

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS TRATAMIENTOS CON ÁCIDO HIALURÓNICO Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN UN MODELO IN VITRO DE OSTEOARTROSIS”**

**Por:**

**M.C.P. Eduardo Salvador Gómez García**

**Como requisito parcial para obtener el grado de Especialidad Médica en Ortopedia y Traumatología.**

**Diciembre, 2018**

**“EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS TRATAMIENTOS CON ÁCIDO  
HIALURÓNICO Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN UN MODELO IN  
VITRO DE OSTEOARTROSIS”**

Aprobación de la Tesis

---

**Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos**  
Director de Tesis

---

**Dr. med. Santiago de la Garza Castro**  
Coordinador de Enseñanza

---

**Dr. med. Carlos Alberto Acosta Olivo**  
Coordinador de Investigación

---

**Dr. med. Víctor Manuel Peña Martínez**  
Jefe de Servicio o Departamento

---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se llevó a cabo en el Servicio de Ortopedia y Traumatología y en el Laboratorio de Ingeniería Tisular del Banco de Hueso y Tejidos del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), bajo la Dirección del Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos.

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios por permitirme vivir plenamente y feliz, por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida y lograr terminar mi residencia en ortopedia y traumatología.

A mi esposa Lorena De Hoyos, por estar ahí en todos los momentos difíciles, ayudarme y apoyarme en cada una de las etapas de mi vida tanto personal como profesional, te mereces que de lo mejor de mí para superarme y recompensarte por todo el apoyo que me has dado a lo largo de nuestra relación y este logro no solamente es mío, también es tuyo y sin tu apoyo no lo hubiera conseguido. Me brindaste paz y tranquilidad cuando lo necesitaba y me permitiste desarrollarme en el ámbito profesional, así como en el personal y espiritual.

A mi madre, por todo el apoyo incondicional que me diste desde el momento en el que nací has estado ahí para mí, anteponiendo tus necesidades a las mías y sirviendo como un apoyo y guía a lo largo de todas las etapas de mi vida, gracias mamá por estar siempre ahí, por ayudarme a sobrellevar todo y lograr superar mis obstáculos.

A mi padre, por siempre brindarme su apoyo incondicional y por ser siempre una voz de razón y experiencia a lo largo de mi camino. Gracias papá por ser un ejemplo a seguir tanto como persona como médico. Y por inspirarme a estudiar esta carrera y superarme día a día, no solamente has sido un buen padre si no también un amigo.

A mis hermanas, Laura y Montse que han estado siempre conmigo apoyándome, viendo cómo me he desarrollado en mi vida personal y profesional, siempre han sido mis mejores amigas y me han ayudado a ser una mejor persona.

A mis cuñados y suegros, Rigo, Roberto, Lorena, Roby, Ale, Daniel, Esteban y María, muchas gracias por su apoyo tanto a mi como a Lorena a lo largo de todos estos años, siempre me han hecho sentir muy querido y estoy muy agradecido por todo lo que han hecho por mí.

A todos mis maestros, en especial al Dr. Félix Vilchez, Dr. Víctor Peña, Dr. Carlos Acosta, Dr. Santiago De la Garza y al Dr. Mario Simental que, gracias a sus conocimientos, experiencia y enseñanzas, facilitaron mi enseñanza para lograr ser quien soy ahora. Estaré eternamente agradecido por las capacidades

y habilidades que me ayudaron a forjar, espero que sirvan para mejorar el mundo en el que vivimos.

A todos mis pacientes, pues cada uno de ellos ha sido un libro de conocimiento y aprendizaje que no se puede medir, obteniendo por medio de ellos: experiencia, sabiduría, empatía y vocación.

Y finalmente quiero agradecer a mis compañeros de residencia Luis, Anwar, Mariel y Emmanuel, ya que junto a ellos viví esta etapa de mi vida que este mes culmina. Preparándonos juntos para iniciar una vida nueva como traumatólogos y ortopedistas.

A todos ustedes: Gracias, Totales!

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
CAPÍTULO I.....	viii
1. RESUMEN.....	viii
CAPÍTULO II.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1. ANTECEDENTES.....	3
2.1.1. Osteoartrosis.....	3
2.1.1.1. Definición.....	3
2.1.1.2. Epidemiología.....	3
2.1.2. Patofisiología de la Osteoartrosis (Inflamación).....	4
2.1.2.1. Características del Cartílago Articular en la Osteoartrosis.....	5
2.1.2.2. Características de la Membrana Sinovial en la Osteoartrosis.....	6
2.1.3. Diagnóstico de la Osteoartrosis.....	7
2.1.4. Tratamiento de la Osteoartrosis.....	8
2.1.5. Terapias Alternas para el Tratamiento de la Osteoartrosis.....	11
2.1.6. Uso del Ácido Hialurónico No Animal Estabilizado (NASHA) en el Tratamiento de la Osteoartrosis.....	12
2.1.6.1. Definición.....	12
2.1.6.2. Uso del NASHA en estudios preclínicos y clínicos.....	13
2.1.7. Uso de las Células Madre Mesenquimales (CMM) en el Tratamiento de la Osteoartrosis.....	13
2.1.7.1. Definición.....	13
2.1.7.2. Aplicación en el tratamiento de la Osteoartrosis.....	14
2.1.7.3. Uso del medio de cultivo de CMM.....	14
2.1.8. Modelos de Estudio <i>in vitro</i> de Osteoartrosis.....	15
CAPÍTULO III.....	16
3. HIPÓTESIS.....	16
CAPÍTULO IV.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
CAPÍTULO V.....	18
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18

5.1. Pacientes y Diseño del Estudio.....	18
5.2. Obtención y Cultivo de los Explantes de los Tejidos.....	18
5.3. Obtención de CMM Derivadas de Tejido Adiposo.....	19
5.4. Inmunofenotipificación de CMM Derivadas de Tejido Adiposo Mediante Citometría de Flujo.....	20
5.5. Extracción de ARN Total y Análisis de Expresión Génica por PCR en Tiempo Real.....	21
5.6. Liberación de Glucosaminoglucanos.....	22
5.7. Producción de Óxido Nítrico.....	23
5.8. Análisis Estadístico.....	23
CAPÍTULO VI.....	25
6. RESULTADOS.....	25
6.1. Características de los Pacientes.....	25
6.2. Inmunofenotipificación de CMM Derivadas de Tejido Adiposo.....	25
6.3. Liberación de GAG al Medio de Cultivo.....	27
6.4. Cuantificación de ON.....	28
6.5. Ensayos de Expresión Génica.....	28
6.5.1. Expresión de IL-1 $\beta$ .....	28
6.5.2. Expresión de MMP13.....	29
6.5.3. Expresión de ADAMTS5.....	30
6.5.4. Expresión de TIMP1.....	31
CAPÍTULO VII.....	32
7. DISCUSIÓN.....	32
CAPÍTULO VIII.....	35
8. CONCLUSIONES.....	35
CAPÍTULO IX.....	36
9. ANEXOS.....	36
9.1. Carta de Aprobación por parte del Comité de Ética en Investigación.....	36
9.2. Carta de Consentimiento Informado.....	37
CAPÍTULO X.....	43
10. BIBLIOGRAFÍA.....	43
CAPÍTULO XI.....	50
11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estudio de imagen que muestra una rodilla con OA.....	8
Figura 2.	Análisis por citometría de flujo de las CMM.....	26
Figura 3.	Representación gráfica (Dot-Plot) para dobles marcajes de CMM.....	26
Figura 4.	Glucosaminoglucanos (GAG) liberados al medio de cultivo por parte de los explantes de cartílago y membrana sinovial.....	27
Figura 5.	Producción de óxido nítrico (ON) por parte de los explantes de cartílago y membrana sinovial.....	28
Figura 6.	Expresión génica relativa de IL-1 $\beta$ analizada por PCR en tiempo real en explantes de cartílago y membrana sinovial.....	29
Figura 7.	Expresión génica relativa de MMP13 analizada por PCR en tiempo real en explantes de cartílago y membrana sinovial.....	30
Figura 8.	Expresión génica relativa de ADAMTS5 analizada por PCR en tiempo real en explantes de cartílago y membrana sinovial.....	30
Figura 9.	Expresión génica relativa de TIMP1 analizada por PCR en tiempo real en explantes de cartílago y membrana sinovial.....	31



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Resumen de recomendaciones para el manejo de la OA.....	10
Tabla 2.	Nombre y símbolo de los genes analizados por qPCR.....	22

## ABREVIATURAS

ADAMTS-5	Metaloproteasa con trombospondina 1 motivo 5
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AH	Ácido hialurónico
AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
B2M	Beta-2-microglobulina
CD73	<i>Cluster of differentiation 73</i>
CD90	<i>Cluster of differentiation 90</i>
CD105	<i>Cluster of differentiation 105</i>
COX-2	Ciclooxigenasa-2
C <sub>T</sub>	Threshold cycle
DMB	Azul de dimetilmetileno
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GAG	Glicosaminoglicanos
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 beta
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasas de matriz
MMP13	Metaloproteasa de matriz 13
NASHA	<i>Non-Animal Stabilized Hyaluronic Acid</i>
OA	Osteoartrosis
OATS	<i>Osteochondral Autograft Transfer System</i>
ON	Óxido nítrico
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SBF	Suero bovino fetal
TIMP1	Inhibidor tisular de metaloproteasas 1

# CAPÍTULO I

## 1. RESUMEN

Eduardo Salvador Gómez García

Fecha de Graduación: Diciembre, 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Servicio de Ortopedia y Traumatología, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”

**Título de la Tesis:** Efecto antiinflamatorio de los tratamientos con ácido hialurónico y células madre mesenquimales en un modelo *in vitro* de osteoartritis.

**Número de páginas:** 61

**Área de Estudio:** Ciencias de la Salud.

**Introducción.** La osteoartritis (OA) de rodilla es una enfermedad degenerativa y progresiva del cartílago articular y se caracteriza por presentar un estado catabólico en el cartílago inducido por citocinas proinflamatorias. **Objetivo.** Investigar y comparar el efecto antiinflamatorio de las terapias con NASHA y CMM en el tratamiento de la OA de rodilla en un modelo *in vitro*. **Material y Métodos.** Se recuperó el tejido articular proveniente de los cóndilos femorales y cápsula sinovial de siete pacientes sometidos a reemplazo total de rodilla. Se desarrolló un sistema de cocultivo para las los explantes obtenidos de cada paciente. Se generaron 4 grupos experimentales: control (medio basal), IL-1 $\beta$  (medio basal + IL-1 $\beta$ ), AHNAE (medio suplementado con ácido hialurónico + IL-1 $\beta$ ) y células madre (medio suplementado de células madre + IL-1 $\beta$ ). De cada grupo se obtuvieron muestras a las 0, 48 y 72 horas para realizar extracción de ARN total en cartílago y sinovial para el análisis de expresión génica. Se almacenó el medio de cultivo sobrenadante a -80°C para cuantificar glicosaminoglicanos (GAG) y óxido nítrico. **Resultados.** Se encontró una disminución en la liberación de GAG en los explantes enriquecidos con AHNAE y medio de cultivo de CMM a las 48 ( $p < 0.05$ ) y 72 h ( $p < 0.01$ ). La producción de óxido nítrico fue significativamente menor solo en el grupo tratado con medio de cultivo de CMM a las 72 h ( $p < 0.05$ ). Solo el medio de cultivo de CMM redujo significativamente la expresión de IL-1 $\beta$  a las 72 h en el cartílago ( $p < 0.05$ ). Tanto el AHNAE como las CMM disminuyeron significativamente la expresión de ADAMTS5 y MMP13 a las 72 h ( $p < 0.05$ ). En la membrana sinovial, se encontró una disminución en la expresión de IL-1 $\beta$  en los cultivos con AHNAE y medio de cultivo de CMM. Únicamente en el grupo de CMM disminuyó importantemente la expresión de ADAMTS5 y MMP13 a las 72 h ( $p < 0.05$ ). Ambos tratamientos incrementaron la expresión de TIMP-1 tanto en cartílago como en sinovial ( $p < 0.05$ ). **Conclusiones.** Los tratamientos con AHNAE (DUROLANE®) y CMM mostraron ser una opción terapéutica que puede ayudar para contrarrestar el catabolismo producido por el estado inflamatorio en la OA de rodilla. Sin embargo, los mediadores antiinflamatorios producidos por las CMM promueven una menor expresión de marcadores inflamatorios en nuestro modelo de estudio.

---

Dr. med. José Félix Vilchez Cavazos  
Director de Tesis

## CAPÍTULO II

### 2. INTRODUCCIÓN

La osteoartrosis (OA) de rodilla es una enfermedad crónica y progresiva que afecta a más del 20% de las personas mayores de 45 años.<sup>1</sup> Se ha estimado que esta condición afectará casi a la mitad de la población en algún punto de sus vidas por medio de manifestaciones como dolor y disminución de la capacidad funcional.<sup>2</sup> Más que una entidad patológica, la OA debe ser vista como una enfermedad multifactorial, en donde intervienen factores genéticos, mecánicos, metabólicos y hormonales.<sup>3-5</sup>

El tratamiento ideal para la OA se basa en el bloqueo de la actividad catabólica en el cartílago y en incrementar la regeneración del cartílago normal. La primera aproximación en el tratamiento de la OA involucra el uso amplio de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y analgésicos que permiten el alivio de los síntomas por un periodo corto de tiempo pero que no proveen un efecto aparente que modifique el curso de la enfermedad.<sup>6,7</sup> Hasta ahora, las terapias disponibles para el manejo de la OA comúnmente se basan en la paliación del dolor, mejorar el movimiento funcional y prevenir la degeneración. Debido a ello, surge la necesidad de desarrollar alternativas terapéuticas que puedan prevenir la destrucción del cartílago y los tejidos involucrados en la articulación de la rodilla o estimular su adecuada reparación.

Una de las opciones de tratamiento no quirúrgico para la OA de rodilla es la infiltración intraarticular de ácido hialurónico (AH). Existen en el mercado diversos productos de AH para el tratamiento de la OA. Uno de ellos es el AH no animal estabilizado (NASHA [*Non-Animal Stabilized Hyaluronic Acid*], por sus siglas en inglés) comercializado bajo la marca DUROLANE®. El NASHA es un tipo de AH que comienza con la síntesis bacteriana del AH, el cual posteriormente se purifica y se estabiliza en un proceso cuidadosamente controlado que involucra un entrecruzamiento molecular.<sup>8</sup> Sin embargo, el

efecto antiinflamatorio a nivel celular y molecular de este tipo de AH no ha sido estudiado.

Por otro lado, ya se ha investigado el uso de las células madre mesenquimales (CMM) como posible terapia celular en el tratamiento de la OA con resultados prometedores.<sup>9,10</sup> Las CMM derivadas de tejido adiposo se han investigado ampliamente por su papel importante en la regeneración de tejidos e inmunomodulación.<sup>11,12</sup> De forma interesante, se ha descrito que las CMM son capaces de secretar una amplia variedad de mediadores tróficos que pueden ejercer efectos paracrinos sobre otros tipos celulares.<sup>13</sup>

En este estudio quisimos evaluar y comparar la respuesta antiinflamatoria de los tratamientos con un tipo particular de AH (NASHA, DUROLANE®) y del medio de cultivo acondicionado a partir de CMM derivadas de tejido adiposo, utilizando un co-cultivo de explantes de cartílago y membrana sinovial como modelo *in vitro* de OA.

## 2.1 ANTECEDENTES

### 2.1.1. Osteoartrosis

#### 2.1.1.1. Definición

La OA es la forma más común de artrosis, es una afección crónico-degenerativa de las articulaciones sinoviales en las que se produce un ablandamiento y desintegración progresivos del cartílago articular.<sup>14</sup> La OA sigue siendo considerada la enfermedad articular más común y una de las principales causas de discapacidad musculoesquelética en todo el mundo. Una de sus características principales es la degeneración progresiva del cartílago articular, que resulta en el estrechamiento del espacio articular, la formación de osteofitos y la esclerosis subcondral. En conjunto, todo lo anterior se traduce clínicamente como dolor articular crónico, rigidez articular, limitación del movimiento y grado variable de inflamación.<sup>15</sup> La rodilla es la articulación que se ve más frecuentemente afectada, seguida de las articulaciones de la cadera y la mano.<sup>16</sup>

En general, la OA se clasifica como primaria o idiopática cuando no hay una causa discernible evidente y, secundaria, cuando se manifiesta un factor desencadenante. La OA idiopática, en particular, posee un componente genético significativo, y varios estudios de asociación genética han demostrado su relación con diferentes genes, como aquellos relacionados con la inflamación.<sup>17</sup>

#### 2.1.1.2. Epidemiología

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las lesiones del sistema musculoesquelético son la causa más común de dolor severo a largo plazo y de incapacidad física, lo cual afecta a millones de personas alrededor del mundo.<sup>18</sup>

Actualmente se considera que la incidencia y prevalencia de la OA es alta, sin embargo, se predice que éstas se dispararán en las próximas décadas debido al envejecimiento de la población, el aumento de las tasas de obesidad y la alta incidencia de las lesiones traumáticas de rodilla.<sup>19-21</sup> Se ha estimado que alrededor del 30% de las personas entre 45 y 60 años de edad y más del 80% de los mayores de 80 años, presentan OA en al menos una articulación.<sup>16,22</sup>

La OA es una de las principales causas de discapacidad en los Estados Unidos, con más de 22.7 millones de personas que refieren limitaciones en sus actividades diarias atribuibles directamente con la OA.<sup>23</sup> En México, los datos más recientes referentes a la prevalencia de OA en población adulta estimaron, en 2011, una prevalencia promedio del 10.5%; sin embargo, en los estados de Ciudad de México, Nuevo León y Chihuahua, la prevalencia estimada fue del 12.8, 16.3 y 20.5%, respectivamente.<sup>24</sup>

La asociación entre la edad avanzada, la obesidad y el incremento en las tasas de incidencia de la OA de rodilla son bien conocidas. Sin embargo, se ha sugerido que estos principales factores de riesgo son insuficientes para explicar el exponencial incremento en la prevalencia de OA de rodilla.<sup>25</sup> Por lo que se ha hipotetizado de la actividad física podría ser un factor importante, ya que puede dar lugar a articulaciones con carga mecánica crónica baja con menor contenido de proteoglicanos y músculos más débiles que no pueden proteger y estabilizar las articulaciones.<sup>25</sup>

### **2.1.2. Patofisiología de la Osteoartrosis (Inflamación)**

Durante mucho tiempo se creyó que la OA era exclusivamente una enfermedad degenerativa del cartílago; sin embargo, la evidencia más reciente ha demostrado que la OA es una entidad multifactorial, que involucra múltiples factores causantes como trauma, fuerzas mecánicas, inflamación, reacciones bioquímicas y trastornos metabólicos.<sup>26</sup> También es sabido que el cartílago articular no es el único tejido involucrado. Dada su falta de irrigación sanguínea



e inervación, el cartílago, por sí solo, no es capaz de producir inflamación o dolor al menos en las etapas iniciales de la enfermedad. Por lo tanto, el dolor ocasionado por la OA se deriva principalmente de los cambios en los componentes no cartilaginosos de la articulación, como la membrana sinovial, el hueso subcondral, los ligamentos y los músculos periarticulares.<sup>27</sup>

A diferencia de la artritis inflamatoria, la inflamación en la OA es una inflamación crónica y de bajo grado, que involucra principalmente mecanismos inmunitarios innatos. El papel de la inflamación no está del todo comprendido, y actualmente se debate si la reacción inflamatoria desencadena los cambios en la OA o, en cambio, si la inflamación es secundaria a los cambios de la OA.<sup>28</sup>

En un inicio, la OA se definió como una artropatía no inflamatoria, pero ahora se reconoce que existe un componente inflamatorio importante en esta enfermedad.<sup>29</sup> Además de las células sinoviales, también se sabe que los condrocitos articulares y otras células de las articulaciones diartrodiales expresan mediadores inflamatorios. Por lo que se ha propuesto que atacar las vías de inflamación podría ser una estrategia prometedora para tratar la OA.<sup>29</sup>

#### 2.1.2.1. Características del Cartílago Articular en la Osteoartrosis

El cartílago articular sano es fundamental para la función articular normal y sin dolor. El cartílago articular es un tejido de cartílago hialino de 2 a 4 mm de espesor que comprende condrocitos rodeados por una matriz extracelular (MEC).<sup>30</sup> La MEC contiene principalmente colágeno de tipo II, proteoglicanos y proteínas no colágenas, que están organizadas estructural y espacialmente de tal forma que brindan una óptima resistencia a la tracción y a las fuerzas de compresión.<sup>30</sup>

En el cartílago sano, los condrocitos responden a su microambiente para mantener un delicado equilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz MEC.<sup>31</sup> Cuando el mecanismo fisiológico normal que mantiene el equilibrio de la matriz falla, los componentes de la MEC se pierden, los condrocitos comienzan a expandirse y a agruparse en zonas específicas, se induce un estado oxidativo

en el entorno celular y, en última instancia, se produce la apoptosis de los condrocitos.<sup>32,33</sup> La falla en el equilibrio del recambio de la MEC se debe al aumento de la expresión de las enzimas que degradan la matriz, la inhibición de la síntesis de la matriz y a la producción excesiva de mediadores proinflamatorios, incluidos por las citocinas, quimiocinas y los productos de degradación de la MEC.<sup>34</sup>

Otro de los cambios importantes que ocurren en el cartílago con OA es la formación de fibrocartílago como resultado de la síntesis de componentes anormales de la MEC, predominantemente colágeno tipo I.<sup>34</sup> El fibrocartílago carece de las propiedades biomecánicas apropiadas del cartílago articular y, en consecuencia, sufre una degeneración. Como consecuencia, el cartílago articular intacto que rodea el fibrocartílago posteriormente se degenera, lo que resulta en la progresión de la OA.<sup>35</sup>

#### 2.1.2.2. Características de la Membrana Sinovial en la Osteoartritis

Las estructuras internas de la articulación y los tejidos musculoesqueléticos están unidos por la membrana sinovial; que, en virtud de su composición celular, también es responsable de la homeostasis de la articulación.<sup>36</sup> En la rodilla, la membrana sinovial es la encargada de la producción del líquido sinovial, el cual provee una lubricación adecuada y un soporte nutricional para el cartílago.<sup>27</sup>

En general, la membrana sinovial se compone de dos capas de superficies celulares continuas (íntima) y el tejido subyacente (subíntima).<sup>37</sup> La íntima está compuesta de dos a tres capas de sinoviocitos de tipo fibroblasto y de tipo macrófago. A su vez, el espacio de la subíntima se compone de tejidos fibroso conectivo, vasos sanguíneos y un bajo contenido de células inmunes (macrófagos, células T y células B).<sup>37</sup>

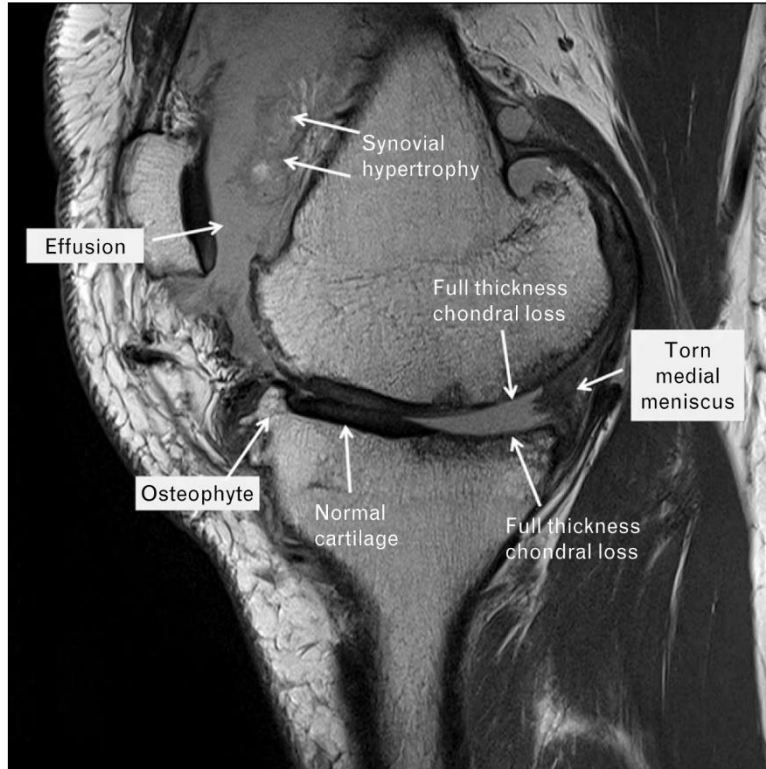
En la membrana sinovial con OA, la infiltración de células inflamatorias se observa con frecuencia, a veces en un grado similar al observado en la Artritis Reumatoide. Sin embargo, no está claro si esta inflamación es la causa o la

consecuencia de la destrucción del cartílago.<sup>38</sup> Los macrófagos, cuyo número aumenta enormemente en la membrana sinovial con inflamación crónica, también son responsables de mantener un equilibrio fino entre los niveles de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el líquido sinovial.<sup>39</sup>

### **2.1.3. Diagnóstico de la Osteoartrosis**

El diagnóstico de la OA se realiza tradicionalmente a través de una exploración clínica y radiológica. Solo en las últimas etapas de la enfermedad los rayos X revelan pérdida de espacio articular y deformidad.<sup>40</sup> Por otra parte, se ha propuesto que el uso de estudios de resonancia magnética puede demostrar cambios a nivel del hueso subcondral que correlacionan con la presencia de OA temprana.<sup>40,41</sup> Sin embargo, los estudios de imagen con resonancia magnética resultan demasiado costosos para los sistemas de salud y, la significancia clínica de los cambios encontrados siguen siendo cuestionables.<sup>41</sup> No se solicitan estudios de laboratorio de forma rutinaria, ya que no existe una prueba diagnóstica específica o patognomónica para el diagnóstico. La exploración física es lo más importante, por lo que se debe hacer una revisión minuciosa de cada articulación.

En las radiografías convencionales, los primeros cambios se aprecian como un estrechamiento (mayor o menor) del espacio articular (generalmente asimétrico); más medialmente como un signo de deterioro del cartílago, con esclerosis ósea en ciertas partes de la articulación y la formación de hueso subcondral (osteofitos; Figura 1).<sup>42</sup> La gravedad de los cambios radiográficos puede no corresponder con la gravedad de los síntomas clínicos.



**Figura 1. Estudio de imagen que muestra una rodilla con OA.** Resonancia magnética sagital de densidad protónica que muestra OA avanzada del compartimento femorotibial medial, con pérdida completa del grosor del cartílago, derrame importante y engrosamiento sinovial prominente. Nótese también la lesión del menisco medial y la formación de osteofitos.<sup>43</sup>

El primer signo de OA suele ser el dolor de la articulación después de la relajación o el sueño, el cual es poco perceptible al inicio e incrementa gradualmente.<sup>44</sup> El examen clínico muestra dolor en la articulación a la palpación, crepitación en los movimientos, disminución del rango de movimiento, deformidad, trastorno del eje articular, inflamación, derrame y debilidad de los músculos.<sup>44,45</sup>

#### **2.1.4. Tratamiento de la Osteoartritis**

El manejo óptimo de la OA requiere una combinación de estrategias terapéuticas. Inicialmente se tratan de cambiar aspectos conductuales en el paciente (p. ej., control de peso y ejercicio), seguido de la rehabilitación; estos

componentes son los más relevantes. Posteriormente, lo anterior se acompaña de tratamientos farmacológicos y, en etapas posteriores (y más avanzadas de la enfermedad), la consideración de la cirugía de reemplazo articular.<sup>46</sup> De los pacientes con OA, aproximadamente el 5% se somete a cirugía de reemplazo articular. Aunque estas cirugías son costosas, resultan rentables a largo plazo.<sup>47</sup>

El efecto negativo de la OA es atribuible al dolor, la discapacidad y al costo del tratamiento a largo plazo. Por lo que actualmente, se reconoce que es necesario una combinación de enfoques farmacológicos y no farmacológicos para el tratamiento de pacientes con OA (ver Tabla 1).<sup>48</sup>

Hoy en día, no existe un tratamiento que realmente cure la OA. Sin embargo, las prácticas actuales han evolucionado gracias a las alternativas terapéuticas no farmacológicas y multidisciplinarias. Estos tratamientos requieren un cambio en el estilo de vida, con un enfoque en combatir nuestra forma de vida cada vez más sedentaria y el aumento de peso. La actividad física regular en pacientes con OA es efectiva para reducir el dolor y mejorar la función articular.<sup>49</sup> Sin actividad física regular, la fuerza muscular disminuye. Pero sabemos que para estabilizar la rodilla y evitar que la OA empeore, la fuerza en el cuádriceps y los músculos periféricos alrededor de la articulación afectada es vital.<sup>50</sup>

**Tabla 1. Resumen de recomendaciones para el manejo de la OA<sup>a</sup>.<sup>48</sup>**

**Recomendaciones básicas** (siempre recomendadas):

- ✓ Programas de autocuidado
- ✓ Educación
- ✓ Planes de tratamiento individualizado
- ✓ Mantenimiento o pérdida de peso
- ✓ Ejercicio (en superficie plana o en agua)

**Recomendado para la mayoría de las situaciones** (si es apropiado para la situación clínica, comorbilidades):

- ✓ Infiltración intraarticular de corticosteroides
- ✓ AINES<sup>b</sup> tópicos
- ✓ Paracetamol
- ✓ AINES o inhibidores de COX-2<sup>c</sup> orales
- ✓ Dispositivos de asistencia y ayuda para caminar
- ✓ Modalidades térmicas
- ✓ Remisión a terapia física u ocupacional.

**Considerar en algunas situaciones** (por ejemplo, poblaciones específicas de pacientes o manifestaciones de la enfermedad):

- ✓ Duloxetina
- ✓ Capsaicina
- ✓ Terapias corporales y mentales (yoga, Tai Chi, acupuntura)
- ✓ férulas y soportes
- ✓ Estimulación eléctrica nerviosa transcutánea
- ✓ Intervención quirúrgica (específicamente reemplazo articular)

**No recomendado:**

- × Ultrasonido terapéutico
- × Lavado articular con aguja
- × Artroscopia con desbridamiento

**Controversial entre las diferentes guías de tratamiento, información insuficiente o no abordado:**

- Infiltración intraarticular de ácido hialurónico
- Otros tratamientos intraarticulares (plasma rico en plaquetas, células madre)
- Glucosamina/Condroitina
- Otras intervenciones quirúrgicas (osteotomía, reemplazo articular parcial)
- Tratamientos botánicos o herbales

<sup>a</sup>OA, Osteoartrosis; <sup>b</sup>AINES, antiinflamatorios no esteroideos; <sup>c</sup>COX-2, ciclooxigenasa 2.

### **2.1.5. Terapias Alternas para el Tratamiento de la Osteoartritis**

Hasta ahora, las terapias disponibles para el manejo de la OA comúnmente se basan en la paliación del dolor, mejorar el movimiento funcional y prevenir la degeneración. Debido a ello, surge la necesidad de desarrollar alternativas terapéuticas que puedan prevenir la destrucción del cartílago y los tejidos involucrados en la articulación de la rodilla o estimular su adecuada reparación.

Muchas de las alternativas terapéuticas que han sido estudiadas para el tratamiento de la OA se basan en la aplicación intraarticular directa de diversas sustancias.<sup>51</sup> La idea detrás de ello es que los tratamientos locales tendrán menos efectos adversos sistémicos y que la aplicación del medicamento dentro de la articulación tendrá un efecto más directo. Algunos estudios han demostrado que, en general, las terapias intraarticulares son más efectivas que los AINES y otros tratamientos farmacológicos sistémicos; sin embargo, también revelaron que un porcentaje de ese beneficio podría ser secundario al efecto placebo de la infiltración intraarticular.<sup>52</sup>

Las opciones terapéuticas intraarticulares se pueden agrupar en tres grandes grupos: tratamientos intraarticulares estándar, infiltración intraarticular de agentes biológicos y terapias celulares.<sup>51</sup> Aunque no se definen categóricamente como estándar de atención, los glucocorticoides y el AH son opciones de tratamiento intraarticulares estándar para el tratamiento del dolor de rodilla relacionado con la OA en pacientes que no responden a terapia no farmacológica, AINES o analgésicos.<sup>51</sup> En los últimos 10 años, se han publicado algunos estudios importantes que investigan el uso de agentes biológicos para el tratamiento de la OA (Anakinra®, Etanercept®, Eptotermin alfa®, Sprifermin®), pero hasta la fecha, los resultados de los ensayos clínicos han sido en su mayoría no convincentes.<sup>51</sup> Las terapias celulares (plasma rico en plaquetas, concentrado de aspirado de médula ósea, fracción vascular estromal, células madre mesenquimales) pueden caracterizarse ampliamente por el método utilizado para producirlas o, debido a que el procesamiento del

tejido de origen concentra poblaciones específicas de células, por su relativa heterogeneidad en comparación con el tejido de origen.<sup>51</sup>

## **2.1.6. Uso del Ácido Hialurónico No Animal Estabilizado (NASHA) en el Tratamiento de la Osteoartrosis**

### 2.1.6.1. Definición

El AH es un componente principal del líquido sinovial, el cual facilita la lubricación y la absorción del impacto en las articulaciones, y la OA se caracteriza por una disminución del peso molecular y la concentración del AH en el líquido sinovial.<sup>53</sup>

El uso del AH como viscosuplementación para el tratamiento de la OA cuenta con una gran variedad de productos disponibles, los cuales difieren en composición, fuente del AH y método de producción.<sup>54</sup> Otras diferencias importantes entre los diferentes tipos de AH disponibles son: el peso molecular del ingrediente activo; la cantidad, concentración y volumen de infiltración por dosis; y el número de infiltraciones por curso de terapia, que van desde una sola administración hasta 5 infiltraciones intraarticulares.<sup>54</sup>

El NASHA (DUROLANE®; Bioventus LLC, Durham, NC, USA) es un tipo de HA derivado de un proceso de biofermentación disponible como un tratamiento de infiltración única. Durante el proceso de producción del NASHA, los entrecruzamientos naturales que existen en el AH se incrementan por la introducción de enlaces cruzados sintéticos (aproximadamente 1%). Las moléculas lineales de AH forman una matriz de gel tridimensional, con propiedades reológicas optimizadas, que le otorga una resistencia a la degradación.<sup>8</sup> La formulación resultante sigue siendo biocompatible, con una mayor densidad y un tiempo de residencia intraarticular elevado, que permite el suministro de una dosis más alta por unidad de volumen (60 mg en 3 mL).



### 2.1.6.2. Uso del NASHA en estudios preclínicos y clínicos

Se ha reportado una vida media del NASHA en estudios clínicos de alrededor de 4 semanas.<sup>55</sup> También se ha demostrado que el NASHA es eficaz para aliviar el dolor articular en modelos animales preclínicos y se ha demostrado que tiene una vida media de 32 días en rodillas de conejos.<sup>56</sup>

Los resultados de una revisión sistemática reciente acerca de la evidencia clínica existente, menciona que el uso del NASHA es más eficaz para reducir el dolor y mejorar la función en pacientes con OA de rodilla no inflamatoria, unilateral, leve a moderada.<sup>57</sup> Además de que, dado que NASHA se administra como una infiltración única, se reducen las visitas de los pacientes y los costos asociados, así como los riesgos potenciales asociados con los tratamientos de infiltraciones múltiples. Dichos resultados fueron obtenidos después de evidenciar la existencia de siete ensayos clínicos con calidad de evidencia Nivel I y cuatro ensayos más con evidencia de Nivel II y III.

### **2.1.7. Uso de las Células Madre Mesenquimales (CMM) en el Tratamiento de la Osteoartritis**

#### 2.1.7.1. Definición

Las CMM son células madre adultas que son multipotentes y están ampliamente presentes en múltiples tipos de tejidos. Lo atractivo de la terapia celular basada en CMM se debe a sus múltiples funcionalidades, que incluyen la diferenciación, la liberación de factores de crecimiento regenerativos y la inmunomodulación.<sup>58</sup> Las CMM son multipotentes, ya que se auto renuevan y se diferencian en células especializadas con múltiples funciones. Las CMM son de un linaje de células madre adultas y se diferencian de las células madre embrionarias pluripotentes en que poseen un potencial de diferenciación más restringido.<sup>59</sup>

### 2.1.7.2 Aplicación en el tratamiento de la Osteoartritis

En décadas recientes, se ha propuesto el uso de las CMM como una modalidad de tratamiento para la OA en humanos. La aplicación de CMM en forma de infiltración directamente en la articulación es la forma terapéutica más utilizada. Los resultados de una revisión sistemática reciente enfocada en demostrar la efectividad de la infiltración de CMM en el tratamiento de OA, reveló que son pocos los estudios clínicos controlados aleatorizados publicados al respecto (cinco), y que cuentan con un Nivel de evidencia III y IV al evaluar desenlaces histológicos, radiológicos y artroscópicos. Además, reportan que no se presentaron efectos adversos serios en un máximo de 24 meses de seguimiento. Sin embargo, se menciona que, debido a la heterogeneidad de las intervenciones, origen de las CMM, frecuencia de aplicación y resultados contradictorios en los estudios, la efectividad del tratamiento con CMM permanece controversial.<sup>60</sup> Debido a ello, se requiere de más investigación en esta área con el fin de esclarecer su efectividad.

### 2.1.7.3 Uso del medio de cultivo de CMM

En años recientes se ha sugerido que las biomoléculas sintetizadas por las CMM pueden ser tan importantes, si no más, que la diferenciación de las mismas células para promover la reparación funcional del tejido.<sup>61</sup> Además de su potencial de diferenciación, las células madre poseen efectos paracrinos e inmunomoduladores a través de la liberación de factores de crecimiento y citoquinas.<sup>62</sup> Teniendo en cuenta que la fisiopatología de OA se considera tanto degenerativa como inflamatoria, la estimulación del crecimiento local, la reducción de la respuesta inmune y la regeneración de tejidos puede ser un efecto beneficioso en esta condición.<sup>63</sup>

Como tal, el enfoque de investigaciones actuales incluye esfuerzos para dilucidar, aumentar y aprovechar los mecanismos autocrinos y paracrinos de las CMM en la medicina regenerativa.

Debido a que las CMM son capaces de producir un amplio espectro de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular,<sup>61</sup> se ha evaluado el potencial condroprotector del medio de cultivo acondicionado de CMM. Se ha reportado que regula positivamente la expresión de colágeno tipo II y la producción de mediadores relevantes involucrados en la degeneración articular de la OA por medio del cultivo de condrocitos humanos.<sup>13</sup> Con ello, es necesario realizar estudios adicionales para dilucidar los factores responsables de los efectos condroprotectores de los factores tróficos de las CMM para proporcionar información adicional sobre su mecanismo de acción.

#### **2.1.8. Modelos de estudio *in vitro* de Osteoartritis**

Los modelos de cultivo *in vitro* para la OA se han usado comúnmente para tratar de comprender mejor los mecanismos patológicos de la enfermedad, así como para evaluar biomarcadores y estrategias terapéuticas. Los principales modelos usados para el estudio *in vitro* de la OA son los cultivos de explantes, cultivos en monocapa (incluyendo los cocultivos) y los cultivos tridimensionales (3D). Los modelos basados en el cultivo de explantes presentan la principal ventaja de que pueden ser usados para examinar la respuesta de las células en su MEC natural, sin que el fenotipo celular se vea alterado.<sup>64</sup> Además, ya que se sabe que los explantes de cartílago en cultivo pueden permanecer viables por largos periodos,<sup>65</sup> se ha podido evaluar el efecto de alternativas terapéuticas y otras modalidades de cocultivos.<sup>66,67</sup>

## **CAPÍTULO III**

### **3. HIPÓTESIS**

El tratamiento con el NASHA y el medio de cultivo acondicionado de CMM derivadas de tejido adiposo producirán un efecto antiinflamatorio en un modelo de cocultivo de explantes de cartílago y sinovial humano después ser estimulados con interleucina-1 $\beta$ .

## CAPÍTULO IV

### 4. OBJETIVOS

#### **Objetivo General**

Investigar y comparar el efecto antiinflamatorio de las terapias con NASHA y CMM en el tratamiento de la OA de rodilla en un modelo *in vitro*.

#### **Objetivos Específicos**

- Determinar el nivel de degradación de la matriz extracelular de los explantes de tejido cultivados a través de la cuantificación de los glicosaminoglicanos liberados en el medio de cultivo sobrenadante en los diferentes grupos de tratamiento a causa del estímulo inflamatorio.
- Determinar la respuesta antiinflamatoria y condroprotectora de ambos tratamientos mediante la cuantificación de la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria y de síntesis de matriz extracelular tanto en cartílago como en membrana sinovial, así como la producción de óxido nítrico en los diferentes grupos de tratamiento para monitorear cambios en la respuesta inflamatoria.

## CAPÍTULO V

### 5. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.1. Pacientes y diseño del estudio

El presente trabajo es un estudio experimental, prospectivo, *in vitro*. Se obtuvieron explantes de cartílago, tejido sinovial y tejido adiposo a partir del material biológico de desecho generado en las cirugías de artroplastia total de rodilla. Para el estudio se obtuvieron y cultivaron explantes de tejidos de 7 pacientes, cuyos criterios de inclusión fueron: mayores de 18 años, sexo indistinto, diagnóstico de OA de rodilla avanzada, que requirieran prótesis total de rodilla y firma de consentimiento informado. Se excluyeron aquellos pacientes que presentaron algún tipo de infección en la articulación y se eliminaron los pacientes de los que la muestra de tejidos fue insuficiente.

#### 5.2. Obtención y cultivo de los explantes de los tejidos

Se recuperó el tejido articular proveniente de los cóndilos femorales y cápsula sinovial, a partir de los cuales se realizaron cortes de 6-8 mm de diámetro por medio del Sistema de Transferencia para Autoinjerto Osteocondral (*Osteochondral Autograft Transfer System*, OATS®, Arthrex Inc., Santa Barbara, CA, USA). Los explantes obtenidos se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos estéril 1X (PBS, *phosphate buffered saline*, GIBCO®, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA), una vez en etanol 70% y una vez en PBS 1X estéril el cual se adicionó con 50 µg/mL de gentamicina.

Se desarrolló un sistema de cocultivo para las los explantes obtenidos de cada paciente. Para ello, los explantes de cartílago y tejido sinovial se distribuyeron en placas de cultivo de 12 pozos (NEST® Biotechnology, Jiangsu, China), en cada pozo se colocó un explante de cartílago con un explante de sinovial;

dichos explantes estaban divididos por un inserto con una membrana de poliestireno con un diámetro de poro de 1.0  $\mu\text{m}$  (Falcon, Corning, Fisher Scientific). El explante de cartílago se colocó dentro de inserto y el explante de sinovial se colocó en el fondo del pozo de la placa. Cada cocultivo se mantuvo bajo distintas condiciones: 1 pozo con medio de cultivo basal (DMEM/F12 [GIBCO®, Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA] adicionado con 50  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina [GIBCO®] y 0.25  $\mu\text{g/mL}$  de Fungizone® [GIBCO®]) suplementado con 10% de SBF (suero bovino fetal, Corning, Mediatech Inc., Manassas, VA, USA), otro pozo con medio de cultivo basal adicionado con 10 ng/mL de la proteína recombinante humana interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (R&D Systems Inc.), otro pozo con medio de cultivo basal sin SBF adicionado con NASHA (1 mg/mL, DUROLANE®) y 10 ng/mL de IL-1 $\beta$  y un último pozo con medio de cultivo basal sin SBF adicionado con medio de cultivo de células madre (1 mL) y con 10 ng/mL de IL-1 $\beta$ . Todos los cultivos fueron incubados a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h.

Así, se generaron 4 grupos experimentales: 1) control (medio basal), 2) IL-1 $\beta$  (medio basal + IL-1 $\beta$ ), 3) ácido hialurónico (NASHA, medio suplementado con ácido hialurónico + IL-1 $\beta$ ) y 4) células madre mesenquimales (CMM, medio acondicionado de células madre + IL-1 $\beta$ ). De cada grupo se obtuvieron muestras a las 0, 48 y 72 h de cultivo para realizar extracción de ARN total y además se almacenó el medio de cultivo sobrenadante a -80°C para su posterior análisis.

### **5.3. Obtención de CMM derivadas de tejido adiposo**

Se obtuvieron muestras de tejido adiposo de las cirugías de artroplastia total o parcial de cadera (5 muestras). El tejido adiposo obtenido se disgregó bajo condiciones de esterilidad. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS 1X estéril con 50  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina (GIBCO®) y 0.25  $\mu\text{g/mL}$  de Fungizone® (GIBCO®). Después, el tejido se disgregó mecánicamente con la ayuda de

pinzas para disección y bisturí estériles. Finalmente, en un frasco estéril se colocó el tejido disgregado mecánicamente con 1 volumen de solución de colagenasa tipo 1 (2 mg/mL, GIBCO®) y 1 volumen de medio de disgregación de tejido adiposo (DMEM/F12 sin SBF con 50 µg/mL de gentamicina y 0.25 µg/mL de Fungizone®). La preparación se incubó a 37°C por 1 h en agitación constante. Al final de este procedimiento las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1,800 rpm (730 × g) por 10 min. Se retiró todo el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 2 mL de PBS 1X con gentamicina y Fungizone®. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X con gentamicina y Fungizone®, se eliminó el sobrenadante quedando solamente el botón celular sedimentado en el fondo. Las células lavadas se resuspendieron en medio de cultivo DMEM/F12 adicionado con 10% de SBF, gentamicina y Fungizone®. Esta suspensión se transfirió a botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (NEST®) y se dejó que las células se adhirieran por 48-72 h. Pasado este tiempo se realizaron cambios de medio de cultivo cada 72 h o en cuanto fuera necesario hasta que las células alcanzaran un 80-90% de confluencia y estuvieran listas para realizarles un pasaje.

Las células recibieron un máximo de 2 pasajes y fueron estimuladas con IL-1β (10 ng/mL); el medio de cultivo de las células confluentes estimuladas (medio acondicionado de células madre) se almacenó a -80°C y fue utilizado para suplementar los cocultivos de los explantes de cartílago y tejido sinovial.

#### **5.4. Inmunofenotipificación de CMM derivadas de tejido adiposo mediante citometría de flujo**

El inmunofenotipo de las CMM en cultivo fue evaluado dentro de los pasajes 3 y 5. Las células adherentes cultivadas en botellas de 75 cm<sup>2</sup> fueron despegadas por digestión con tripsina 0.75%/EDTA 0.5 mM durante 5 min a 37°C, y lavadas con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB para inactivar a la tripsina. Se centrifuga a 1,800 rpm (730 × g) por 5 min y el botón celular fue



resuspendido en medio DMEM suplementado e incubado a 37°C durante 20 min. Posteriormente, las células fueron centrifugadas y el botón celular fue resuspendido de acuerdo con lo siguiente:

El análisis se realiza con aproximadamente 200,000 células por tubo resuspendidas en 50 µL de solución amortiguadora de tinción (SB, Becton Dickinson Pharmingen) o bien en una solución de BSA al 0.5% en PBS. A cada tubo se le adiciona el volumen de anticuerpo recomendado por el fabricante y previa agitación suave, se incuban durante 20 min en oscuridad. Al cabo del tiempo, las muestras son lavadas con 0.5 mL de BSA al 0.5% en PBS y se centrifugan a 1,800 rpm (730 × g), durante 10 min a 4°C. El botón de células teñidas de cada tubo son resuspendidas en 250 µL de BSA al 0.5% en PBS y analizadas para inmunofluorescencia de tres colores por citometría de flujo (FACSAria, Becton Dickinson).

### **5.5. Extracción de ARN total y análisis de expresión génica por PCR en tiempo real**

Se aisló el ARN total de las muestras de los explantes de cartílago y sinovial en los tiempos de cultivo indicados mediante el estuche comercial RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN®) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se evaluó la integridad de las muestras obtenidas de ARN por cuantificación espectrofotométrica en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA).

A partir de cada muestra de ARN total obtenida, se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) por medio de una reacción de retrotranscripción con el estuche comercial GoTaq Probe 2-Step RT-qPCR System (Promega®). El ADNc se almacenó en microtubos a -20°C hasta su análisis. A partir del ADNc sintetizado se evaluó la expresión de distintos genes relacionados con la respuesta inflamatoria y la síntesis de MEC en cartílago y sinovial a través del uso de sondas TaqMan (Applied Biosystems) específicas para cada gen en

cada ensayo de cocultivo (7 ensayos) y en cada grupo de experimentación (4 grupos) por triplicado. Las corridas de los ensayos de expresión se realizaron en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La lista de los genes evaluados se muestra a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2. Nombre y símbolo de los genes analizados por qPCR.** Se muestra el código correspondiente a cada una de las sondas TaqMan empleadas.

Nombre del gen	Símbolo	Código <sup>a</sup>
Interleucina-1 beta	IL-1 $\beta$	Hs01555410_m1
Metaloproteasa de matriz 13	MMP13	Hs00233992_m1
Inhibidor tisular de metaloproteasas 1	TIMP1	Hs00171558_m1
Metaloproteasa con trombospondina 1 motivo 5	ADAMTS5	Hs00199841_m1
Beta-2-microglobulina	B2M	Hs99999907_m1

<sup>a</sup>Applied Biosystems

El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el Método Comparativo de  $C_T$  o Método de  $\Delta\Delta C_T$  para ensayos de expresión relativa, utilizando como gen endógeno para normalizar a Beta-2-microglobulina (B2M).<sup>68</sup>

## 5.6. Liberación de glucosaminoglucanos

Los glucosaminoglucanos (GAG) sulfatados (condroitín sulfato, heparán sulfato, queratán sulfato y dermatán sulfato) producidos y liberados al medio de cultivo debido a la degradación de la matriz extracelular de los tejidos a causa del estímulo inflamatorio al que fueron sometidos, se cuantificaron por medio de un análisis espectrofotométrico utilizando la sonda metacromática azul de dimetilmileno (DMB) mediante el estuche comercial para la detección de GAG de Rheumera® (Astarte Biologics, Redmond, WA, USA). La unión del DMB a los GAG sulfatados induce un cambio en el espectro de absorción el cual es directamente proporcional a la cantidad de GAG sulfatados. Las mediciones se realizaron en placas de 96 pozos en el lector de placas multimodal Cytation3 HT (BioTek® Instruments Inc., Winoosk, VE, USA) a una longitud de onda de 525

nm. Después de construir una curva de calibración se calculó la concentración de los GAG/mL presentes en los sobrenadantes de cada uno de los cultivos, sustituyendo los datos de absorbancia obtenidos por el valor de “y” en la ecuación de la recta. Los resultados obtenidos fueron normalizados con respecto al peso húmedo de los explantes. Se evaluó la presencia de los GAG sulfatados de cada ensayo de cocultivo (7 ensayos) y de cada grupo de experimentación (4 grupos) por quintuplicado.

### **5.7. Producción de óxido nítrico**

El óxido nítrico (ON) se genera como parte de la respuesta inmune, por lo que su producción lo hace un buen indicador de inflamación. La producción de ON se determinó en los sobrenadantes de los cultivos mediante el uso del reactivo de Griess (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), que convierte el nitrato disponible en nitrito a través de la nitrito reductasa. Se determinó la absorbancia a 540 nm en placas de 96 pozos en el lector de placas multimodal Cytation3 HT (BioTek® Instruments Inc., Winoosk, VE, USA). Se utilizó el nitrato de sodio para generar una curva estándar con la cual se determinaron las concentraciones de las muestras a evaluar. Se evaluó la producción de ON en cada ensayo de cocultivo (7 ensayos) y en cada grupo de experimentación (4 grupos) por triplicado.

### **5.8. Análisis estadístico**

Se realizó un cálculo del tamaño de muestra para la comparación de medias relacionadas, tomando como base un valor de alfa de 0.05 en dos direcciones y un valor beta de 0.08. Se tomó como significativa una diferencia mínima de 2.5 de acuerdo con un análisis de expresión génica de un estudio previo realizado por nuestro equipo de trabajo. El resultado fue de 7 ensayos por grupo de experimentación. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar

(DS) de siete experimentos independientes realizados por triplicado a menos que se mencione lo contrario. Las variables numéricas se analizaron con la prueba paramétrica ANOVA con la prueba post hoc para comparaciones múltiples de Tukey para observar las posibles diferencias entre los grupos de experimentación. El proceso electrónico de datos y su análisis se llevó a cabo con el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para todas las pruebas, se consideró un valor de  $p \leq 0.05$  como estadísticamente significativo.

## **CAPÍTULO VI**

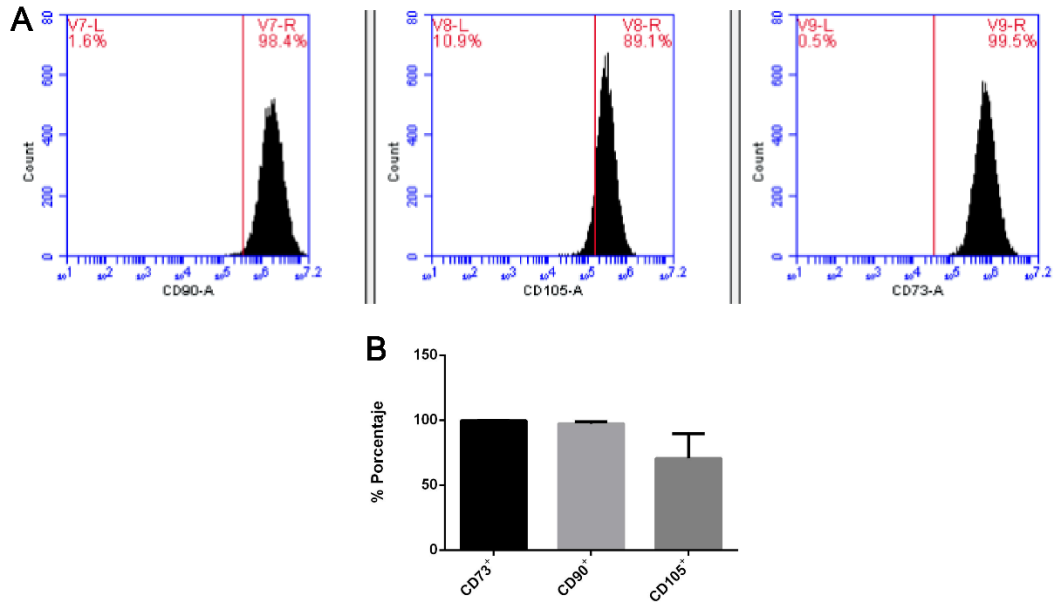
### **6. RESULTADOS**

#### **6.1. Características de los pacientes**

Las muestras de explantes de cartílago y membrana sinovial obtenidos de las cirugías de reemplazo total de rodilla para los ensayos de cocultivo provinieron de 7 pacientes masculinos con una mediana de 71 años y un rango intercuartil de 60-79 años. Las muestras de tejido adiposo utilizadas para la obtención y cultivo de CMM se proporcionaron a partir de 5 pacientes masculinos sometidos a cirugías de reemplazo total de cadera con una mediana de 70 años y un rango intercuartil de 67-77 años.

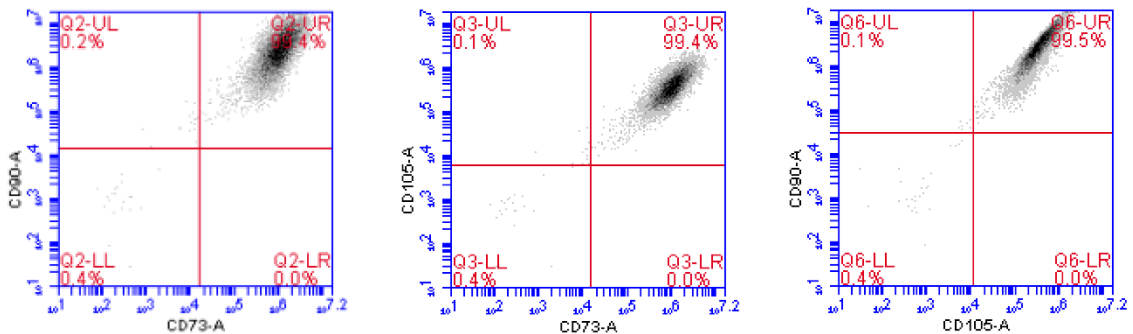
#### **6.2. Inmunofenotipificación de CMM derivadas de tejido adiposo**

El análisis por citometría de flujo de las CMM reveló los marcadores de superficie que deben de ser positivos para este tipo de células. En el histograma de los marcadores positivos, se puede apreciar que solo se distingue un pico bien definido, lo cual habla de la especificidad del ensayo (Figura 2A). También se encuentra graficada la expresión de los marcadores en las muestras analizadas, en donde como se esperaba, la expresión del marcador CD105 es la que varía más entre individuos y entre pasajes. Los marcadores CD73 y CD90 son los más estables (Figura 2B).



**Figura 2. Análisis por citometría de flujo de las CMM.** Gráfica de marcadores positivos para CMM (A) e histograma de expresión promedio de todas muestras de células utilizadas para los ensayos (B). Se utilizaron muestras de tejido adiposo de 5 donadores diferentes para obtener las CMM y posteriormente generar el medio de cultivo acondicionado utilizado para los ensayos de cocultivo.

En la Figura 3, se muestra una imagen representativa del análisis de las muestras, la cual se expresa como Dot-Plot y nos demuestra la pureza del cultivo. En este caso, se puede observar que la mayoría de las células se ubican en una zona muy concentrada y en el cuadrante correspondiente a las que son dobles positivos (CMM).

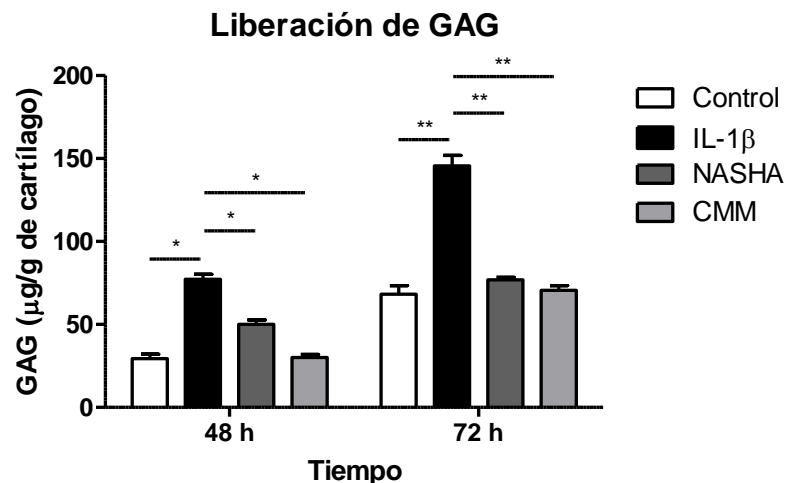


**Figura 3. Representación gráfica (Dot-Plot) para dobles marcajes de CMM.** Gráfica representativa que muestra a la mayor parte de las células situadas en el cuadrante

superior derecho correspondiente al doble marcaje positivo (CD90+/CD73+, CD105+/CD73+ y CD90+/CD105+).

### 6.3. Liberación de GAG al medio de cultivo

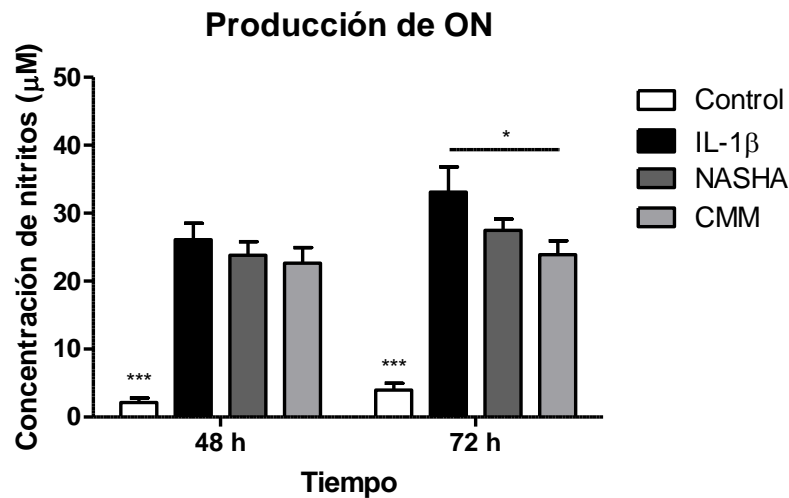
Se detectó la presencia de GAG sulfatados en el medio de cultivo de los 4 grupos de cocultivo a las 48 y 72 h (Figura 4). Se detectó una mayor liberación de GAG en el grupo de tratamiento estimulado con IL-1 $\beta$  con respecto al grupo control, NASHA y CMM a las 48 ( $p < 0.05$ ) y 72 h ( $p < 0.01$ ). Se pudo apreciar que el nivel de GAG liberados al medio de cultivo se mantuvo al nivel del grupo control en los grupos tratados con NASHA o con medio acondicionado de CMM sin haber un cambio significativo entre estos dos grupos.



**Figura 4. Glucosaminoglucanos (GAG) liberados al medio de cultivo por parte de los explantes de cartílago y membrana sinovial.** El medio acondicionado de cada cocultivo se mezcló con azul de dimetilmetileno y la cantidad de GAG se cuantificó por espectrofotometría. Los datos se reportan como la media y desviación estándar de los datos normalizados con el peso húmedo de los explantes de cartílago en 7 ensayos diferentes a las 48 y 72 h. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  vs IL-1 $\beta$ .

## 6.4. Cuantificación de ON

La producción de ON se incrementó notoriamente en los grupos en los que se aplicó el estímulo con IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , NASHA y CMM) con respecto al grupo control a las 48 y 72 h ( $p < 0.001$ ; Figura 5). Se observó una disminución en la producción de ON en los grupos tratados con NASHA y CMM con respecto al grupo IL-1 $\beta$  a las 72 h, sin embargo, solo en el grupo de CMM se obtuvo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ).



**Figura 5. Producción de óxido nítrico (ON) por parte de los explantes de cartílago y membrana sinovial.** La cantidad de ON producido en cada cocultivo se cuantificó por espectrofotometría a través del reactivo de Griess en el medio de cultivo acondicionado. Los datos se reportan como la media y error estándar de la media de 7 ensayos diferentes a las 48 y 72 h. \* $p < 0.05$  CMM vs IL-1 $\beta$  y \*\*\* $p < 0.001$  IL-1 $\beta$ , NASHA, CMM vs Control.

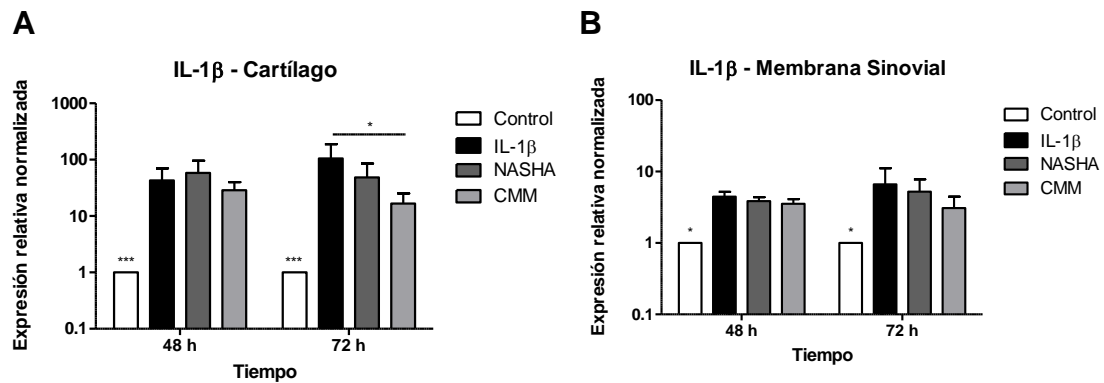
## 6.5. Ensayos de Expresión Génica

### 6.5.1. Expresión de IL-1 $\beta$

El estímulo inflamatorio con IL-1 $\beta$  recombinante incrementó de manera notoria la expresión de IL-1 $\beta$  en los grupos en donde se aplicó el estímulo con respecto al grupo control (Figura 6), tanto en cartílago ( $p < 0.001$ ) como en membrana sinovial ( $p < 0.05$ ). Se pudo observar que, a las 72 h tanto en cartílago como en



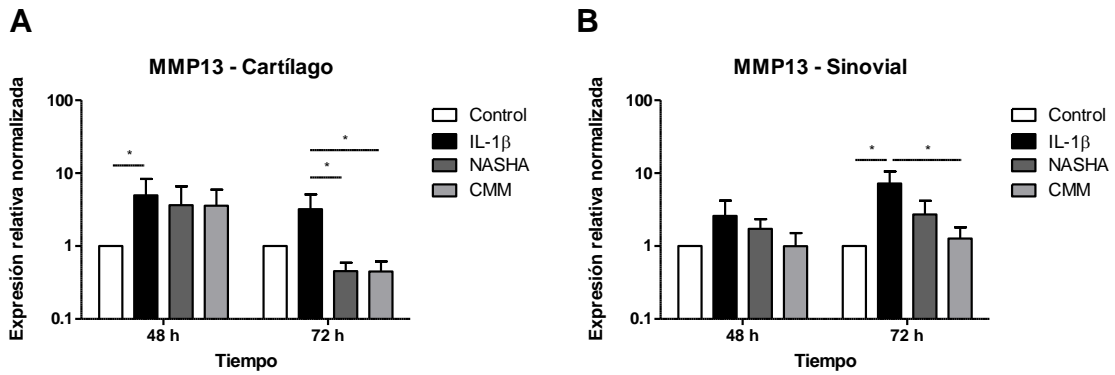
membrana sinovial, los tratamientos con NASHA y CMM disminuyeron la expresión de IL-1 $\beta$ ; sin embargo, solo el tratamiento con el medio de cultivo condicionado de CMM disminuyó significativamente la expresión de IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ) en cartílago. En membrana sinovial, el tratamiento con medio de cultivo de CMM también disminuyó el nivel de expresión de IL-1 $\beta$  con respecto al tratamiento con NASHA, a pesar de ello, la diferencia mostrada no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).



**Figura 6. Expresión génica relativa de IL-1 $\beta$  analizada por PCR en tiempo real en explantes de cartílago y membrana sinovial.** Los datos se reportan como la media y error estándar de la media de 7 ensayos diferentes a las 48 y 72 h en explantes de cartílago (A) y de membrana sinovial (B). A, \* $p < 0.05$  CMM vs IL-1 $\beta$  y \*\*\* $p < 0.001$  IL-1 $\beta$ , NASHA, CMM vs Control. B, \* $p < 0.05$  IL-1 $\beta$ , NASHA, CMM vs Control.

### 6.5.2. Expresión de MMP13

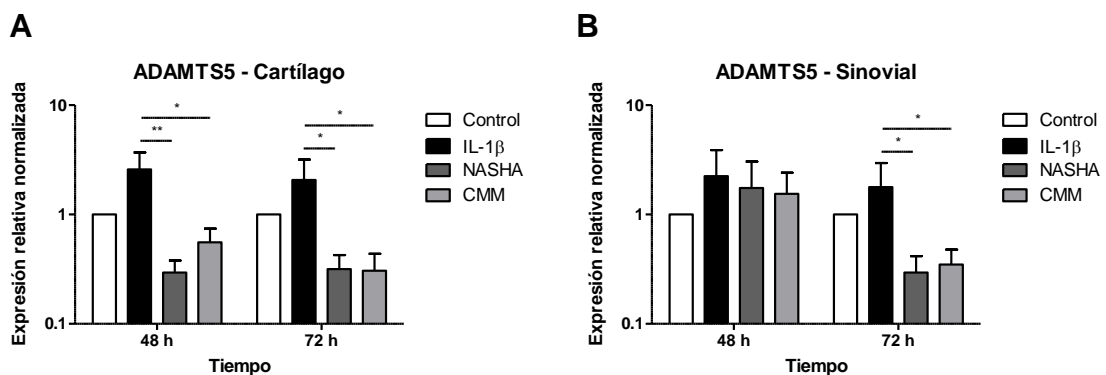
El estímulo inflamatorio con IL-1 $\beta$  recombinante incremento notablemente la expresión de MMP13 en el grupo en donde solo se aplicó el estímulo de inflamación con respecto al grupo Control ( $p > 0.05$ ; Figura 7). Sin embargo, a las 72 h la expresión de MMP13 disminuyó significativamente tanto en cartílago como en sinovial ( $p > 0.05$ ) con el tratamiento de medio de cultivo de CMM. El tratamiento con NASHA solo disminuyó significativamente la expresión de MMP13 en cartílago a las 72 h ( $p > 0.05$ ).



**Figura 7. Expresión génica relativa de MMP13 analizada por PCR en tiempo real en explantes de cartílago y membrana sinovial.** Los datos se reportan como la media y error estándar de la media de 7 ensayos diferentes a las 48 y 72 h en explantes de cartílago (**A**) y de membrana sinovial (**B**). **A**, \* $p < 0.05$  Control vs IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$  vs NASHA y IL-1 $\beta$  vs CMM. **B**, \* $p < 0.05$  Control vs IL-1 $\beta$  y IL-1 $\beta$  vs CMM.

### 6.5.3. Expresión de ADAMTS5

En los explantes de cartílago, ambos tipos de tratamiento disminuyeron significativamente la expresión de ADAMTS5 a las 48 y 72 h ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) a pesar del estímulo inflamatorio con IL-1 $\beta$  (Figura 8). En los explantes de tejido sinovial, este mismo comportamiento se presentó solo a las 72 h ( $p < 0.05$ ).

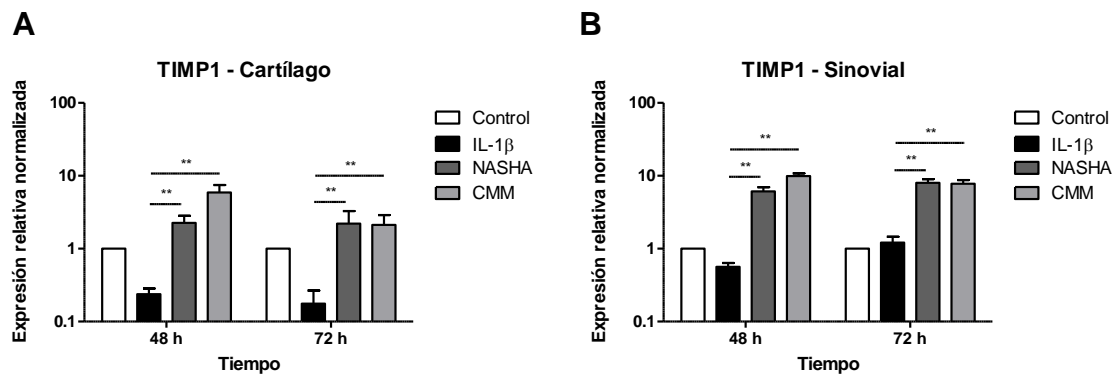


**Figura 8. Expresión génica relativa de ADAMTS5 analizada por PCR en tiempo real en explantes de cartílago y membrana sinovial.** Los datos se reportan como la media y error estándar de la media de 7 ensayos diferentes a las 48 y 72 h en

explantes de cartílago (A) y de membrana sinovial (B). A,  $**p < 0.01$  IL-1 $\beta$  vs NASHA,  $*p < 0.05$  IL-1 $\beta$  vs CMM, IL-1 $\beta$  vs NASHA. B,  $*p < 0.05$  IL-1 $\beta$  vs NASHA, IL-1 $\beta$  vs CMM.

#### 6.5.4. Expresión de TIMP1

Al contrario de los resultados de los genes anteriores, en este caso el estímulo inflamatorio con IL-1 $\beta$  disminuyó la expresión de TIMP1 en cartílago (Figura 9). Se puede distinguir como tanto en los explantes de cartílago como de membrana sinovial, los tratamientos con NASHA y CMM incrementan significativamente la expresión de TIMP1 a las 48 y 72 h ( $p < 0.01$ ).



**Figura 9. Expresión génica relativa de TIMP1 analizada por PCR en tiempo real en explantes de cartílago y membrana sinovial.** Los datos se reportan como la media y error estándar de la media de 7 ensayos diferentes a las 48 y 72 h en explantes de cartílago (A) y de membrana sinovial (B). A,  $**p < 0.01$  IL-1 $\beta$  vs NASHA, IL-1 $\beta$  vs CMM. B,  $**p < 0.01$  IL-1 $\beta$  vs NASHA, IL-1 $\beta$  vs CMM.

## CAPÍTULO VII

### 7. DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que los tejidos involucrados en la articulación con OA producen una amplia variedad de mediadores catabólicos y proinflamatorios que conllevan a la destrucción de la matriz extracelular de dichas estructuras.<sup>69</sup> Los resultados de este estudio sugieren que tanto el NASHA como el medio de cultivo acondicionado de CMM actúan modificando el ambiente articular en la OA. Sin embargo, solo los mediadores producidos por las CMM estimuladas con IL-1 $\beta$  fueron capaces de disminuir de forma notoria los marcadores de inflamación en el modelo de cocultivo utilizado.

El uso de un sistema de cocultivo *ex vivo* de explantes de cartílago y membrana sinovial, permite la interacción de los dos tipos de tejido para representar de una mejor forma el ambiente articular, a diferencia de lo que sucede en un cultivo aislado de cartílago o sinovial. Adicionalmente, los modelos basados en el cultivo de explantes presentan la principal ventaja de que pueden ser usados para examinar la respuesta de las células en su matriz extracelular natural, sin que el fenotipo celular se vea afectado.<sup>64</sup> El razonamiento que utilizamos fue que este tipo de sistema de cultivo semeja de forma más cercana lo que ocurre *in vivo* en una rodilla de un paciente con OA.

Diversos estudios clínicos han mostrado que el uso de NASHA es bien tolerado en los pacientes en los que ha sido administrado de forma intraarticular y que su efectividad clínica permanece por varias semanas en el tratamiento de la OA de rodilla.<sup>54,70,71</sup> Sin embargo, la capacidad del NASHA para reducir el proceso inflamatorio asociado con el desarrollo y la progresión de la OA no ha sido evaluada, después de una revisión en la literatura reciente a este respecto. Por otra parte, quisimos comparar el efecto del NASHA bajo estas condiciones con el efecto producido por el medio de cultivo de CMM acondicionado. Se ha demostrado que gran parte del potencial condrogénico de las CMM debido a

que secretan factores solubles que actúan de forma paracrina y que juegan un papel importante en la inmunomodulación y la regeneración de tejidos,<sup>13,72</sup> por lo que pudimos comparar el efecto antiinflamatorio de estos dos tipos de terapias en el mismo sistema de cultivo.

Los resultados de este estudio mostraron que ambos tipos de tratamiento revirtieron la degradación matriz extracelular en los explantes (representada por la liberación de los GAG en el medio de cultivo) inducida por la actividad de la IL-1 $\beta$  al mismo nivel del control sin tratamiento. Los GAG son los primeros componentes de la matriz extracelular en ser degradados durante el desarrollo de la OA, y su liberación se ha utilizado como medida de la pérdida de la matriz extracelular.<sup>73,74</sup> Este fenómeno se produce como consecuencia de la actividad de las agreganasas, las cuales degradan los proteoglicanos presentes en la matriz extracelular. Las agreganasas (p. ej. ADAMTS5), las metaloproteasas de matriz (p. ej. MMP13), prostaglandinas y el ON, son producidos por los condrocitos y sinoviocitos como respuesta a la actividad de algunas citocinas inflamatorias, principalmente la IL-1 $\beta$ .<sup>15,75</sup>

Tanto ADAMTS5 como MMP13 participan en el proceso de desarrollo de la OA al degradar componentes de la matriz extracelular como agregano y colágeno tipo II, respectivamente, en el caso del cartílago.<sup>76,77</sup> En nuestro modelo de cocultivo empleado, se detectó la disminución en la expresión de los genes ADAMTS5 y MMP13 después del tratamiento con NASHA y CMM a pesar de la presencia de IL-1 $\beta$ . Esto podría ayudar a explicar en parte la disminución de la degradación y liberación de GAG sulfatados al medio de cultivo. También quisimos evaluar la expresión de TIMP1, ya que se sabe que es capaz de inhibir diferentes MMP (incluyendo MMP13) y es el inhibidor tisular que más se expresa en cartílago con OA.<sup>78,79</sup> Al realizar la evaluación de los resultados de expresión de TIMP1, se pudo apreciar que el NASHA y las CMM incrementaron su expresión notablemente, lo cual se relaciona con la disminución en la expresión de MMP13.

La expresión de la IL-1 $\beta$  se incrementó notablemente en ambos tejidos en respuesta al estímulo de la IL-1 $\beta$  recombinante. La respuesta fue mayor en cartílago que en membrana sinovial. Se ha reportado que los condrocitos presentes en el cartílago con OA son más sensibles y reactivos a la IL-1 $\beta$  que en condrocitos sanos.<sup>85</sup> Al igual que con la producción de ON, la expresión de IL-1 $\beta$  fue menor en cartílago y sinovial tratados con medio acondicionado de CMM, lo cual solo fue significativamente menor en cartílago. La disminución en la expresión de la IL-1 $\beta$  en los tejidos tratados con NASHA fue mucho más discreta que con las CMM.

Por otra parte, se ha reportado que el ON inhibe la síntesis de GAG y colágeno, promueve la síntesis de metaloproteasas de matriz, promueve la respuesta inflamatoria de los condrocitos y participa en la percepción del dolor en la OA.<sup>80,81</sup> Tanto el cartílago como la membrana sinovial producen ON en respuesta al estímulo proinflamatorio de la IL-1 $\beta$ ;<sup>82,83</sup> sin embargo, los condrocitos son la principal fuente de ON en los tejidos de la articulación y el estrés oxidativo causado por este mediador también se la relacionado con la degeneración de las articulaciones con OA.<sup>84</sup> Nuestros resultados mostraron que ambos tratamientos disminuyen la producción de ON en cartílago y sinovial estimulados con IL-1 $\beta$ . A pesar de ello, el NASHA no fue capaz de disminuir de forma significativa la producción de ON en comparación con el medio acondicionado de CMM. El efecto en la síntesis de ON podría ser consecuencia de la inhibición de la óxido nítrico sintasa por parte de las CMM.

## **CAPÍTULO VIII**

### **8. CONCLUSIONES**

- ❑ Los resultados de este estudio muestran que tanto el NASHA como los mediadores producidos por las CMM tienen un efecto antiinflamatorio sobre los tejidos de la articulación actuando de forma similar.
- ❑ El efecto antiinflamatorio inducido por el NASHA no alcanza a ser igual de efectivo que el de las CMM en nuestro modelo de estudio.
- ❑ Es importante la realización estudios futuros encaminados a elucidar el mecanismo de acción exacto por el cual estos dos tipos de alternativas terapéuticas ejercen su efecto.

# CAPÍTULO IX

## 9. ANEXOS

### 9.1. Carta de Aprobación por parte del Comité de Ética en Investigación



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

**DR. med. JOSE FELIX VILCHEZ CAVAZOS**

Investigador principal  
Servicio de Ortopedia y Traumatología  
Presente.-

Estimado Dr. Vilchez:

Le informo que nuestro Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario "Dr. Jose Eleuterio Gonzalez", ha **evaluado y aprobado** el protocolo de investigación titulado: "**Efecto anti-inflamatorio de los tratamientos con ácido hialuronico y células madre mesenquimales en un modelo in vitro de osteoartritis**" participando además el Dr. Victor Manuel Peña Martinez, Dr. Eduardo Salvador Gomez Garcia, Carlos Alberto Acosta Olivo, Mario Alberto Simental Mendia y la Dra. Herminia Guadalupe Martinez Rodriguez como Co-investigadores, el cual quedó registrado en esta Subdirección con la clave **OR17-00002**.

- **Protocolo en extenso, versión 1.1 de fecha 09 de Enero del 2017.**

Cada vez que el Protocolo, Formato de Consentimiento Informado o Manual del Investigador sufran modificaciones, éstas deberán someterse nuevamente para solicitar su autorización.

Le reitero que es su obligación presentar a este Comité de Ética en Investigación un informe técnico parcial a más tardar el día en que se cumpla el año de emisión de este oficio, así como notificar la conclusión del estudio.

Será nuestra obligación realizar visitas de seguimiento a su sitio de investigación para que todo lo anterior esté debidamente consignado, en caso de no apegarse, este Comité tiene la autoridad de suspender temporal o definitivamente la investigación en curso, todo esto con la finalidad de resguardar el beneficio y seguridad de todo el personal y sujetos en investigación.

Atentamente.-

"Alere Flammam Veritatis"

Monterrey, Nuevo León, 30 de Enero del 2017

**DR. med. JOSE GERARDO GARZA LEAL**  
Presidente de Comité de Ética en Investigación

SUB-DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

#### Comité de Ética en Investigación

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n, Col. Mitras Centro, C.P. 64460, Monterrey, N.L. México  
Teléfonos: (+52) 81 8329 4050, Ext. 2870 a 2874. Correo Electrónico: investigacionclinica@meduanl.com



Septiembre 15, 2014



## 9.2. Carta de Consentimiento Informado

### FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

<b>Título del Estudio</b>	“Efecto anti-inflamatorio de los tratamientos con ácido hialurónico y células madre mesenquimales en un modelo in vitro de osteoartritis”
<b>Nombre del Investigador Principal</b>	Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos
<b>Servicio / Departamento</b>	Ortopedia y Traumatología Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”
<b>Teléfono de Contacto</b>	8110498070
<b>Persona de Contacto</b>	Dr. med. José Félix Vílchez Cavazos
<b>Versión de Documento</b>	1.1
<b>Fecha de Documento</b>	9/Enero/2017

Usted ha sido invitado(a) a participar en un estudio de investigación. Este documento contiene información importante acerca del propósito del estudio, lo que Usted hará si decide participar, y la forma en que nos gustaría utilizar su información personal y la de su salud.

Puede contener palabras que Usted no entienda. Por favor solicite a su médico o al personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que no le quede clara.

#### **¿CUÁL ES EL PROPÓSITO DEL ESTUDIO?**

El propósito de este estudio es conocer qué tan efectivos son los tratamientos con ácido hialurónico y con células madre para disminuir la inflamación producida por el desgaste de la rodilla (osteoartritis). Ya que se ha visto que los dos tratamientos han mostrado buenos resultados al tratar pacientes con desgaste de rodilla. Sin embargo, no se sabe con exactitud de qué forma actúan en los tejidos de la rodilla, y si son capaces de modificar la inflamación presente.

La investigación en la que Usted participará es importante porque con los resultados obtenidos se espera establecer cuál de los dos tratamientos es el que tiene mejores resultados para disminuir la inflamación causada por el desgaste de la rodilla.

#### **¿CUÁL SERÁ LA DURACIÓN DEL ESTUDIO Y CUÁNTOS PARTICIPANTES HABRÁ EN ESTE ESTUDIO?**

La duración del estudio (experimentos) será de 1 semana. Se incluirán 12 sujetos en este estudio de participación voluntaria.

#### **¿CUÁLES SON LOS REQUISITOS QUE SE TOMARÁN EN CUENTA PARA MI PARTICIPACIÓN?**

Los criterios de inclusión y de exclusión son los siguientes:

##### **Criterios de Inclusión:**

- Mayores de 18 años.
- Desgaste de rodilla grado avanzado.

- Género indistinto.
- Requerir cirugía para prótesis total de rodilla.
- Firma de consentimiento informado.

**Criterios de Exclusión**

- Infecciones.

**¿CUÁL ES EL TRATAMIENTO DEL ESTUDIO?**

Los tratamientos consistirán en adicionar ácido hialurónico o células madre mesenquimales en un cultivo de cartílago y tejido sinovial en el laboratorio.

**¿CUÁLES SON LOS PROCEDIMIENTOS QUE SE ME REALIZARÁN?**

Si Usted decide participar en el estudio no se le realizará ningún procedimiento adicional al de su cirugía.

**¿QUÉ VA A HACER SI USTED DECIDE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?**

Si Usted decide participar únicamente nos estará otorgando su consentimiento para recuperar los tejidos de desecho que le sean retirados durante el procedimiento normal de su cirugía. Estos tejidos incluyen: cartílago y hueso, tejido sinovial y tejido adiposo (grasa). Los tejidos recuperados serán manipulados posteriormente en un laboratorio para realizar los experimentos que se tienen planeados.

**¿CUÁLES SON LOS POSIBLES RIESGOS O MOLESTIAS?**

Ninguno.

**¿CUÁLES SON LOS POSIBLES BENEFICIOS PARA USTED O PARA OTROS?**

La participación en este estudio puede ayudar a los médicos científicos a comprender mejor la eficacia de los tratamientos con ácido hialurónico y células madre para poder determinar cuál es el que tiene mejor resultado. De esta forma se espera conocer de qué manera funcionan los dos tratamientos para poder saber el potencial beneficio para los pacientes que en un futuro se traten con alguno de los tratamientos evaluados.

**¿QUÉ OTROS PROCEDIMIENTOS O TRATAMIENTOS PODRÍAN ESTAR DISPONIBLES PARA USTED?**

No aplica.

**¿SU PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO LE GENERARÁ ALGÚN COSTO?**

No habrá costos para Usted por participar en este estudio.

**¿SE LE PROPORCIONARÁ ALGUNA COMPENSACIÓN ECONÓMICA PARA GASTOS DE TRANSPORTACIÓN?**

A Usted no se le proporcionará ninguna compensación para sus gastos de transportación.

**¿RECIBIRÁ ALGÚN PAGO POR SU PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO?**

Usted no recibirá ningún pago por la participación en este estudio.

**¿SE ALMACENARÁN MUESTRAS DE SANGRE O TEJIDOS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES?**

Autorizar el almacenamiento de muestras de los tejidos recuperados de su cirugía para investigaciones relacionadas con su enfermedad no le generará ningún costo a Usted. Sus muestras serán utilizadas sólo para esta investigación y no se comercializarán ni serán usadas para crear líneas celulares inmortales. La investigación que se realice con ellas puede llevar al desarrollo de nuevos productos o medicamentos en un futuro. Usted no recibirá ninguna compensación ahora o en el futuro por el uso de estas muestras. Las muestras serán almacenadas en ultra congeladores del Laboratorio de Ingeniería Tisular del Banco de Hueso y Tejidos hasta que se hayan realizado todos los experimentos que se tienen planeados. Una vez terminado el proyecto, todas las muestras almacenadas serán desechadas y eliminadas por medio de incineración.

### **¿QUÉ DEBE HACER SI LE PASA ALGO COMO RESULTADO DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO?**

No aplica.

### **¿CUÁLES SON SUS DERECHOS COMO SUJETO DE INVESTIGACIÓN?**

Si decide participar en este estudio, Usted tiene derecho a ser tratado con respeto, incluyendo la decisión de continuar o no su participación en el estudio. Usted es libre de terminar su participación en este estudio en cualquier momento.

### **¿PUEDE TERMINAR SU PARTICIPACIÓN EN CUALQUIER MOMENTO DEL ESTUDIO?**

Su participación es estrictamente voluntaria. Si desea suspender su participación, puede hacerlo con libertad en cualquier momento. Si elige no participar o retirarse del estudio, su atención médica presente y/o futura no se verá afectada y no incurrirá en sanciones ni perderá los beneficios a los que usted tendría derecho de algún otro modo.

Su participación también podrá ser suspendida o terminada por el médico del estudio, sin su consentimiento, por cualquiera de las siguientes circunstancias:

- Que el estudio haya sido cancelado.
- Que necesita algún procedimiento o medicamento que interfiere con esta investigación.

Si Usted decide retirarse de este estudio, deberá realizar lo siguiente:

- Notificar a su médico tratante del estudio.

Si su participación en el estudio se da por terminada, por cualquier razón, por su seguridad, el médico continuará con seguimientos clínicos. Además, su información médica recabada hasta ese momento podrá ser utilizada para fines de la investigación.

### **¿CÓMO SE PROTEGERÁ LA CONFIDENCIALIDAD DE SUS DATOS PERSONALES Y LA INFORMACIÓN DE SU EXPEDIENTE CLÍNICO?**

Si acepta participar en la investigación, el médico del estudio recabará y registrará información personal confidencial acerca de su salud y de su tratamiento. Esta información no contendrá su nombre completo ni su domicilio, pero podrá contener otra información acerca de Usted, tal como iniciales y su fecha de nacimiento. Toda esta información tiene como finalidad garantizar la integridad científica de la investigación. Su nombre no será conocido fuera de la Institución al menos que lo requiera nuestra Ley.

Usted tiene el derecho de controlar el uso de sus datos personales de acuerdo a la Ley Federal de Protección de datos Personales en Posición de Particulares, así mismo de solicitar el acceso, corrección y oposición de su información personal. La solicitud será procesada de acuerdo a las regulaciones de protección de datos vigentes. Sin embargo, cierta información no podrá estar disponible hasta que el estudio sea completado, esto con la finalidad de proteger la integridad del Estudio.

La Facultad de Medicina y Hospital Universitario, así como el Investigador serán los responsables de salvaguardar la información de acuerdo con las regulaciones locales.

Usted tiene el derecho de solicitar por escrito al médico un resumen de su expediente clínico.

La información personal acerca de su salud y de su tratamiento del estudio podrá procesarse o transferirse a terceros en otros países para fines de investigación y de reportes de seguridad, incluyendo agencias reguladoras locales (Secretaría de Salud SSA), así como al Comité de Ética en Investigación y al Comité de Investigación de nuestra Institución.

Para los propósitos de este estudio, autoridades sanitarias como la Secretaría de Salud y el Comité de Ética en Investigación y/o el Comité de Investigación de nuestra Institución, podrán inspeccionar su expediente clínico, incluso los datos que fueron recabados antes del inicio de su participación, los cuales pueden incluir su nombre, domicilio u otra información personal.

En caso necesario estas auditorías o inspecciones podrán hacer fotocopias de parte o de todo su expediente clínico. La razón de esto es asegurar que el estudio se está llevando a cabo apropiadamente con la finalidad de salvaguardar sus derechos como sujeto en investigación.

Los resultados de este estudio de investigación podrán presentarse en reuniones o en publicaciones.

La información recabada durante este estudio será recopilada en bases de datos del investigador, los cuales podrán ser usados en otros estudios en el futuro. Estos datos no incluirán información médica personal confidencial. Se mantendrá el anonimato.

Al firmar este documento, Usted autoriza el uso y revelaciones de la información acerca de su estado de salud y tratamiento identificado en esta forma de consentimiento. No perderá ninguno de sus derechos legales como sujeto de investigación. Si hay cambios en el uso de su información, su médico le informará.

### **SI TIENE PREGUNTAS O INQUIETUDES ACERCA DE ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN, ¿A QUIÉN PUEDE LLAMAR?**

En caso de tener alguna pregunta relacionada a sus derechos como sujeto de investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario podrá contactar al **Dr. José Gerardo Garza Leal**, Presidente del Comité de Ética en Investigación de nuestra Institución o al **Lic. Antonio Zapata de la Riva** en caso de tener dudas en relación a sus derechos como paciente.

**Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.**

Av. Francisco I. Madero y Av. Gonzalitos s/n

Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León México.

CP 66460

Teléfonos: (81) 83294000 ext. 2870 a 2874

Correo electrónico: [investigacionclinica@meduanl.com](mailto:investigacionclinica@meduanl.com)

### **RESUMEN CONSENTIMIENTO**

#### **PARA LLENAR POR EL SUJETO DE INVESTIGACIÓN**

Mi participación es completamente voluntaria.

- Confirmando que he leído y entendido este documento y la información proporcionada del estudio.
- Confirmando que se me ha explicado el estudio, que he tenido la oportunidad de hacer preguntas y que se me ha dado el tiempo suficiente para decidir sobre mi participación. Sé con quién debo comunicarme si tengo más preguntas.
- Entiendo que las secciones de mis anotaciones médicas serán revisadas cuando sea pertinente por el Comité de Ética en Investigación o cualquier otra autoridad regulatoria para proteger mi participación en el estudio.
- Acepto que mis datos personales se archiven bajo códigos que permitan mi identificación.
- Acepto que mis materiales biológicos (tejidos) recolectados puedan usarse para los fines que convengan a este estudio.
- Acepto que mi médico general sea informado de mi participación en este estudio.
- Acepto que la información acerca de este estudio y los resultados de cualquier examen o procedimiento pueden ser incluidos en mi expediente clínico.
- Confirmando que se me ha entregado una copia de este documento de consentimiento firmado.

---

Nombre del Sujeto de Investigación

---

Firma

---

Fecha

---

**PRIMER TESTIGO**

---

Nombre del Primer Testigo

---

Firma

---

Dirección

---

Fecha

---

Relación con el Sujeto de Investigación

-----

**SEGUNDO TESTIGO**

---

Nombre del Segundo Testigo

---

Firma

---

Dirección

---

Fecha

---

Relación con el Sujeto de Investigación

**PERSONA QUE OBTIENE CONSENTIMIENTO**

He discutido lo anterior y he aclarado las dudas. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

---

Nombre de la Persona que obtiene el Consentimiento

---

Firma

---

Fecha

## CAPÍTULO X

### 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Lawrence, R. C. *et al.* Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part II. *Arthritis Rheum.* **58**, 26–35 (2008).
2. Johnson, V. L. & Hunter, D. J. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **28**, 5–15 (2014).
3. Szabó, G., Lovász, G., Kustos, T. & Bener, a. A prospective comparative analysis of mobility in osteoarthritic knees. *J. Bone Joint Surg. Br.* **82**, 1167–9 (2000).
4. Fenwick, S. A., Gregg, P. J. & Rooney, P. Osteoarthritic cartilage loses its ability to remain avascular. *Osteoarthr. Cartil.* **7**, 441–452 (1999).
5. Loeser, R. F. Osteoarthritis year in review 2013: Biology. *Osteoarthritis and Cartilage* **21**, 1436–1442 (2013).
6. Arrich, J. *et al.* Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee: systematic review and meta-analysis. *Can. Med. Assoc. J.* **172**, 1039–1043 (2005).
7. Lo, G. H., LaValley, M., McAlindon, T. & Felson, D. T. Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **290**, 3115–3121 (2003).
8. Agerup, B., Berg, P. & Akermark, C. Non-animal stabilized hyaluronic acid: a new formulation for the treatment of osteoarthritis. *BioDrugs* **19**, 23–30 (2005).
9. Koelling, S. & Miosge, N. Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Expert Opin. Biol. Ther.* **9**, 1399–1405 (2009).
10. Orozco, L. *et al.* Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: A pilot study. *Transplantation* **95**, 1535–1541 (2013).
11. Veronesi, F., Maglio, M., Tschon, M., Aldini, N. N. & Fini, M. Adipose-derived mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: State-of-The-Art in in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **102**, 2448–2466 (2014).
12. Leto Barone, A. A., Khalifian, S., Lee, W. P. A. & Brandacher, G. Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells: Fact or fiction? *BioMed Research International* **2013**, (2013).
13. Platas, J. *et al.* Conditioned media from adipose-tissue-derived

- mesenchymal stem cells downregulate degradative mediators induced by interleukin-1 $\beta$  in osteoarthritic chondrocytes. *Mediators Inflamm.* **2013**, 357014 (2013).
14. Vaishya, R., Pariyo, G. B., Agarwal, A. K. & Vijay, V. Non-operative management of osteoarthritis of the knee joint. *J. Clin. Orthop. Trauma* **7**, 170–176 (2016).
  15. Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* **51**, 249–257 (2012).
  16. Carlos, J. *et al.* Artículo de revisión Guía de práctica clínica basada en la evidencia para el diagnóstico y tratamiento de la osteoartritis. **27**, 552–572 (2011).
  17. Miranda-Duarte, A. DNA Methylation in Osteoarthritis: Current Status and Therapeutic Implications. *Open Rheumatol. J.* **12**, 37–49 (2018).
  18. Woolf, A. D. & Pfleger, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull. World Health Organ.* **81**, 646–656 (2003).
  19. Flegal, K. M., Kruszon-Moran, D., Carroll, M. D., Fryar, C. D. & Ogden, C. L. Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. *JAMA* (2016). doi:10.1001/jama.2016.6458
  20. Lohmander, L. S., Englund, P. M., Dahl, L. L. & Roos, E. M. The Long-term Consequence of Anterior Cruciate Ligament and Meniscus Injuries. *Am. J. Sports Med.* (2007). doi:10.1177/0363546507307396
  21. Mandl, L. A. Osteoarthritis Year in Review 2018: Clinical. *Osteoarthr. Cartil.* (2018). doi:10.1016/j.joca.2018.11.001
  22. Winter, F. D. MKSAP 14—Medical Knowledge Self-Assessment Program, edited by Paul E. Epstein, MD, and Patrick C. Alguire, MD. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent).* **20**, 319–320 (2007).
  23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation—United States, 2010–2012. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **62**, 869–873 (2013).
  24. Peláez-Ballestas, I. *et al.* Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J. Rheumatol.* **38**, 3–6 (2011).
  25. Wallace, I. J. *et al.* Knee osteoarthritis has doubled in prevalence since the mid-20th century. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 9332–9336 (2017).
  26. Ayhan, E., Kesmezacar, H. & Akgun, I. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World J. Orthop.* **5**, 351–361 (2014).
  27. Sharma V, Anuvat K, John L, D. M. in *Decker: Pain related disease states* (2017).



28. Mora, J. C., Przkora, R. & Cruz-Almeida, Y. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. *J. Pain Res.* **Volume 11**, 2189–2196 (2018).
29. Shen, J., Abu-Amer, Y., O’Keefe, R. J. & McAlinden, A. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect. Tissue Res.* **58**, 49–63 (2017).
30. Erggelet, C. & Mandelbaum, B. in *Principles of Cartilage Repair* 3–5 (Steinkopff-Verlag Heidelberg, 2008).
31. Musumeci, G., Loreto, C., Carnazza, M. L. & Martinez, G. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **19**, 307–313 (2011).
32. Lane, N. E. *et al.* OARSI-FDA initiative: Defining the disease state of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **19**, 478–482 (2011).
33. Lee, A. S. *et al.* A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene* (2013). doi:10.1016/j.gene.2013.05.069
34. Maldonado, M. & Nam, J. The Role of Changes in Extracellular Matrix of Cartilage in the Presence of Inflammation on the Pathology of Osteoarthritis. *Biomed Res. Int.* **2013**, 284873 (2013).
35. Bae, D. K., Yoon, K. H. & Song, S. J. Cartilage Healing After Microfracture in Osteoarthritic Knees. *Arthrosc. J. Arthrosc. Relat. Surg.* **22**, 367–374 (2006).
36. Huang, Y.-Z. *et al.* Mesenchymal Stem/Progenitor Cells Derived from Articular Cartilage, Synovial Membrane and Synovial Fluid for Cartilage Regeneration: Current Status and Future Perspectives. *Stem Cell Rev. Reports* **13**, 575–586 (2017).
37. Macchi, V. *et al.* The infrapatellar fat pad and the synovial membrane: an anatomo-functional unit. *J. Anat.* **233**, 146–154 (2018).
38. Kim, J.-R., Yoo, J. J. & Kim, H. A. Therapeutics in Osteoarthritis Based on an Understanding of Its Molecular Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
39. Kennedy, A., Fearon, U., Veale, D. J. & Godson, C. Macrophages in synovial inflammation. *Front. Immunol.* **2**, 52 (2011).
40. Beverly, M., Stamm, G., Hamilton, T. W., Murray, D. W. & Pandit, H. G. Upper tibial MRI vascular marks lost in early knee osteoarthritis. *J. Orthop. Surg. Res.* **13**, 281 (2018).
41. Ackerman, I. N., Kemp, J. L., Crossley, K. M., Culvenor, A. G. & Hinman, R. S. Hip and Knee Osteoarthritis Affects Younger People, Too. *J. Orthop. Sport. Phys. Ther.* **47**, 67–79 (2017).
42. Ahlbäck, S. Osteoarthrosis of the knee. A radiographic investigation. *Acta*

- Radiol. Diagn. (Stockh)*. **44**, Suppl 277:7-72 (1968).
43. Oo, W. M., Linklater, J. M. & Hunter, D. J. Imaging in knee osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **29**, 86–95 (2017).
  44. Conaghan, P. G., Dickson, J., Grant, R. L. & Guideline Development Group. Care and management of osteoarthritis in adults: summary of NICE guidance. *BMJ* **336**, 502–503 (2008).
  45. Talic-Tanovic, A., Hadziahmetovic, Z., Madjar-Simic, I. & Papovic, A. Comparison of Clinical and Radiological Parameters at Knee Osteoarthritis. *Med. Arch. (Sarajevo, Bosnia Herzegovina)* **71**, 48–51 (2017).
  46. Allen, K. D., Golightly, Y. M. & White, D. K. Gaps in appropriate use of treatment strategies in osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **31**, 746–759 (2017).
  47. McGrory, B. J., Weber, K. L., Jevsevar, D. S. & Sevarino, K. Surgical management of osteoarthritis of the knee: Evidence-based guideline. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **24**, e87–e93 (2016).
  48. Raveendran, R. & Nelson, A. E. Lower extremity osteoarthritis: management and challenges. *North Carolina Med. Journal*, **78**, 332–336 (2017).
  49. FRANSEN, M. & McCONNELL, S. Land-based Exercise for Osteoarthritis of the Knee: A Metaanalysis of Randomized Controlled Trials. *J. Rheumatol.* **36**, 1109–1117 (2009).
  50. Zacharias, A., Green, R. A., Semciw, A. I., Kingsley, M. I. C. & Pizzari, T. Efficacy of rehabilitation programs for improving muscle strength in people with hip or knee osteoarthritis: a systematic review with meta-analysis. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 1752–1773 (2014).
  51. Jones, I. A., Togashi, R., Wilson, M. L., Heckmann, N. & Vangsness, C. T. Intra-articular treatment options for knee osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* (2018). doi:10.1038/s41584-018-0123-4
  52. Bannuru, R. R. *et al.* Comparative effectiveness of pharmacologic interventions for knee osteoarthritis: A systematic review and network meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* (2015). doi:10.7326/M14-1231
  53. Wen, D. Y. Intra-articular hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis. *American Family Physician* **62**, 565–570 (2000).
  54. Leighton, R. *et al.* NASHA hyaluronic acid vs methylprednisolone for knee osteoarthritis: a prospective, multi-centre, randomized, non-inferiority trial. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 17–25 (2014).
  55. Lindqvist, U. *et al.* Elimination of stabilised hyaluronan from the knee joint in healthy men. *Clin. Pharmacokinet.* **41**, 603–613 (2002).
  56. Edsman, K. *et al.* Intra-articular Duration of Durolane™ after Single

- Injection into the Rabbit Knee. *Cartilage* **2**, 384–388 (2011).
57. Leighton, R. *et al.* Systematic clinical evidence review of NASHA (Durolane hyaluronic acid) for the treatment of knee osteoarthritis. *Open access Rheumatol. Res. Rev.* **10**, 43–54 (2018).
  58. Jayaram, P., Ikpeama, U., Rothenberg, J. B. & Malanga, G. A. Bone Marrow-Derived and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy in Primary Knee Osteoarthritis: A Narrative Review. *PM and R S1934-1482* (2018). doi:10.1016/j.pmrj.2018.06.019
  59. Cianca, J. C. & Jayaram, P. Musculoskeletal Injuries and Regenerative Medicine in the Elderly Patient. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* (2017). doi:10.1016/j.pmr.2017.06.010
  60. Pas, H. I. *et al.* Stem cell injections in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *Br. J. Sports Med.* **51**, 1125–1133 (2017).
  61. Baraniak, P. R. & McDevitt, T. C. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen. Med.* **5**, 121–143 (2010).
  62. Caplan, A. I. & Dennis, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* **98**, 1076–1084 (2006).
  63. Freitag, J. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: Reparative pathways, safety and efficacy - A review. *BMC Musculoskeletal Disorders* **17**, 230 (2016).
  64. Johnson, C. I., Argyle, D. J. & Clements, D. N. In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet. J.* **209**, 40–49 (2016).
  65. Strehl, R., Tallheden, T., Sjögren-Jansson, E., Minuth, W. W. & Lindahl, A. Long-term maintenance of human articular cartilage in culture for biomaterial testing. *Biomaterials* **26**, 4540–4549 (2005).
  66. Chan, P.-S., Caron, J. P. & Orth, M. W. Effects of glucosamine and chondroitin sulfate on bovine cartilage explants under long-term culture conditions. *Am. J. Vet. Res.* **68**, 709–715 (2007).
  67. Beekhuizen, M. *et al.* Osteoarthritic synovial tissue inhibition of proteoglycan production in human osteoarthritic knee cartilage: establishment and characterization of a long-term cartilage-synovium coculture. *Arthritis Rheum.* **63**, 1918–1927 (2011).
  68. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
  69. Sellam, J. & Berenbaum, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* **6**, 625–635 (2010).
  70. Altman, R. D., Åkermark, C., Beaulieu, A. D., Schnitzer, T. & Durolane International Study Group. Efficacy and safety of a single intra-articular injection of non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA) in patients with

- osteoarthritis of the knee. *Osteoarthr. Cartil.* **12**, 642–649 (2004).
71. Estades-Rubio, F. J. *et al.* Knee Viscosupplementation: Cost-Effectiveness Analysis between Stabilized Hyaluronic Acid in a Single Injection versus Five Injections of Standard Hyaluronic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 658 (2017).
  72. Singer, N. G. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 457–478 (2011).
  73. Pratta, M. A. *et al.* Aggrecan Protects Cartilage Collagen from Proteolytic Cleavage. *J. Biol. Chem.* **278**, 45539–45545 (2003).
  74. Matuska, A., O’Shaughnessey, K., King, W. & Woodell-May, J. Autologous solution protects bovine cartilage explants from IL-1 $\beta$ - and TNF $\alpha$ -induced cartilage degradation. *J. Orthop. Res.* **31**, 1929–1935 (2013).
  75. Goldring, M. B., Otero, M., Tsuchimochi, K., Ijiri, K. & Li, Y. Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Ann. Rheum. Dis.* **67 Suppl 3**, iii75-82 (2008).
  76. Verma, P. & Dalal, K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. *J. Cell. Biochem.* **112**, 3507–3514 (2011).
  77. Poole, A. R. *et al.* Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 78–81 (2002).
  78. Brew, K. & Nagase, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**, 55–71 (2010).
  79. Hermansson, M. *et al.* Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin  $\beta$ A (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 43514–43521 (2004).
  80. Lotz, M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **25**, 269–282 (1999).
  81. Abramson, S. B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **10**, S2 (2008).
  82. Osterman, C. *et al.* Platelet-Rich Plasma Increases Anti-inflammatory Markers in a Human Coculture Model for Osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* **43**, 1474–1484 (2015).
  83. van Buul, G. M. *et al.* Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthr. Cartil.* **20**, 1186–1196 (2012).
  84. Studer, R., Jaffurs, D., Stefanovic-Racic, M., Robbins, P. D. & Evans, C. H. Nitric oxide in osteoarthritis. in *Osteoarthritis and Cartilage* **7**, 377–379 (1999).

85. Shlopov, B. V, Gumanovskaya, M. L. & Hasty, K. A. Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 195–205 (2000).

## CAPÍTULO XI

### 11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Candidato para el grado de:

**Especialista en Ortopedia y Traumatología**

#### **Tesis:**

“Efecto antiinflamatorio de los tratamientos con ácido hialurónico y células madre mesenquimales en un modelo *in vitro* de osteoartrosis”

#### **Campo de estudio:**

Ciencias de la Salud

#### **Biografía:**

**Personal:** Nacido el 28 de Marzo de 1989, en Monterrey Nuevo León, Hijo de Lauro Salvador Gómez Guerra y Norma Alicia García Loera.

**Educación:** Egresado de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. con grado de Médico Cirujano y Partero en 2013.

# TESIS\_DR.\_EDUARDO\_SALVADOR\_GOMEZ\_GARCIA.pdf

## INFORME DE ORIGINALIDAD

**27%**

INDICE DE SIMILITUD

**26%**

FUENTES DE INTERNET

**16%**

PUBLICACIONES

**15%**

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	2%
2	<b>docplayer.es</b> Fuente de Internet	1%
3	<b>www.spandidos-publications.com</b> Fuente de Internet	1%
4	<b>link.springer.com</b> Fuente de Internet	1%
5	<b>Andrea Herrero Cervera. "Papel de la citoquina LIGHT en la esteatosis hepática y la resistencia a insulina", Universitat Politecnica de Valencia, 2020</b> Publicación	1%
6	<b>cdigital.dgb.uanl.mx</b> Fuente de Internet	1%
7	<b>es.scribd.com</b> Fuente de Internet	1%
8	<b>Submitted to uu</b>	



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado  
Facultad de Medicina, UANL.  
Presente.-

Por medio de la presente me permito enviarle un cordial saludo, así mismo hacer de su conocimiento que el Dr. Eduardo Salvador Gómez García, ex residente de esta Especialidad realizó su tesis de manera satisfactoria bajo la dirección del Dr. med. Carlos Alberto Acosta Olivo, Coordinador de Investigación del Servicio.

Así mismo se hace constar que obtuvo el 27% de similitud en la "Plataforma Turnitin".

Sin otro particular por el momento, quedo a sus distinguidas órdenes.

Atentamente  
"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey, N.L., a 20 de abril del 2021

Dr. med. Santiago de la Garza Castro  
Coordinador de Posgrado del Servicio

SERVICIO DE ORTOPEDIA Y TRAUMATOLOGÍA

Av. Francisco I. Madero Pte.s/n. y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,  
C.P. 64460 Monterrey, N.L. Mexico Apartado Postal 1-4469 Tels.: 8347-6698 y 8333-5456  
E-mail: serviciotraumatologiahu@gmail.com