53. Campbell, K., & Casanova, J. (2016). A common framework for EMT and collective cell migration. *Development*, 143(23), 4291-4300. <https://doi.org/10.1242/dev.139071>
54. Shreiber, D. I., Barocas, V. H., & Tranquillo, R. T. (2003). Temporal variations in cell migration and traction during fibroblast-mediated gel compaction. *Biophysical Journal*, 84(6), 4102-4114. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75135-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75135-2)

55. Munevar, S., Wang, Y., & Dembo, M. (2001). Traction force microscopy of migrating normal and h-ras transformed 3t3 fibroblasts. *Biophysical Journal*, 80(4), 1744-1757. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76145-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76145-0)
56. Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238-1246. <https://doi.org/10.1172/JCI95148>
57. Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T. M., Fullen, D. R., Pointer, J. N., Gruber, S. B., Su, L. D., Nikiforov, M. A., Kaufman, R. J., Bastian, B. C., & Soengas, M. S. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nature Cell Biology*, 8(10), 1053-1063. <https://doi.org/10.1038/ncb1471>
58. Del Rey, M. J., Izquierdo, E., Caja, S., Usategui, A., Santiago, B., Galindo, M., & Pablos, J. L. (2009). Human inflammatory synovial fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a hypoxia-inducible transcription factor 1 α /vascular endothelial growth factor-mediated pathway in immunodeficient mice. *Arthritis & Rheumatism*, 60(10), 2926-2934. <https://doi.org/10.1002/art.24844>
59. Gauthier, V., Kyriazi, M., Nefla, M., Pucino, V., Raza, K., Buckley, C. D., & Alsaleh, G. (2023). Fibroblast heterogeneity: Keystone of tissue homeostasis and pathology in inflammation and ageing. *Frontiers in Immunology*, 14, 1137659. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1137659>
60. Zha, K., Sun, Z., Yang, Y., Chen, M., Gao, C., Fu, L., Li, H., Sui, X., Guo, Q., & Liu, S. (2021). Recent developed strategies for enhancing chondrogenic differentiation of msc: Impact on msc-based therapy for cartilage regeneration. *Stem Cells International*, 2021, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2021/8830834>
61. Agar, G., Blumenstein, S., Bar-Ziv, Y., Kardosh, R., Schrift-Tzadok, M., Gal-Levy, R., Fischler, T., Goldschmid, R., & Yayon, A. (2011). The chondrogenic potential of mesenchymal cells and chondrocytes from osteoarthritic subjects: A comparative analysis. *CARTILAGE*, 2(1), 40-49. <https://doi.org/10.1177/1947603510380899>
62. Jones, E. (2011). Synovial mesenchymal stem cells in vivo: Potential key players for joint regeneration. *World Journal of Rheumatology*, 1(1), 4. <https://doi.org/10.5499/wjr.v1.i1.4>
63. Lee, J. H., Park, A., Oh, K.-J., Lee, S. C., Kim, W. K., & Bae, K.-H. (2019). The role of adipose tissue mitochondria: Regulation of mitochondrial function for the treatment of

- metabolic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4924. <https://doi.org/10.3390/ijms20194924>
64. Bertassoli, B. M., Assis Neto, A. C. D., Oliveira, F. D. D., Arroyo, M. A. M., Ferrão, J. S. P., Silva, J. B. D., Pignatari, G. C., & Braga, P. B. (2013). Mesenchymal stem cells: Emphasis in adipose tissue. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(4), 607-617. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000400011>
65. Contreras-Zentella, M. L., & Hernández-Muñoz, R. (2021). Possible gender influence in the mechanisms underlying the oxidative stress, inflammatory response, and the metabolic alterations in patients with obesity and/or type 2 diabetes. *Antioxidants*, 10(11), 1729. <https://doi.org/10.3390/antiox10111729> Adams JC. Fascin protrusions in cell interactions. *Trends Cardiovasc Med*. 2004 Aug;14(6):221-6. doi: 10.1016/j.tcm.2004.06.002
66. Nikitopoulou, I., Oikonomou, N., Karouzakis, E., Sevastou, I., Nikolaidou-Katsaridou, N., Zhao, Z., Mersinias, V., Armaka, M., Xu, Y., Masu, M., Mills, G. B., Gay, S., Kollias, G., & Aidinis, V. (2012). Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 209(5), 925-933. <https://doi.org/10.1084/jem.20112012>
67. Zafari, P., Rafiei, A., Faramarzi, F., Ghaffari, S., Amiri, A. H., & Taghadosi, M. (2021). Human fibroblast-like synoviocyte isolation matter: A comparison between cell isolation from synovial tissue and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 67, 1654-1658. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.20210706>
68. Blauvelt, A. (2016a). Ixekizumab: A new anti-IL-17A monoclonal antibody therapy for moderate-to severe plaque psoriasis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(2), 255-263. <https://doi.org/10.1517/14712598.2016.1132695>
69. Scian, R., Barrionuevo, P., Rodriguez, A. M., Arriola Benitez, P. C., García Samartino, C., Fossati, C. A., Giambartolomei, G. H., & Delpino, M. V. (2013). Brucella abortus invasion of synoviocytes inhibits apoptosis and induces bone resorption through rankl expression. *Infection and Immunity*, 81(6), 1940-1951. <https://doi.org/10.1128/IAI.01366-12>
70. Filali, S., Darragi-Raies, N., Ben-Trad, L., Piednoir, A., Hong, S.-S., Pirot, F., Landoulsi, A., Girard-Egrot, A., Granjon, T., Maniti, O., Miossec, P., & Trunfio-Sfarghiu, A.-M. (2022). Morphological and mechanical characterization of extracellular vesicles and

parent human synoviocytes under physiological and inflammatory conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13201. <https://doi.org/10.3390/ijms232113201>

71. T Teiten, M.-H., Bezdetnaya, L., Morlière, P., Santus, R., & Guillemin, F. (2003). Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan® localisation in cultured tumour cells. *British Journal of Cancer*, 88(1), 146-152. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600664>
72. Lu, Q., Haragopal, H., Slepchenko, K. G., Stork, C., & Li, Y. V. (2016). Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 8(1), 35–43.
73. Colleton, B. A., Piazza, P., & Rinaldo, C. R. (2005). Viral responses – hiv-1. In *Measuring Immunity* (pp. 578-586). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012455900-4/50312-3>
74. Bartok, B., & Firestein, G. S. (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological reviews*, 233(1), 233–255. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x>

Anexos

Anexo 1. Consentimiento informado para los pacientes incluidos en el estudio

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO

Correlación clínica, patológica e imagenológica en Osteoartritis de rodilla

BIOPSIA SINOVIAL

Institución: Hospital Universitario Nacional de Colombia

Objetivo: El grupo de investigadores de la universidad Nacional de Colombia y del Hospital Universitario Nacional de Colombia, desarrollarán el estudio de investigación "Correlación clínica, patológica e imagenológica en Osteoartritis de rodilla". Este proyecto tiene como objetivo caracterizar los cambios ultrasonográficos, histológicos y bioquímicos en pacientes con osteoartrosis de rodilla y evaluar su posible correlación.

Invitación a participar

Por lo anterior el grupo de investigadores lo invita a participar del estudio y en el presente documento se describe el procedimiento al que va a ser sometido, también se le informan las complicaciones que pueden llegar a ocurrir durante este procedimiento.

Por favor, lea atentamente este documento y realice todas las dudas que pueda tener sobre la intervención que se va a realizar.

El procedimiento a realizar es una biopsia de tejido sinovial articular de la rodilla, el cual consiste en realizar una toma de material biológico a través de una aguja canulada para obtener muestras de un tejido vivo, se realizará bajo guía ecográfica y con medidas de asepsia y antisepsia locales, posteriormente la muestra será procesada por un patólogo especialista.

Se le recuerda que este un documento legal y antes de realizar cualquier intervención, es necesario para la realización del procedimiento descrito a continuación, con la firma de este documento declara haber sido informado y haber comprendido adecuadamente la conveniencia y el objetivo de la biopsia sinovial

Riesgos relacionados de la intervención

Las posibles complicaciones derivadas del procedimiento son: dolor en el área de la punción, infección local o intra articular, lesión nerviosa, lesión vascular y de tejidos blandos, pérdida de la sensibilidad local, sangrado en el sitio de punción o intra articular.

Este procedimiento está indicado como material de investigación y como estudio complementario para lesiones que no pueden ser diagnosticadas por otros métodos y se enmarca en el diagnóstico diferencial de enfermedades inflamatorias articulares.

Beneficios de participar en el estudio

Los beneficios del procedimiento serán aplicables para futuras investigaciones que podrían conducir a cambios en el tratamiento de los pacientes que tengan un componente inflamatorio característico, así mismo orientaría y complementaría el manejo clínico, terapéutico de los pacientes y apoyaría a la confirmación del diagnóstico clínico del participante.

En caso de que usted sufra algún daño o lesión grave como resultados de su participación en el estudio, el grupo de investigadores ha contratado una póliza de seguros con Seguros del Estado que cubrirá los gastos médicos derivados de lesiones directas producidas por la intervención del estudio (Póliza 2103101020000). Esta póliza se activa cuando se analice el caso por parte del equipo de investigadores. Usted tendrá que contactar al investigador principal **Doctor Federico Rondón** Herrera al Teléfono 3102621370 o al Sub investigador: **Doctor Oscar Rodrigo Vargas** al teléfono 338481351.

Este estudio ha sido revisado y aprobado localmente por el comité de ética en investigación: COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO NACIONAL DE COLOMBIA, este comité existe para asegurarse de que los participantes de la investigación estén protegidos contra daños que puedan ocurrir por el estudio. Si desea contactarlos al respecto, ahora o más tarde, sus datos de contacto son:

Presidente: Mario Orlando Parra Pineda
Correo electrónico: 601 390 48 88
Teléfono de contacto: investigacion@hun.edu.co

Certificado de Consentimiento del participante

Mediante la firma de este documento declaró que se me ha explicado la complementariedad en el diagnóstico de este procedimiento, que se ha estudiado y considerado la intervención que se me informa, expresando mi voluntad para que se me realice el procedimiento objeto del presente consentimiento. Confirmando que todas mis dudas han sido aclaradas y estoy completamente de acuerdo con el procedimiento propuesto.

Doy adicionalmente mi consentimiento para la aplicación de anestesia local que considere el médico para la intervención.

 Nombre del participante

 Numero de identificación

 Firma

 Fecha

 Personal del estudio que explica el consentimiento_

 Nombre

 Numero de identificación

Anexo 2. Aval comité de ética Hospital Universitario Nacional



Bogotá, D.C., 01 de septiembre de 2022

Doctora
OSCAR RODRIGO VARGAS VANEGAS
Residente de Reumatología
Universidad Nacional de Colombia

Doctor
FEDERICO RONDON HERRERA
Profesor titular Facultad de Medicina
Unidad Reumatología
Universidad Nacional de Colombia

Referencia: Resometimiento del proyecto "*Correlación clínica, patológica e imagenológica en Osteoartritis de rodilla*" (ID: CEI-2022-06-02) recibido el 30 de agosto de 2022

EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO NACIONAL DE COLOMBIA CERTIFICA

Que el proyecto de investigación titulado "*Correlación clínica, patológica e imagenológica en Osteoartritis de rodilla*" (ID: CEI-2022-06-02) cuyo investigador principal es el doctor Oscar Rodrigo Vargas Vanegas, fue valorado por el Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Nacional de Colombia (CEI-HUN) previa verificación del quórum, en la octava sesión ordinaria del 2022 (18 de agosto de 2022). La evaluación tuvo en cuenta la pertinencia del proyecto, su rigor metodológico, la calidad científica y el cumplimiento de la normatividad ética, técnica y científica a la que están sujetas investigaciones como la propuesta.

El proyecto implica investigación en seres humanos, y es compatible con las Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud, descritas en la Resolución 8430 de 1993 y la Resolución 2378 de 2008. La categoría de riesgo a los seres humanos a la que el proyecto se ajusta es la de investigación sin riesgo.

Sus miembros revisaron y aprobaron los siguientes documentos del proyecto:

1. Carta de presentación.
2. Protocolo de investigación, versión 3.0 de agosto de 2022.
3. Resumen ejecutivo.
4. Consentimiento informado.
5. Hojas de vida resumida y certificados de Buenas Prácticas Clínicas de los investigadores:
 - Oscar Rodrigo Vargas Vanegas
 - Federico Rondón Herrera
 - Ángel Yobany Sánchez Merchán
 - Ángela Patricia Rojas Rojas
 - Luis Javier Cajas Santana

Concepto: El CEI-HUN precisa que el estudio cumple los requisitos de calidad y rigor exigidos, por lo tanto, se permite APROBAR el protocolo y los documentos previamente mencionados.

Declaración de intereses: Los miembros del Comité declaran no tener intereses en la evaluación de este protocolo con el Investigador.

[Página 1 de 2]

Hospital Universitario Nacional de Colombia
Calle 44 # 59 - 75 Bogotá, Colombia
TEL : 390 48 88
www.hun.edu.co



Nombre	Cargo
Mario Orlando Parra Pineda	Presidente del CEI-HUN Médico, Especialista en Ginecología y Obstetricia, Magister en Educación, Doctorado en Bioética
Andrés Felipe Patiño	Médico Cirujano, MSc (c) Epidemiología Clínica
Clara Eugenia Arteaga Díaz	Médica, Magíster en Genética Humana, Magíster en Bioética
Carol Cristina Guarnizo Herreño	Odontóloga, Magíster en Salud Pública, Doctora en Epidemiología
Gloria Lucía Arango Bayer	Enfermera, Especialista en Bioética, Magíster en Administración de Salud, Doctora en Bioética,
Itali Linero Segrera	Odontóloga, Especialista en Cirugía Maxilofacial, Doctora en Biotecnología
Jesús Becerra Camargo	Químico Farmacéutico, Magíster en Administración de Salud, Magister en Atención Farmacéutica, Doctor en Farmacia Asistencial
Laura Milena Aldana	Abogada, Maestrante en Filosofía del Derecho y Teoría Jurídica
María Cristina Plazas	Matemática, Magister en Física Radiológica y Médica, Doctora en Física de la Radiobiología Médica, Representante de la Comunidad
Yimy Francisco Medina	Médico, Especialista en Medicina Interna, Especialista en Reumatología, Magíster en Epidemiología Clínica

La sede del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Nacional de Colombia se encuentra ubicada en la Calle 44 # 59-75 (Bogotá, Colombia). El CEI-HUN se adhiere a las disposiciones contempladas en la Declaración de Helsinki y se rige bajo los lineamientos jurídicos y éticos del país, que se encuentran consignadas en las resoluciones 8430 de 1993 y 2378 de 2008 del Ministerio de Protección Social.

Lo anterior consta en el acta CEI-HUN-ACTA-2022-08.

Cordialmente,



MARIO ORLANDO PARRA PINEDA
Presidente
Comité de Ética de la Investigación
Hospital Universitario Nacional de Colombia