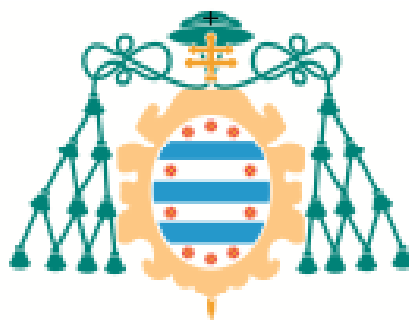




Universidad de Oviedo

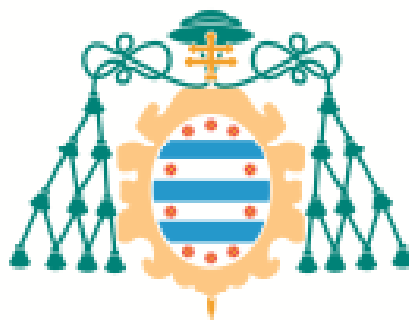
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

**“Estudio in vitro del efecto del medio
condicionado de las células madre de
cérvix uterino humano (hUCESC) en los
fibroblastos sinoviales en artrosis”**

PABLO GARCIA PORTABELLA

Oviedo, Noviembre 2024



Universidad de Oviedo

**Departamento de Cirugía y
Especialidades Médico-Quirúrgicas**

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

**“Estudio in vitro del efecto del medio
condicionado de las células madre de
cérvix uterino humano (hUCESC) en los
fibroblastos sinoviales en artrosis”**

Doctorando:

Pablo García Portabella

Directores:

Dra. Noemí Eiró Díaz

Dr. Miguel Ángel Suárez Suárez

Oviedo, Noviembre 2024



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma:	Inglés:
Estudio in vitro del efecto del medio condicionado de las células madre de cérvix uterino humano (hUCESC) en los fibroblastos sinoviales en artrosis	In vitro study of the effect of the conditioned medium of human uterine cervical stem cells (hUCESC) on synovial fibroblasts in osteoarthritis

2.- Autor	
Nombre: Pablo García Portabella	
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

La artrosis es la enfermedad articular más común en el mundo desarrollado, caracterizada por la degradación progresiva del cartílago, la aparición de dolor mecánico y la pérdida de función articular. Los fibroblastos sinoviales tienen un papel clave en la patogénesis de la artrosis al contribuir tanto a la inflamación como a la degradación de la matriz extracelular (MEC) y a la rigidez secundaria a la fibrosis sinovial. Estos fibroblastos secretan enzimas proteolíticas, como las metaloproteasas (MMPs), que descomponen la MEC, lo que agrava la inflamación y favorece el daño condral. La respuesta inflamatoria es impulsada por una serie de citocinas secretadas por los fibroblastos, incluyendo IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-15 e IL-17A, así como el receptor tipo Toll 4 (TLR-4), que amplifican los procesos catabólicos, agravan la degradación articular y favorecen la aparición de dolor. Las células madre mesenquimales (CMM), reconocidas por sus propiedades antiinflamatorias, han surgido como una opción terapéutica prometedora. Las células madre de cérvix uterino humano (hUCESC) situadas en el epitelio de transición del cuello uterino son unas CMM con importantes propiedades entre las que destacan el efecto antiinflamatorio e inmunomodulador, propiedades regenerativas, antitumorales y antimicrobianas. Se ha investigado el uso del medio condicionado o secretoma de hUCESC, que contiene factores bioactivos sin los riesgos asociados al uso de células vivas, así como presenta un manejo y aplicación clínica más sencillos. Este secretoma ha mostrado capacidad para reducir la proliferación de los fibroblastos y modular la actividad de MMPs, favoreciendo un entorno antiinflamatorio.

Este estudio analiza la eficacia del secretoma de hUCESC en la modulación de la actividad de fibroblastos sinoviales y la inhibición de la inflamación y degradación de la MEC en modelos in vitro de artrosis. Así mismo, se analiza el papel de los inhibidores de metaloproteasas (TIMP-1 y TIMP-2) como mecanismo de acción del secretoma.

Los resultados obtenidos indican que el secretoma de hUCESC disminuye significativamente la expresión de MMP-3 y MMP-13, lo cual contribuye a un entorno más favorable para la regulación de la inflamación y la degradación de la MEC. Además, se ha observado que el secretoma inhibe la proliferación y la capacidad de invasión de los fibroblastos, un aspecto crucial en la progresión de la artrosis. También se ha observado que el secretoma reduce la producción de IL-15, una citocina relevante en la percepción del dolor, la severidad de las lesiones artrósicas, y la amplificación de la inflamación.

Por otra parte, se evidenció la implicación de los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP-1 y TIMP-2) en el mecanismo de acción del secretoma sobre la capacidad de invasión de los fibroblastos sinoviales. En efecto, el bloqueo de TIMP-1 y TIMP-2 demostró que son factores clave para inhibir la invasión de los fibroblastos.

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que el secretoma de hUCESC



podría representar una vía terapéutica innovadora, enfocándose en la reducción de la inflamación y en la modulación de los fibroblastos sinoviales, sin que se hayan analizado directamente sus efectos sobre otros tejidos, como los condrocitos. Los hallazgos invitan a realizar estudios adicionales para confirmar estos resultados y evaluar la aplicabilidad clínica. Este enfoque podría abrir nuevas estrategias mínimamente invasivas que busquen mejorar la calidad de vida de los pacientes, ofreciendo una opción segura y efectiva para mitigar los síntomas y ralentizar la progresión de la artrosis.

RESUMEN (en Inglés)

Osteoarthritis is the most prevalent joint disease in developed countries, characterized by progressive cartilage degradation, mechanical pain, and loss of joint function. Synovial fibroblasts play a key role in osteoarthritis pathogenesis by contributing to both inflammation and extracellular matrix (ECM) degradation, as well as stiffness secondary to synovial fibrosis. These fibroblasts secrete proteolytic enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMPs), which break down the ECM, exacerbating inflammation and promoting cartilage damage. The inflammatory response is driven by a series of cytokines secreted by fibroblasts, including IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-15, and IL-17A, as well as Toll-like receptor 4 (TLR-4), which amplify catabolic processes, worsen joint degradation, and enhance pain onset. Mesenchymal stem cells (MSCs), recognized for their anti-inflammatory properties, have emerged as a promising therapeutic option. Human cervical stem cells (hUCESCs), located in the transition epithelium of the uterine cervix, are a type of MSC with significant attributes, including anti-inflammatory and immunomodulatory effects, regenerative potential, and antitumor and antimicrobial properties. The use of hUCESC-conditioned medium, or secretome, which contains bioactive factors without the risks associated with live cell use and offers easier clinical handling and application, has been investigated. This secretome has demonstrated the ability to reduce fibroblast proliferation and modulate MMP activity, promoting an anti-inflammatory environment.

This study investigates the efficacy of hUCESC secretome in modulating synovial fibroblast activity and inhibiting inflammation and ECM degradation in in vitro osteoarthritis models. Additionally, the role of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) as a mechanism of action of the secretome is analyzed.

The results indicate that hUCESC secretome significantly reduces MMP-3 and MMP-13 expression, contributing to a more favorable environment for inflammation regulation and ECM degradation control. Furthermore, the secretome was found to inhibit fibroblast proliferation and invasive capacity, a critical aspect in osteoarthritis progression. The secretome also reduces IL-15 production, a cytokine relevant in pain perception, lesion severity, and inflammatory amplification.

Moreover, the involvement of TIMP-1 and TIMP-2 in the secretome's mechanism of action on synovial fibroblast invasiveness was evidenced. Blocking TIMP-1 and TIMP-2 demonstrated that they are key factors in inhibiting fibroblast invasion.

The results of this study highlight that hUCESC secretome may represent an innovative therapeutic avenue, focusing on inflammation reduction and synovial fibroblast modulation, although its effects on other tissues, such as chondrocytes, were not directly analyzed. The findings encourage further studies to confirm these results and assess clinical applicability. This approach could open new minimally invasive strategies aimed at improving patient quality of life, offering a safe and effective option to alleviate symptoms and slow osteoarthritis progression.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____

Dedicado a mi hermano Julián

AGRADECIMIENTOS:

Quisiera agradecer su apoyo a todos aquellos que han colaborado en la realización de esta obra, ya que sin su ayuda no hubiese sido posible:

A los directores de este trabajo de tesis doctoral:

- Prof. Dr. Miguel Ángel Suárez Suárez, por sus aportaciones, consejo, disponibilidad, supervisión formal hasta el extremo, y exigencia de capacidad de mejora que obliga a sacar lo mejor de uno mismo.
- Dra. Noemí Eiró Díaz, por su apoyo constante al proyecto, buena disposición inquebrantable, guía fundamental de este trabajo, y ejemplo continuo de lo que es la excelencia en la investigación.

A la Unidad de Investigación de la Fundación Hospital de Jove, bajo la dirección del Dr. Francisco Vizoso Piñeiro, responsables de que este trabajo pudiera llevarse a cabo. Mi infinito agradecimiento a todos y cada uno de los participantes en este proyecto.

Al Servicio de Traumatología de la Fundación Hospital de Jove, bajo la dirección del Dr. Jaime Barrio Bernardo-Rúa, por su apoyo a este estudio y ayuda para la toma de las muestras quirúrgicas.

Al personal de enfermería de quirófano de la Fundación Hospital de Jove, siempre implicado y dispuesto a facilitar la labor de la toma de muestras.

A todos y cada uno de los pacientes que amablemente accedieron voluntariamente a participar en este estudio, siempre dispuestos a colaborar con la Investigación.

A los Servicios de Biblioteca de la Fundación Hospital de Jove y del Hospital Valle del Nalón, por su orientación y consejo que ha posibilitado el acceso a toda la documentación requerida para la redacción del presente texto.

A mi hija Marta García Palacio, cuya capacidad artística ha permitido dar un diseño hermoso a los dibujos que ilustran la obra.

Y por supuesto a toda mi familia, por su paciencia conmigo y su apoyo durante todo este proyecto.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

AH-BPM: Ácido hialurónico de bajo peso molecular.

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo.

ARN: Ácido ribonucleico.

CAF: Cancer-Associated Fibroblasts (Fibroblastos asociados al cáncer).

CD: Clúster de Diferenciación.

COX-2: Ciclooxygenasa 2.

CMM: Célula madre mesenquimal.

DAMP: Damage-Associated Molecular Patterns (Patrones moleculares asociados a daño)

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium F12.

EPISER: Estudio Epidemiológico de la Sociedad Española de Reumatología.

FBS: Suero Fetal Bovino.

FS: Fibroblastos sinoviales.

HMGB1: High Mobility Group Box 1 (Proteína de Caja de Alta Movilidad 1).

hUCESC: Human Uterin Cervix Stem Cells. Células Madre de Cérvix Uterino Humano.

IL: Interleucina.

IFN: Interferón.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos.

MC-hUCESC: Medio Condicionado (secretoma) de las hUCESC.

MEC: Matriz Extracelular.

MMP: Metaloproteasa.

NF- κ B: Factor nuclear kappa B.

NO: Óxido Nítrico.

OA: Osteoarthritis (artrosis).

OARSI: Sociedad Internacional de Investigación en OA.

PAMP: Pathogen-Associated Molecular Patterns (Patrones moleculares asociados a patógenos).

PBS: Phosphated buffered saline. Tampón salino.

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

PGE: Prostaglandina E.

PI3K/AKT: Fosfatidilinositol 3-cinasa/Proteína cinasa B

PRP: Plasma Rico en Plaquetas.

qPCR: PCR cuantitativa.

RANK: Receptor Activador del factor Nuclear Kappa-B.

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

RT: Room Temperature. Temperatura ambiente

SA: Sinovial artrósica

SC: Stem cell. Célula madre.

SN: Sinovial normal.

SYSADOA: Fármacos Sintomáticos de Acción Lenta en la OA.

TIMP: Inhibidor tisular de metaloproteasa.

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante β

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α .

TLR: Receptor tipo Toll.

WST-1: Water-soluble tetrazole. Tetrazolio soluble en agua.

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. ARTROSIS.....	6
1.1.1. Definición, sintomatología, epidemiología.....	6
1.1.2. Etiopatogenia.....	9
1.1.3. Tratamiento.....	10
1.1.3.1. Terapia no farmacológica.....	10
1.1.3.2. Terapia farmacológica.....	11
1.1.3.3. Terapia intraarticular.....	12
1.1.3.4. Nuevas terapias.....	12
1.1.3.5. Tratamiento quirúrgico.....	13
1.2. PAPEL DE LOS FIBROBLASTOS EN LA ARTROSIS	14
1.3. PAPEL EN LA ARTROSIS DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS Y CONDROLÍTICOS.....	19
1.3.1. Interleucinas, TNF- α , TLR-4.....	19
1.3.2. Metaloproteasas.....	22
1.4. MEDICINA REGENERATIVA Y CÉLULAS MADRE.....	24
1.4.1. Medicina regenerativa.....	24
1.4.2. Definición de células madre.....	25
1.4.3. Fuentes de obtención de células madre.....	26
1.4.4. Mecanismos de acción de las células madre en la patología del aparato locomotor.....	28
1.4.5. Vías de aplicación de células madre en el aparato locomotor.....	29
1.4.5.1. Técnicas de trasplante de CMM sobre matriz.....	29
1.4.5.2. Técnicas de CMM inyectadas.....	30
1.4.5.3. Técnicas de CMM con medio de liberación terapéutica intraarticular.....	30
1.4.6. Usos actuales de las células madre en la patología del aparato locomotor...31	
1.5. CÉLULAS MADRE DE CÉRVIX UTERINO.....	33
1.5.1. Origen, definición, localización y caracterización.....	33
1.5.2. Función.....	34
1.6. SECRETOMA DE LAS CÉLULAS MADRE DE CÉRVIX UTERINO.....	35
1.6.1. Definición de medio condicionado de hUCESC.....	35
1.6.2. Efectos del secretoma de hUCESC en los fibroblastos sinoviales.....	35
1.6.3. Efectos del secretoma de hUCESC en los mediadores inflamatorios	36

1.7. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO.....	37
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
3.1. MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL	43
3.1.1. Toma de muestras sinoviales.....	43
3.1.2. Procesamiento de las muestras.....	48
3.1.3. Caracterización de los fibroblastos sinoviales.....	49
3.1.3.1. Cálculo del tamaño muestral.....	51
3.1.4. Producción del secretoma de hUCESC.....	51
3.1.4.1. Aislamiento y caracterización de las hUCESC.....	51
3.1.4.2. Obtención del secretoma/MC-hUCESC.....	52
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 1.....	53
3.2.1. Procesamiento inicial.....	53
3.2.2. Extracción del ARN.....	53
3.2.3. Síntesis del ADNc.....	55
3.2.4. PCR a tiempo real.....	55
3.2.5. Análisis estadístico.....	57
3.3. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 2.....	58
3.3.1. Procesamiento inicial.....	58
3.3.2. Extracción del ARN.....	59
3.3.3. Síntesis del ADNc.....	60
3.3.4. PCR a tiempo real.....	61
3.3.5. Análisis estadístico.....	62
3.4. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 3.....	64
3.4.1. Procesamiento inicial.....	64
3.4.2. Extracción del ARN.....	65
3.4.3. Síntesis del ADNc.....	66
3.4.4. PCR a tiempo real.....	67
3.4.5. Análisis estadístico.....	69
3.5. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 4.....	70
3.5.1. Estudio de proliferación.....	70
3.5.2. Análisis estadístico.....	72

3.6. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 5.....	73
3.6.1. Estudio de invasión.....	74
3.6.2. Análisis estadístico.....	75
3.7. MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 6.....	76
3.7.1. Estudio de inmunoprecipitación.....	77
3.7.2. Estudio de invasión tras inmunoprecipitación.....	77
3.7.3. Análisis estadístico.....	79
 4. RESULTADOS.....	 81
4.1. RESULTADOS DEL OBJETIVO 1.....	82
4.1.1. Estadística descriptiva.....	82
4.1.2. Estadística inferencial.....	83
4.1.3. Representación gráfica de los resultados.....	85
4.2. RESULTADOS DEL OBJETIVO 2.....	87
4.2.1. Estadística descriptiva.....	87
4.2.2. Estadística inferencial.....	89
4.2.2.1. Análisis comparativo de los grupos de estudio antes y después de ser estimulados con IL-1 β	 89
4.2.2.1.1. Análisis entre grupos Sinovial Normal antes y después de estimulación con IL-1 β	 89
4.2.2.1.2. Análisis entre grupos Sinovial Artrósica antes y después de estimulación con IL-1 β	 91
4.2.2.2. Análisis entre Sinovial Normal y Sinovial. Artrósica tras ser estimulados con IL-1 β	 93
4.2.3. Representación gráfica de los resultados.....	96
4.3. RESULTADOS DEL OBJETIVO 3.....	101
4.3.1. Estadística descriptiva.....	101
4.3.2. Estadística inferencial.....	104
4.3.3. Representación gráfica de los resultados.....	108
4.4. RESULTADOS DEL OBJETIVO 4.....	112
4.4.1. Estadística descriptiva.....	112
4.4.2. Estadística inferencial.....	113
4.4.3. Representación gráfica de los resultados.....	114

4.5. RESULTADOS DEL OBJETIVO 5.....	116
4.5.1. Estadística descriptiva.....	116
4.5.2. Estadística inferencial.....	117
4.5.3. Representación gráfica de los resultados.....	118
4.6. RESULTADOS DEL OBJETIVO 6.....	120
4.6.1. Estadística descriptiva.....	120
4.6.2. Estadística inferencial.....	121
4.6.3. Representación gráfica de los resultados.....	123
5. DISCUSIÓN.....	125
5.1. Discusión del Objetivo 1.....	126
5.2. Discusión del Objetivo 2.....	128
5.3. Discusión del Objetivo 3.....	131
5.4. Discusión del Objetivo 4.....	133
5.5. Discusión del Objetivo 5.....	134
5.6. Discusión del Objetivo 6.....	136
5.7. Discusión general.....	138
5.8. Limitaciones del Estudio.....	141
5.9. Futuras líneas de Investigación.....	143
6. CONCLUSIONES.....	144
7. ANEXOS.....	146
8. BIBLIOGRAFÍA.....	151

1

Introducción

1.1 ARTROSIS

1.1.1 Definición, sintomatología, y epidemiología

La artrosis u osteoartritis es el proceso patológico articular más prevalente del mundo desarrollado. Si bien puede afectar a todas las articulaciones que presenten membrana sinovial, las localizaciones más importantes por su frecuencia y morbilidad son la cadera, la rodilla, la mano y la columna vertebral. (Glyn-Jones et al., 2015)

La artrosis consiste en el desgaste progresivo e irreparable de los diferentes componentes de la articulación abocando a una pérdida de la calidad estructural de estos y de la capacidad funcional articular. La aparición de la artrosis está principalmente asociada a la edad, si bien existen una serie de factores que aceleran su aparición es una enfermedad crónica que hasta el momento no puede revertirse y por tanto curarse. Sin embargo, hay una serie de estrategias y tratamientos que permiten aliviar los síntomas y proteger la articulación para cesar su avance y procurar evitar su aparición. Por otra parte, el tener artrosis no es sinónimo de padecer dolor. En los casos leves y moderados es posible controlar la sintomatología e incluso sufrir una artrosis sin ningún tipo de dolor ni dificultad funcional.

La artrosis se clasifica en dos tipos principales: primaria (idiopática) y secundaria. Las causas más comunes de artrosis secundaria incluyen lesiones postraumáticas, displásicas, infecciosas y procesos inflamatorios. Las lesiones del cartílago articular pueden desencadenar la aparición temprana de la artrosis, lo que afecta significativamente la función y la calidad de vida de los pacientes. (Peláez et al., 2021)

Los signos principales de la artrosis son dolor, rigidez matutina transitoria y crepitación articular, lo que puede causar inestabilidad y discapacidad física, afectando negativamente la calidad de vida del paciente. (Martel-Pelletier et al., 2016)

La sintomatología más limitante es el dolor que aumenta con la actividad, sobre todo a lo largo de la jornada. En los momentos con sintomatología más intensa, la articulación afectada suele estar más caliente que la contralateral y en ocasiones se encuentra inflamada y enrojecida.

El segundo síntoma en frecuencia es la rigidez articular que limitará la capacidad de movimiento de la articulación afecta. Si la artrosis está muy avanzada lo que vamos a ver es una deformidad de la anatomía de la articulación. Cuando afecta a la extremidad inferior se producirá por tanto una alteración del eje de carga cuando la artrosis afecta a cadera, rodilla o tobillo.

La artrosis suele afectar a articulaciones diartrosis, esto es articulaciones sinoviales formadas por las superficies articulares revestidas de un cartílago hialino, una cápsula articular sinovial y ligamentos de refuerzo.

Las principales localizaciones de la artrosis en las extremidades son la cadera, la rodilla, la mano, el pie y el tobillo. Existen otras localizaciones posibles, mucho menos frecuentes, como son el hombro, el codo, y la muñeca. Las articulaciones de la columna vertebral también pueden sufrir con gran frecuencia artrosis si bien en sentido estricto ésta se produce en las articulares interapofisarias posteriores de la columna dado que éstas son las articulaciones que realmente son sinoviales. Las articulaciones entre los cuerpos vertebrales también pueden sufrir un proceso degenerativo similar a la artrosis, pero debido a que éstas son sínfisis intervertebrales, esto es articulaciones cartilaginosas/sínfisis y que por tanto no poseen tejido sinovial, su proceso degenerativo no es equivalente al proceso artrósico de las articulaciones diartrosis.

Aunque la etiología no está completamente esclarecida, los factores genéticos, así como los cambios fisiológicos relacionados con la edad, la etnia y los factores biomecánicos, desempeñan un papel crucial en su desarrollo. Además, la prevalencia de la artrosis es mayor en mujeres que en hombres, y el riesgo de desarrollarla aumenta después de la menopausia.

El estudio de la incidencia y prevalencia de la artrosis en la población se realiza de forma separada en función de las diferentes localizaciones articulares. Por otra parte, la comparación de los diferentes estudios suele resultar complejo dado que los criterios de definición de la artrosis varían dependiendo de qué parámetros se tengan en cuenta. Se suelen emplear criterios de hallazgos radiológicos y se complementan con la presencia de los principales síntomas clínicos (dolor y rigidez). En ningún caso se emplean criterios anatomopatológicos para definir la presencia de la enfermedad debido a que ello implicaría realizar estudios invasivos que no están éticamente justificados.

Se estima que 240 millones de personas en todo el mundo padecen artrosis sintomática, incluido el 10 % de los hombres y el 18 % de las mujeres de más de 60 años. (Allen et al., 2022)

Estimaciones recientes encontraron que, a nivel mundial, la prevalencia estandarizada por edad y la tasa de incidencia estandarizada por edad de artrosis de cadera y rodilla fueron de 3754,2 por 100.000 habitantes y de 181,2 por 100.000 personas por año, respectivamente, lo que representa aumentos del 9,3% y del 8,2% desde 1990 a 2017. (Safiri et al., 2020)

La Sociedad Española de Reumatología llevó a cabo el EPISER2000 un estudio español de prevalencia de artrosis en el 2000. Un nuevo estudio EPISER2016 actualizó los datos más recientemente tomando como población muestral los individuos mayores de 40 años. El estudio concluye que en España en la población estudiada (mayores de 40 años) la prevalencia de artrosis en una o más de las localizaciones estudiadas (incluyendo cadera, rodilla, mano y columna vertebral) fue de 29,35%. La prevalencia de artrosis-cervical fue del 10,10% y de artrosis-lumbar del 15,52%. Ambas fueron más frecuentes en mujeres y a mayor edad. La prevalencia de artrosis de cadera fue del 5,13% y la de artrosis de rodilla del 13,83%; estas se asocian con el sexo femenino, sobrepeso y obesidad, un bajo nivel de estudios y la edad avanzada. La prevalencia de la artrosis de mano fue del 7,73%. Es más frecuente en mujeres, obesas, con bajo nivel de estudios y mayor edad. (Blanco et al., 2021)

1.1.2 Etiopatogenia

En la artrosis la membrana sinovial desarrolla una respuesta inflamatoria que incide de manera decisiva en la patogenia y en el grado de manifestación clínica de la enfermedad. Se puede constatar la proliferación de las células sinoviales residentes, así como la acumulación de una variada población de células inflamatorias en la membrana y el líquido sinovial. También se han descrito diversos grados de sinovitis en estadios tempranos de la enfermedad. Por otra parte, la inflamación se refleja claramente en muchos de los signos y síntomas de la artrosis, tales como calor, enrojecimiento, edema e hinchazón. Recientes estudios sugieren una asociación entre la inflamación y la progresión de los cambios estructurales en la artrosis. Asimismo, nuevas investigaciones han subrayado la importancia de los fibroblastos sinoviales en la patogénesis de la artrosis.

A pesar de que hasta la fecha no se ha encontrado una solución completa para la enfermedad, nuestro entendimiento sobre la etiopatogenia de la artrosis ha avanzado considerablemente en las últimas décadas. La artrosis implica cambios tanto en la forma como en la producción de los condrocitos, así como alteraciones en la estructura y composición química de la matriz extracelular. Los condrocitos son responsables de producir gran parte de las enzimas que contribuyen al deterioro del cartílago. Además, se ha comprobado que la familia de las metaloproteinasas (MMP) desempeña un papel crucial en este proceso. Hay una tendencia a considerar el inicio de la artrosis como una afección principalmente del cartílago. El cartílago articular, el hueso subcondral y la membrana sinovial son los principales tejidos afectados por los cambios que conducen a la artrosis.(Martel-Pelletier & Pelletier, 2010) La fisiopatología de la artrosis implica la formación de osteofitos, la remodelación del hueso subcondral, la inflamación sinovial y la degradación del cartílago articular, lo que resulta en una pérdida de la función articular normal.(Peláez et al., 2021)

Aunque la degradación del cartílago articular es una de las características clave de la artrosis, la inflamación de la membrana sinovial también desempeña un papel crucial en su desarrollo y progresión. Estudios histológicos e inmunológicos han revelado la

presencia de inflamación sinovial en la mayoría de los pacientes con artrosis, ya sea de manera focal o dispersa.

La activación de los receptores de reconocimiento de patrones y la cascada del complemento resulta en la activación transcripcional de genes implicados en la inflamación, principalmente genes que codifican mediadores solubles como citocinas y quimiocinas. Estos mediadores son sintetizados por diversos tipos celulares, incluyendo macrófagos, condrocitos y fibroblastos sinoviales. En tejidos y fluidos articulares se pueden detectar una amplia gama de citocinas y quimiocinas, que pueden servir como marcadores de la respuesta inflamatoria sinovial. Estos mediadores también desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la inflamación articular y en la destrucción de la matriz del cartílago característica de la artrosis. (Kapoor et al., 2011; Scanzello & Goldring, 2012)

1.1.3 Tratamiento

En el tratamiento de la artrosis se emplean varias líneas terapéuticas que progresiva y secuencialmente se van añadiendo a medida que la enfermedad progresa. De esta forma, se inicia siempre por la terapia no farmacológica, que incluye la modificación de los factores de riesgo y la terapia física, se sigue con la terapia farmacológica, tanto sistémica como local o intraarticular, y por último los tratamientos quirúrgicos. (Abramoff & Caldera, 2020)

1.1.3.1 Terapia no farmacológica

Entre las recomendaciones de la Osteoarthritis Research Society International (OARSI) se consideran adecuados la reducción de los factores de riesgo modificables mediante la pérdida de peso y el ejercicio regular. Asimismo, se recomiendan el uso de bastón en la artrosis de rodilla, el uso de terapia biomecánica como el uso de ortesis de descarga principalmente en la artrosis de rodilla y en la rizartrrosis, y ciertas terapias alternativas como son el Tai-Chi, el yoga, la balneoterapia o la gimnasia acuática en

pacientes con artrosis múltiple o los programas de educación para pacientes de automanejo artrítico que han mostrado ser beneficiosos en la mejora del dolor y la discapacidad. (Bannuru et al., 2019; Du et al., 2011)

1.1.3.2 Terapia farmacológica

El paracetamol y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) siempre habían sido considerados la primera línea terapéutica farmacológica en el tratamiento de la artrosis y en muchos casos su uso precede a la puesta en marcha de la terapia no farmacológica. Entre las últimas recomendaciones de la OARSI están tanto los AINEs de forma sistémica, como, sobre todo en artrosis que no sea de cadera, los AINEs tópicos. El uso del paracetamol ha dejado la primera línea de recomendación debido a su potencial efecto secundario de afectación hepática. En el caso de los AINEs se debe tener en cuenta su contraindicación en pacientes que presentan comorbilidades que se puedan ver agravadas por los efectos secundarios de su uso como es la patología gastrointestinal, en cuyo caso se optará por los inhibidores selectivos de la COX-2, así como la patología cardiovascular en cuyo caso el uso de estos últimos está también contraindicado.

Paradójicamente al uso habitual que de ellos se realiza en la práctica clínica diaria tanto por los médicos de atención primaria como por los especialistas en cirugía ortopédica, el uso de los opioides no se halla refrendado por las recomendaciones de la OARSI que consideran que el efecto de su uso es incierto en el manejo de la artrosis y sus efectos secundarios no justifican su empleo.

Múltiples terapias farmacológicas han sido desarrolladas e implementadas en los últimos años si bien el último consenso de la OARSI no las recomienda por su baja eficacia probada. Entre estos fármacos encontramos los SYSADOA (glucosamina, condroitínsulfato y diacereína), el colágeno, el metotrexato, los bifosfonatos, la calcitonina, la colchicina, la duloxetina, la doxiciclina, los ácidos grasos poliinsaturados (Omega 3/6), y la capsaicina tópica, muchos de los cuales han sido empleados como tratamiento de la artrosis. Otros fármacos como las estatinas o los inhibidores del TNF- α no han probado todavía su efectividad. (Bannuru et al., 2019)

1.1.3.3 Terapia intraarticular

El uso tanto de corticoides como de ácido hialurónico únicamente se recomienda por la OARSI en el tratamiento de la artrosis de rodilla, quedando en el resto de las articulaciones como terapia alternativa y de incierta efectividad. La infiltración intraarticular de corticoides puede proporcionar mayor alivio del dolor a corto plazo, mientras que la de ácido hialurónico puede mejorar el dolor a partir de las 12 semanas de tratamiento, presentando un efecto mantenido en el tiempo (6 a 12 meses) y poseyendo un perfil de seguridad a largo plazo más favorable que las infiltraciones repetidas de corticoides. Recientemente, se ha valorado la posibilidad de combinar el ácido hialurónico con otros agentes antiinflamatorios pudiendo mejorar la efectividad del tratamiento gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Pérez Expósito et al., 2024).

1.1.3.4 Nuevas terapias

El ranelato de estroncio que inhibe la resorción de hueso subcondral gracias a su actividad sobre la osteoprotegerina, el ligando RANK y las MMP, y presenta un efecto beneficioso sobre el cartílago in vitro, ha sido desaconsejado por la OARSI por su potencial toxicidad en la práctica clínica.

En contrapartida, el tanezumab, un anticuerpo monoclonal altamente selectivo contra el Factor de Crecimiento Nervioso, ha demostrado su efectividad al frenar el efecto de este factor en la expresión de sustancias relacionadas con el dolor y la sensibilización de neuronas nociceptivas. De esta forma, la OARSI reconoce los beneficios de su uso para el alivio del dolor y mejora de la función articular en la artrosis tanto de rodilla como de cadera. (Y. Wu et al., 2018)

Las infiltraciones de plasma rico en plaquetas son desaconsejadas por la OARSI por falta de evidencia de su efectividad. En cuanto a la infiltración de células madre

intraarticulares la OARSI actualmente las desaconseja al considerarlas de efecto incierto por razones tanto de seguridad al tratarse de una terapia celular, como por la potencial falta de especificidad de las formulaciones de células madre empleadas en los distintos ensayos previos. (Bannuru et al., 2019)

1.1.3.1 Tratamiento quirúrgico

La artroplastia total es el gold estándar del tratamiento de la artrosis severa que no responde a tratamiento conservador o en el que el dolor afecta gravemente a la calidad de vida del paciente (Abramoff & Caldera, 2020).

Si bien la artroplastia no se halla exenta de complicaciones como la infección, la luxación, la trombosis venosa profunda, o la dehiscencia de la herida, éstas pueden y deben ser prevenidas y, llegado el caso, adecuadamente resueltas con los protocolos actuales de tratamiento. Por otra parte, el riesgo que se asume es ampliamente superado por el beneficio que se obtiene siempre y cuando se realice una correcta indicación y se implemente una adecuada técnica quirúrgica (Varela-Egocheaga et al., 2010). En cualquier caso, la artroplastia no deja de ser una sustitución de una articulación por un dispositivo inerte con una diferencia en sus características mecánicas con respecto al hueso en el que se implanta pudiendo suponer en el paciente de mayor edad un riesgo añadido en caso de sufrir una fractura periprotésica (Aguado et al., 2024; Marqués-López et al., 2021).

En casos de afectación severa parcial de la rodilla se puede optar por la osteotomía articular o bien por la artroplastia parcial. Cuando la afectación es severa y el estado articular del paciente no permite la implantación de una prótesis se puede optar en casos seleccionados por la artrodesis. (Hunter & Bierma-Zeinstra, 2019)

1.2 PAPEL DE LOS FIBROBLASTOS EN LA ARTROSIS

La membrana sinovial es un tejido blando deformable que recubre los espacios internos de las articulaciones del tipo diartrosis (como las rodillas, los codos, los hombros, las caderas, las muñecas, etc.) y que ayuda a facilitar el movimiento de los tejidos no deformables, constituyendo un componente importante y muy específico de las articulaciones sinoviales. La arquitectura general de la sinovial consiste en una fina capa íntima fibrilar que tiene 1 a 2 capas de células de espesor y se compone predominantemente de sinoviocitos similares a fibroblastos (fibroblastos sinoviales – FS) que, a través del contacto entre células, forman una capa que recubre la membrana sinovial contra la cavidad articular y el líquido sinovial, y una capa subintimal subyacente rica en colágeno I, abundante en vasos sanguíneos y linfáticos, fibras nerviosas y grasa. (Maglaviceanu et al., 2021) Estos FS tienen una función clave al proporcionar a la cavidad articular y al cartílago adyacente moléculas lubricantes como el ácido hialurónico, así como nutrientes derivados del plasma, y de esta forma lubricar y nutrir el cartílago de las articulaciones. A diferencia de otras membranas limítrofes de nuestro cuerpo, como por ejemplo las membranas epiteliales, la membrana sinovial no tiene membrana basal, lo que la diferencia significativamente de la composición clásica de otras membranas epiteliales. Suspendidas en su matriz de tejido conectivo, varios tipos de células dan a la membrana sinovial sana sus funciones homeostáticas especializadas (Figura 1).

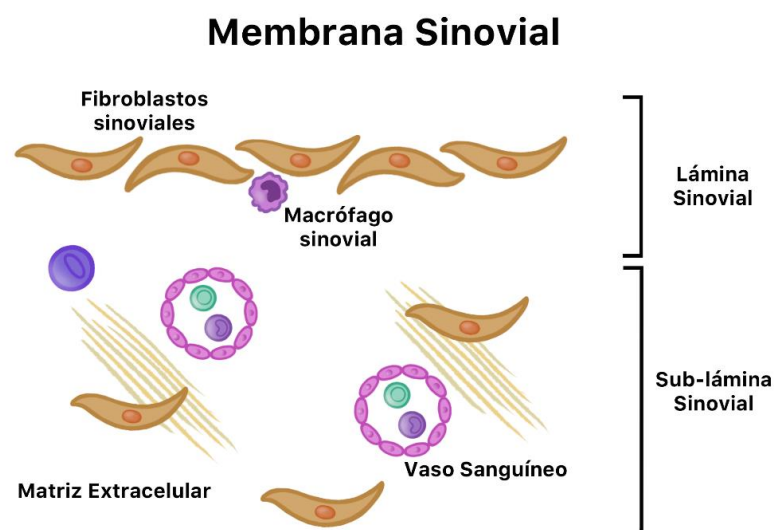


Figura 1: Membrana sinovial.

Los FS también producen componentes de la matriz extracelular (MEC), dirigen el ensamblaje de la matriz y controlan el recambio de la MEC para influir en la estructura de la matriz sinovial. (Pap et al., 2020) Por otra parte, los macrófagos sinoviales participan en la defensa inmunológica, y las células madre mesenquimales (CMM) proliferan en respuesta a una lesión pudiendo diferenciarse en condrocitos, osteocitos, miocitos o adipocitos. (Figura 2)

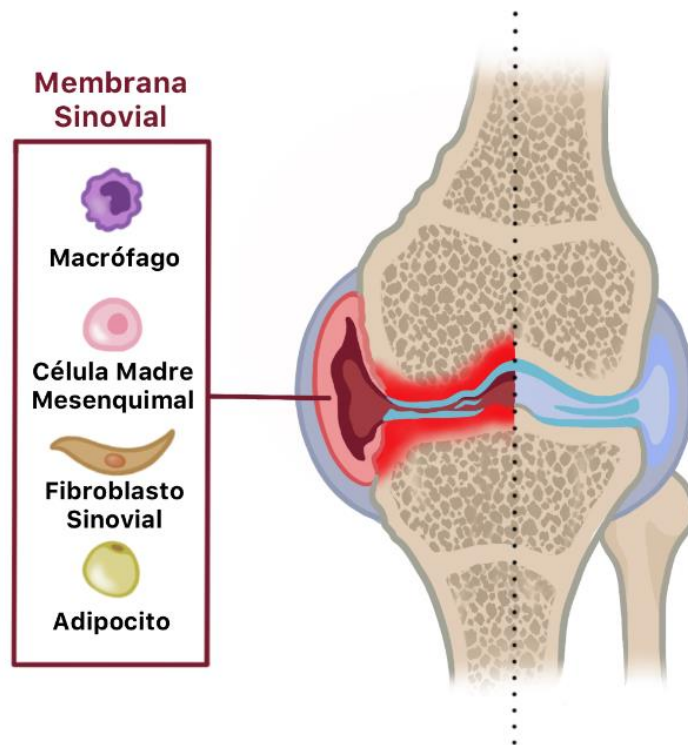


Figura 2: Articulación sinovial o diartrosis.

Las células de la membrana sinovial confieren al tejido su función homeostática especializada, pero también pueden desempeñar un papel decisivo en la patogénesis de la artrosis. Debido a su linaje de fibroblastos, los fibroblastos sinoviales se consideran los principales culpables de la fibrosis sinovial, un proceso que resulta en una deposición excesiva de MEC y se asocia con síntomas de dolor articular crónico en la artrosis. Se han descrito cuatro tipos de sinoviopatías distintas durante la artrosis: formas hiperplásica, inflamatoria, fibrótica y rica en detritus. (Pap et al., 2020)

La fibrosis sinovial se caracteriza por una proliferación excesiva de fibroblastos sinoviales, diferenciación a células similares a miofibroblastos y síntesis de MEC. Aunque la tasa de desarrollo de fibrosis en la sinovial durante la artrosis depende del

paciente y de su localización, la evidencia sugiere que surge en las últimas etapas de la enfermedad. A lo largo de la fibrogénesis, la sinovial se hipertrofia y desarrolla masas fibróticas que contribuyen al dolor crónico de las articulaciones y la rigidez experimentados en la artrosis. (Watson et al., 2010) (Figura 3)

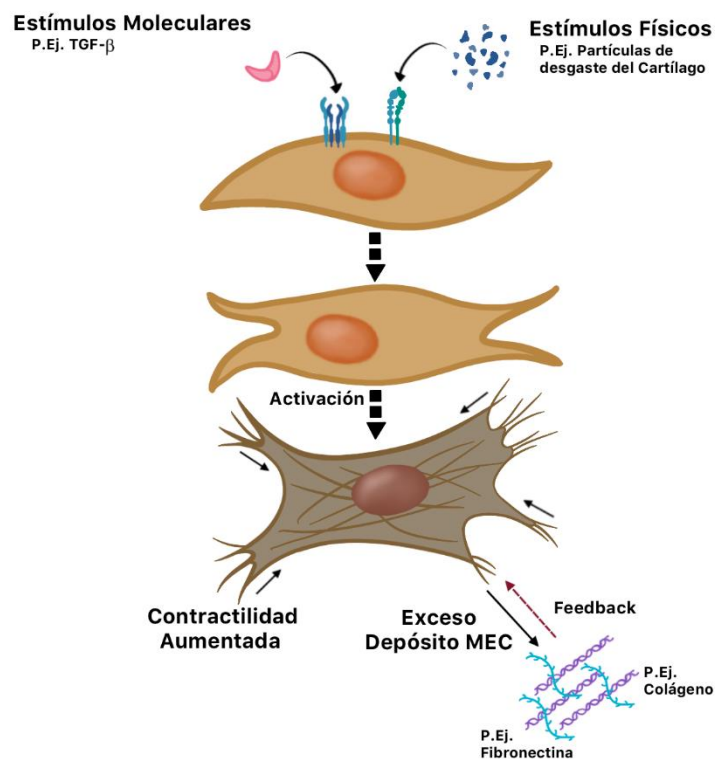


Figura 3: Estímulos y fases del fibroblasto sinovial hacia la fibrosis.

Los fibroblastos de la membrana sinovial no sólo son responsables del depósito de moléculas de MEC y su ensamblaje, sino que también participan de manera destacada en su destrucción y eliminación. Para la degradación de los componentes de la MEC, los fibroblastos sinoviales producen una diversidad de enzimas que degradan la matriz. Estos incluyen miembros de la familia de las metaloproteasas, incluidas las metaloproteasas de matriz (MMP), pero también diferentes catepsinas. La mayoría de las MMP no se expresan de forma constitutiva, sino sólo tras la inducción por estímulos específicos como citocinas, factores de crecimiento o moléculas de MEC. (Pap et al., 2000, 2020)

Los fragmentos de degradación de colágeno, así como la metaloproteasa de matriz activa (MMP-3) medida en cultivos de explantes de membrana sinovial ex vivo tratados

con estímulos proinflamatorios son biomarcadores potenciales para inflamación sinovial y fibrosis en la artrosis. (Kjelgaard-Petersen et al., 2015) De hecho, los fragmentos de degradación del cartílago probablemente desempeñan un papel importante en el desencadenamiento de una respuesta fibrótica en el FS porque la eliminación de partículas de degradación del cartílago del espacio articular mediante artroscopia proporciona cierto alivio del dolor a los pacientes, un síntoma frecuentemente asociado con la fibrosis sinovial. Los cultivos en monocapa de fibroblastos sinoviales artrósicos humanos muestran una mayor proliferación y secreción de citocinas (IL-6,-8) y MMP (MMP-9,-10,-13) en respuesta a partículas de degradación del cartílago. (Estell et al., 2019)

La composición, el patrón molecular y también la bioquímica de la membrana sinovial cambian drásticamente durante la inflamación. Los mecanismos que regulan el cambio de la inflamación aguda a la crónica dentro de la membrana sinovial no se comprenden muy bien, pero se ha demostrado que el fibroblasto sinovial contribuye significativamente a este proceso. Si la inflamación en este contexto es el iniciador o un factor clave para perpetuar la artrosis ha sido objeto de debate durante mucho tiempo, sin embargo, está claro que cualquier daño al cartílago articular, menisco o hueso subcondral conduce a la liberación de desechos de la MEC. Los fibroblastos sinoviales reaccionan a su vez aumentando la expresión de factores proinflamatorios, lo que lleva a mayor infiltración celular y angiogénesis, al tiempo que proporciona señales catabólicas a los condrocitos articulares que contribuyen a su eventual pérdida fenotípica y cambio hipertrófico. Además de dichas moléculas asociadas al daño, cada vez hay más evidencia de que los factores directamente asociados con el proceso de la enfermedad del cartílago también afectan la membrana sinovial promoviendo una reacción sinovial específica en el fibroblasto sinovial. En trastornos degenerativos de las articulaciones como la artrosis, el fibroblasto sinovial contribuye a la progresión de la enfermedad a través de la amplificación de inflamación local que conduce a un cambio hacia un catabolismo excesivo.(Pap et al., 2020)

En definitiva, dos son los mecanismos por los que los fibroblastos sinoviales influyen en la artrosis. En un primer momento se inicia con una fase inflamatoria recidivante de la sinovial, mediante la secreción de sustancias proinflamatorias (citocinas, ...), así como sustancias de degradación de la matriz (MMPs), lo que se combina en un

círculo vicioso provocado por un aumento de partículas de degradación del cartílago que realimentan a su vez la inflamación sinovial y la degradación de la matriz. En una fase más avanzada de la enfermedad se establece un empeoramiento de la clínica mediante la fibrosis sinovial secundaria a una proliferación e invasión de los fibroblastos sinoviales provocando una hipertrofia sinovial fibrótica que favorece la rigidez y el dolor característicos de la artrosis.

1.3 PAPEL DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS Y CONDROLÍTICOS EN LA ARTROSIS

Cada vez más estudios respaldan el papel fundamental de la inflamación en la patogénesis de la artrosis en relación a la alteración de la homeostasia entre citocinas inflamatorias y antiinflamatorias. Estos estudios sugieren que existe una posible relación entre la inflamación en la artrosis, la sinovitis y los cambios estructurales de la articulación. (Liu et al., 2022; Woodell-May & Sommerfeld, 2020)

La inflamación del tejido sinovial, siendo un factor clave en el desarrollo de la artrosis, está presente en todas las etapas de la enfermedad, incluso en las más tempranas. (T. Wang & He, 2018) Los sinoviocitos de personas con artrosis producen reguladores inflamatorios y enzimas que degradan la matriz, lo que también favorece la progresión de la enfermedad. (Benito et al., 2005; Fuchs et al., 2004) Diversas citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y diferentes interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17), junto con mediadores inflamatorios como PGE2 y NO, adipocinas (visfatina, resistina) y metaloproteasas de matriz (MMP-3, MMP-13), aceleran la degeneración irreversible del cartílago y contribuyen al avance de la artrosis. Este daño sobre el cartílago incrementa la inflamación sinovial, creando un ciclo vicioso que agrava la enfermedad. (Atukorala et al., 2016; Han et al., 2020)

1.3.1 Interleucinas. TNF- α . TLR-4

La IL-1 β es considerada una de las citocinas clave involucrada en la patogénesis de la artrosis habiendo sido reconocido su papel tanto en la generación de inflamación como en promoción de efectos catabólicos articulares. La IL-1 β se une a sus receptores correspondientes y promueve la liberación de citocinas pro-inflamatorias, como IL-6 e IL-8, regulando las vías de señalización el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y aumentando el contenido de MMP en las matrices de condrocitos y en los fibroblastos sinoviales. Como consecuencia, se produce la destrucción de componentes de la matriz, como proteoglicanos y colágeno tipo II. (Liu et al., 2022; Wojdasiewicz et al., 2014)

El TNF- α está involucrado en la patogénesis y progresión de la artrosis, y si bien ejerce un efecto en los condrocitos similar a la IL-1 β su efecto es menor. Sin embargo, el efecto de ambas citocinas produce un efecto sinérgico inflamatorio muy fuerte sobre los fibroblastos sinoviales provocando un aumento del grado de sinovitis y destrucción condral. (Liu et al., 2022)

La IL-6 se ve aumentada en el líquido sinovial de los pacientes con artrosis. (Mabey et al., 2016) Un aumento de IL-6 puede inducir la producción de MMP-3 y MMP-13 y promover la degradación de la matriz extracelular del cartílago destruyendo la estructura normal articular. Por otra parte, es considerada como la citocina clave que causa cambios en el hueso subcondral, potenciando la inflamación del tejido sinovial, aumentando la permeabilidad condral, y acelerando la formación osteoclástica, así como causando la absorción, degradación y destrucción del cartílago, y en última instancia produce un aumento de la proliferación de los fibroblastos sinoviales. (Liu et al., 2022; Wiegertjes et al., 2020)

La IL-15 es una citocina con un amplio conjunto de funciones biológicas, siendo considerada un componente clave de la respuesta inmune. (Liu et al., 2022) Se ha observado un aumento de IL-15 en líquido sinovial de pacientes con artrosis, y un mayor nivel de IL-15 se ha asociado a unas manifestaciones más severas de artrosis. (Tao et al., 2015) La IL-15 puede inducir la activación de macrófagos mononucleares y neutrófilos estimulando así la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17. Así mismo, existe una correlación entre el aumento de los niveles de IL-15 y la percepción del dolor y la severidad de las lesiones radiológicas de los pacientes con artrosis. (Martel-Pelletier et al., 2016; Scanzello et al., 2009; Sun et al., 2013)

La IL-17 promueve la liberación de varios factores proinflamatorios y compuestos entre los que encontramos IL-1 β , TNF- α , NO y PGE2, así como MMPs que promueven el desarrollo de artrosis y aceleran la destrucción del cartílago articular. Por otra parte, provocan la secreción de VEGF por los condrocitos y los fibroblastos sinoviales lo que conduce a una hiperplasia de la red vascular en la sinovial. (Honorati et al., 2006, 2007) La familia de citocinas IL-17 incluye seis tipos de moléculas inflamatorias (IL-17A, B,

C, D, E y F) que son producidas principalmente por células del sistema inmune como Th17, CD8⁺, $\gamma\delta$ T y NK T. Durante la inflamación, también pueden ser liberadas por neutrófilos y macrófagos. IL-17A es la citocina más estudiada de esta familia y suele ser referida simplemente como IL-17 (Xiao et al., 2023). También se ha observado que el IL-17A puede alterar la morfología condrocítica, inhibiendo la actividad de los condrocitos y promoviendo una respuesta inflamatoria que finalmente abocan en la apoptosis condrocítica (Liu et al., 2022).

Investigaciones recientes indican que la inflamación en la artrosis se desarrolla a partir de la interacción del sistema inmunológico con mediadores inflamatorios, los cuales están involucrados en el daño tisular local y la disfunción metabólica. Un factor clave es la degradación temprana del cartílago, que contribuye al desarrollo de la inflamación en la articulación, especialmente en la membrana sinovial. Se considera que los sinoviocitos perciben los fragmentos de cartílago degradado que al entrar en contacto con la sinovial como partículas extrañas generan una respuesta inflamatoria protectora. La contribución de las citocinas en el aumento de la síntesis y liberación de enzimas proteolíticas descomponedores de matriz destaca el potencial impacto de las MMPs sobre los condrocitos, las células sinoviales, los tejidos articulares y periarticulares, y otras células del sistema inmunológico que migran al sitio de la inflamación. (Mukherjee & Das, 2024)

La inmunidad innata es la capacidad del cuerpo para identificar cuerpos extraños y tejidos lesionados, y está estrechamente relacionada con las vías inflamatorias y el proceso de curación de las heridas. Diversos tipos de células participan en ambos sistemas, como los macrófagos, neutrófilos y células asesinas naturales del sistema innato, así como los linfocitos del sistema inmunológico adaptativo.

La activación del sistema inmunológico innato ocurre cuando ciertas estructuras moleculares, denominadas Receptores de Reconocimiento de Patrones, se unen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y a patrones moleculares asociados al daño (DAMP). Existen varias clases de Receptores de Reconocimiento de Patrones, como los receptores tipo Toll (TLR del inglés Toll-like receptors), los receptores tipo RIG-1 (RLR) y los receptores tipo NOD (NLR). Estos receptores pueden activar factores

de transcripción, como $\text{nF-}\kappa\text{B}$ y MAPK, lo que a su vez induce la expresión de genes que codifican enzimas y citocinas. Esto resulta en el catabolismo del cartílago a través de la regulación positiva de $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$.

Los TLR son una familia de proteínas transmembrana que desempeñan un papel crucial en el sistema inmunológico, específicamente en el reconocimiento de patógenos como bacterias, virus y hongos. El TLR 4 es uno de los miembros más estudiados de esta familia. Se encuentra expresado en la membrana celular de varias células, incluidas las células del sistema inmunitario y las células del tejido conectivo, como los condrocitos en el cartílago articular.

Específicamente, se ha encontrado que los receptores tipo Toll TLR 2 y TLR 4 están regulados positivamente en las lesiones de artrosis en comparación con el cartílago de artrosis que no está en el sitio de la lesión, así como en el cartílago normal. Además, existe evidencia de que el hialuronano y la fibronectina pueden actuar como señales de daño endógeno para activar la señalización de TLR 2 y TLR 4 en la artrosis. Una vez activadas, las células y proteasas del sistema inmunológico innato desempeñan sus funciones de manera indiscriminada, sin diferenciar si el ataque está dirigido contra un contaminante externo o contra el propio organismo. (Woodell-May & Sommerfeld, 2020)

En definitiva, el TLR4 es un receptor del sistema inmunológico con un papel fundamental en la detección de patógenos, en la respuesta inflamatoria y la degradación del cartílago articular. Su activación durante la artrosis puede desempeñar un papel crítico en la progresión de la enfermedad, lo que lo convierte en un objetivo prometedor para el desarrollo de terapias dirigidas a esta afección. (Wagner et al., 2021; Yan et al., 2019)

1.3.2 Metaloproteasas

Desde el punto de vista catabólico, el elemento más importante en la degradación del cartílago articular son las proteasas, y dentro de las diferentes familias de proteasas (metaloproteasas, serínproteasas, cisteínproteasas y aspartatoproteasas) las que ejercen un papel más destacado en el catabolismo del cartílago son las metaloproteasas (MMPs).

Entre otros criterios éstas se pueden clasificar en función de la preferencia de sustratos, y así las dividimos en collagenasas (MMP-1, -8 y -13), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromelisin (MMP-3, -10 y -11) y otras, si bien la especificidad de las MMPs no es absoluta, de forma que una sola MMP puede actuar sobre diferentes sustratos. En ciertas patologías de la articulación como en la artrosis las collagenasas se elevan dando procesos de destrucción de matriz extracelular, lo que hace de la collagenasa III o MMP-13 una proteasa clave en la fisiopatología de la artrosis. La elevación de la metaloproteasa 3 (MMP-3) se considera un marcador de artrosis avanzada. Además, se ha observado una asociación entre ciertos polimorfismos genéticos de la MMP-3 y un mayor riesgo de desarrollo de artrosis. (Guo et al., 2017; Milares et al., 2021; Plsikova Matejova et al., 2021)

Por otra parte, la actividad de las MMP está regulada por los TIMP (inhibidores tisulares de metaloproteinasas), y ambos grupos de proteínas desempeñan un papel complementario en la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Esta interacción es fundamental tanto en procesos fisiológicos de remodelación tisular como en procesos patológicos, como la invasión y metástasis del cáncer (García et al., 2010). En el cartílago encontramos TIMP-1 y TIMP-2 que son secretados al medio extracelular por los condrocitos. TIMP-1 también puede encontrarse en la membrana sinovial. (Monfort-Faure & Trujillo-Martin, 2010)

1.4 MEDICINA REGENERATIVA Y CÉLULAS MADRE

1.4.1 Medicina regenerativa

A lo largo de la historia de la Medicina varios descubrimientos han modificado sustancialmente el conocimiento y tratamiento de los problemas de salud. El descubrimiento de la penicilina y la expansión de la antibioticoterapia, así como el florecimiento de la anestesia moderna han modificado radicalmente el paradigma de tratamiento de las patologías quirúrgicas. El perfeccionamiento de la osteosíntesis tanto abierta como cerrada, así como de la protetización de las articulaciones osteoartríticas ha marcado el ritmo de avance de la cirugía ortopédica en el último siglo. Tanto la osteosíntesis como la cirugía protésica han pasado por una fase mecanicista para, posteriormente, mejorar y alcanzar las mayores tasas de éxito al asumir que la solución de los problemas de salud siempre pasa por comprender y respetar su sustrato biológico. En las últimas tres décadas se ha comenzado a vislumbrar el inicio de un nuevo paradigma de tratamiento conocido globalmente como la medicina regenerativa. (Kemp, 2006)

Tras la viabilidad de los trasplantes de órganos en los años 50'-60' y su popularización posterior, la investigación se orientó en la década de los 90' hacia la regeneración tisular con la esperanza de poder crear ex-vivo órganos que pudieran ser implantados como sustitución de otros enfermos o dañados. Las dificultades técnicas y la exigente regulación gubernamental de los países del primer mundo para los productos sanitarios de nuevo desarrollo han menoscabado las expectativas que tenían las empresas de ingeniería tisular para rentabilizar el esfuerzo realizado. A principios de la primera década del siglo XXI dichas empresas disminuyeron en más del 50% su producción y progresivamente vieron declinar las posibilidades de aplicación real de sus productos. Poco antes, a finales de los '90, dos descubrimientos hicieron resurgir el interés en el campo de la medicina regenerativa y marcaron un cambio de dirección en la investigación biológica: la clonación del primer mamífero (Wilmut I1, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, 1997) y el aislamiento de las primeras células madre de embrión humano. (Shamblott et al., 1998; Thomson et al., 1998)

1.4.2 Definición de células madre.

Las células madre (Stem Cell - SC) son células precursoras de tejido inmaduro con capacidad de autorregenerarse, de generar poblaciones de células clonadas, y de diferenciarse en múltiples linajes celulares diferentes. El potencial terapéutico de las SC depende de 3 mecanismos de acción: el primero es la capacidad de acudir a un foco de lesión aguda gracias a receptores quimiotácticos que actúan sobre receptores celulares de superficie. (Docheva et al., 2007) El segundo es la capacidad de diferenciación en diferentes tipos celulares con capacidad de implantarse localmente e inducir la restauración funcional reemplazando tejidos dañados (Deans & Moseley, 2000; Jiang et al., 2006). El tercero es la secreción de factores bioactivos que potencialmente actúan sobre procesos fisiológicos tanto locales como sistémicos. (Gnecchi et al., 2008)

Actualmente, se distinguen 3 tipos de SC: SC embrionarias derivadas del estadio inicial del embrión, SC pluripotenciales inducidas, y SC adultas. De entre los tres tipos de SC, las SC embrionarias derivadas del estadio inicial del embrión presentan grandes limitaciones éticas para su empleo terapéutico (Freitag et al., 2016). Así mismo, la mayor facilidad de obtención y procesamiento de las SC adultas frente a las SC pluripotenciales inducidas hace que sean las SC adultas las que hayan sido empleadas en la mayor parte de la experimentación y terapia regenerativa con SC.

Las SC adultas garantizan el mantenimiento y reparación de los órganos y tejidos adultos (Nejadnik et al., 2010) y se desarrollan a partir de los 3 estratos germinales primordiales. De este modo, las SC ectodérmicas se diferencian en SC neurales y SC dermales, las endodérmicas se diferencian en SC intestinales y SC parenquimatosas, y las mesodérmicas se diferencian en SC hematopoyéticas y SC mesenquimales (CMM).

Las CMM fueron identificadas por primera vez en los estudios pioneros de Friedenstein y Petrakova en 1966 (a J. Friedenstein et al., 1966), y al poseer origen mesodérmico tienen capacidad de diferenciarse en tejidos conectivos, incluyendo, entre otros, hueso, cartílago, ligamento o grasa. Asimismo, han demostrado efecto antiinflamatorio e inmunomodulador (Vangsness et al., 2014), están destacando en la

terapia celular para múltiples patologías, y son la clase de SC más ampliamente estudiada en términos de ensayos clínicos.

Las CMM son escasamente inmunogénicas y tienen igualmente una menor tendencia a la formación de teratomas en comparación con las SC embrionarias. (Li & Fu, 2012; X. Wei et al., 2013)

La Sociedad Internacional para Terapia Celular Mesenquimal (ISCT) y su Comité de Células Madre de Tejido (The International Society for Cellular Therapy's Mesenchymal y Tissue Stem Cell Committee) establecieron las características básicas de identificación de Células Madre Mesenquimales (CMM) de origen humano en 2006: (a) la adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo estándar, (b) la expresión de CD105, CD73, y CD90, y ausencia de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19, y moléculas de superficie HLA-DR, y (c) la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos en vitro. (Dominici et al., 2006) Además, las CMM son consideradas células inmunoprivilegiadas, en tanto no expresan complejos de histocompatibilidad mayor II o moléculas coestimuladoras como CD86, CD40, o CD80. (F. J. Vizoso et al., 2023)

1.4.3 Fuentes de obtención de células madre

Se han aislado CMM en múltiples tejidos adultos como músculo (Zheng et al., 2007), periostio (De Bari, Dell'Accio, et al., 2001), membrana sinovial (De Bari, Dell'Accio, et al., 2001), piel (Orciani et al., 2010), pulmón (Hua et al., 2009), pulpa dentaria (Gronthos et al., 2000), mucosa nasal olfatoria (Delorme et al., 2010), limbo corneal (Joe & Yeung, 2014), leche materna (Patki et al., 2010), sangre periférica (Villaron et al., 2004), sangre endometrial y menstrual (Ulrich et al., 2013), cervix uterino (Eiró et al., 2014), o tejidos fetales y neonatales (Igura et al., 2004), como el cordón umbilical (H. S. Wang et al., 2004). Pero de todas las localizaciones, las más frecuentemente empleadas como fuentes de obtención habitual en los estudios de aparato locomotor son la médula ósea (Diekman et al., 2013; A. J. Friedenstein et al., 1970), la grasa (De Ugarte, Alfonso,

et al., 2003; Zuk et al., 2002), y, más recientemente, el tejido sinovial (Fellows et al., 2016).

Tradicionalmente, la médula ósea ha sido la fuente de CMM habitual, a pesar de que las investigaciones han mostrado una relativa escasez de CMM en los aspirados de médula ósea. Con el lipoaspirado de tejido adiposo humano se obtiene una concentración de CMM unas 400 veces mayor que con el aspirado de médula ósea (Kern et al., 2006). A pesar de que en anteriores estudios se consideraba que las CMM de médula ósea tenían una capacidad condroprogenitora superior, varias publicaciones han sugerido que las CMM de médula ósea y de tejido adiposo poseen una capacidad condrogénica equiparable. (De Ugarte, Morizono, et al., 2003; Gao et al., 2023; Kern et al., 2006; R. H. Lee et al., 2004; Zuk et al., 2002)

En los últimos años ha ido ganando interés el uso del secretoma de las SC dado que presenta una serie de ventajas clave frente a las aplicaciones basadas en terapias con SC. El secretoma o medio condicionado de las SC es un medio de cultivo en el que dichas células vierten sus secreciones, tras lo cual se retira el componente celular quedando el material producido (citocinas, ...) sin la capacidad inmunogénica ligada a dicho componente celular. El uso del secretoma solventa problemas de seguridad potencialmente asociados al trasplante de células vivas, como son la compatibilidad inmune, la tumorigenicidad, la formación de émbolos y la transmisión de infecciones; asimismo el secretoma permite la medición de seguridad, dosis y potencia de forma análoga a los agentes farmacológicos convencionales; por otra parte, se puede almacenar de forma prolongada sin pérdida de potencia del producto y evitando la potencial toxicidad de agentes criopreservantes (Eiró et al., 2014); el secretoma es más económico y práctico para uso clínico al evitar procedimientos invasivos de obtención celular; y finalmente, el producto biológico obtenido en el secretoma podría ser modificado en función de los efectos deseados específicos de cada tipo de célula. (Caseiro et al., 2016; F. Vizoso et al., 2017)

1.4.4 Mecanismos de acción de las células madre en la patología del aparato locomotor

La respuesta fisiológica de las SC ante un traumatismo incluye la activación a partir de un estado silente, la movilización desde sus nichos, la migración al lugar de la lesión y la diferenciación de las células específicas requeridas para la curación. El microentorno local en el lugar de la lesión contiene citocinas y factores de crecimiento que atraen a las SC. Las SC están implicadas en la fisiología de las fases de curación de las heridas según estudios animales y un pequeño grupo de estudios clínicos muestran un aumento en la velocidad de curación sin cicatriz gracias a la terapia con CMM. (Isakson et al., 2015) El fluido de una herida aguda ha demostrado potenciar la proliferación de las SC mientras que el fluido entorno a una herida crónica la inhibe. (Koenen et al., 2015) Este hecho sugiere un desequilibrio de factores de crecimiento y citocinas que perjudica la curación adecuada en las heridas crónicas.

Ante una fractura se produce un aumento sistémico en el número de CMM en la médula ósea. Se requiere un número mínimo de SC en el foco fracturario para que se produzca la consolidación. Se ha asociado el déficit de CMM en el foco de fractura a la formación de pseudoartrosis atróficas. (Tawonsawatruk et al., 2014) Por otra parte, la reserva de células osteoprogenitoras disponibles para la diferenciación osteogénica se reduce con la edad. Las SC en los ancianos tienen preponderancia a la diferenciación adipocítica frente a la osteogénica. (Verma et al., 2002)

Las SC está implicadas en la fisiopatología de la artrosis postraumática y la reparación de la lesión del cartílago articular. (Plaas et al., 2011) Múltiples estudios han hallado respuesta favorable en tratamiento de la artrosis con CMM. (Plaas et al., 2011; Tawonsawatruk et al., 2014; Verma et al., 2002) No obstante, no está claro que la terapia con CMM para la artrosis pueda tratar de forma efectiva la artritis postraumática.

A pesar de estar muy vascularizado, el tejido muscular es incapaz de regenerarse completamente tras una lesión. Tras un traumatismo, como una laceración, contusión o tensión, el músculo habitualmente cura mediante fibrosis. Estudios de terapia con CMM

para la regeneración muscular tras un traumatismo han obtenido un aumento de la contractilidad junto a una menor fibrosis. (Von Roth et al., 2012)

1.4.5 Vías de aplicación de células madre en el aparato locomotor

En el caso de terapias celulares en las que se utilizan las SC directamente sobre el foco lesional a tratar, antes de decidir cuál será la forma de aplicación cabe decidir primero el origen de la SC empleada. Existen dos posibilidades en las terapias en humanos: SC autólogas o SC alogénicas. Las terapias autólogas son una opción atractiva y teóricamente más segura. No obstante, el coste de la recolección individual, aislamiento y expansión de las células en unas instalaciones adecuadas es un factor limitante. El menor coste de las terapias de CMM alogénicas ofrece una mayor accesibilidad de los pacientes a las terapias regenerativas. (Freitag et al., 2016) Se ha comprobado la seguridad de la terapia de CMM alogénicas tras la administración intraarticular repetida, (Ardanaz et al., 2016) y se ha descartado un aumento de la respuesta inmunogénica de las CMM alogénicas al exponerlas a un ambiente inflamatorio, lo que favorece dicha seguridad. (Barrachina et al., 2016, 2017) La fuente de CMM elegida dependerá de entrada de la facilidad de recolección y de la capacidad de diferenciación en el tejido elegido.

Entre las formas de aplicación de las CMM probadas en la literatura encontramos:

1.4.5.1. Técnicas de trasplante de CMM sobre matriz

De forma análoga a la empleada en las terapias con trasplantes autólogos de condrocitos, pero sustituyendo los condrocitos por CMM, varios estudios tanto preclínicos como clínicos han demostrado un resultado similar entre trasplantes autólogos de condrocitos y CMM sobre matriz en el tratamiento de lesiones focales de cartílago articular, obteniéndose un relleno adecuado del defecto con cartílago similar al hialino y

observando colágeno tipo II en la valoración histológica. (Dragoo et al., 2007; Nejadnik et al., 2010; Wakitani et al., 2002) Asimismo, se ha estudiado el uso de la matriz ósea desmineralizada junto con CMM para la formación de injerto autólogo tridimensional para la reconstrucción de defectos de huesos largos. (Dufrane et al., 2015)

1.4.5.2. Técnicas de CMM inyectadas

Ante la ineficacia de las matrices biológicas en el tratamiento de la artrosis, debido a la difusa lesión del cartílago, otros investigadores han estudiado el efecto de la inyección intraarticular de CMM. Los estudios preclínicos concluyen de forma generalizada que las inyecciones intraarticulares de CMM consiguen mejorar la función si bien son inconsistentes en lo referente a la reparación del cartílago. (Van Buul et al., 2014) Aunque los primeros estudios clínicos seguían la línea de resultados de los preclínicos (C. Centeno et al., 2011), estudios más recientes han documentado mejoras en el grosor del cartílago afecto (Emadedin et al., 2012) e incluso una regeneración meniscal tras la terapia. (Vangsness et al., 2014)

De igual modo, se han aplicado inyecciones de CMM en lesiones tendinosas (Gomes et al., 2012; Hernigou et al., 2014; S. Lee et al., 2015; Pascual-Garrido et al., 2012), y en el caso de la aplicación intramuscular, se han utilizado soluciones salinas fosfato-tamponadas. (Eliasberg et al., 2017)

1.4.5.3. Técnicas de CMM con medio de liberación terapéutica intraarticular

La función de las CMM ha sido evaluada bajo la influencia de portadores bioactivos como el plasma rico en plaquetas (PRP), en el que encontramos factores proteicos como factores de crecimiento, quimiocinas, hormonas peptídicas, fibrina y proteínas con propiedades antibacterianas y antifúngicas. (Freitag et al., 2016) Los factores de crecimiento liberados por las plaquetas pueden jugar un papel positivo en la regulación de las CMM. La combinación de PRP con CMM en inyecciones intraarticulares han demostrado un aumento de la expresión de colágeno tipo II y una

reducción de la apoptosis de los condrocitos. (Mifune et al., 2013) Si bien el PRP tiene un efecto anabólico al combinarlo con CMM, ayudando en la proliferación e inhibiendo la desregulación, se ha observado que ciertos factores del PRP, como el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), presentan efectos no deseables tanto para las articulaciones como para las CMM. La combinación de PRP y CMM ha sido la base de varios estudios de curación ósea tras fracturas o retardos de consolidación (Liebergall et al., 2013; Rodriguez-Collazo & Urso, 2015), y constituye la evolución natural de las líneas terapéuticas basadas en el uso de PRP, por lo que ya se han definido los criterios óptimos de evaluación de resultados para dicha combinación. (Murray et al., 2017)

El otro medio portador estudiado asociado a las CMM ha sido el ácido hialurónico. El estudio de la interacción del ácido hialurónico con las CMM indica que el ácido hialurónico facilita la migración y adherencia de las CMM al defecto condral. (K. B. L. Lee et al., 2007; Matsiko et al., 2012) Además, los hidrogeles de ácido hialurónico han mostrado ser un medio tridimensional efectivo en el cual las CMM pueden proliferar y expresar cambios iniciales asociados con la condrogénesis. (Snyder et al., 2014)

1.4.6 Usos actuales de las células madre en la patología del aparato locomotor

Como demuestra el creciente número de publicaciones al respecto, el uso de las SC está aumentando exponencialmente en el estudio y tratamiento de las patologías del aparato locomotor. Múltiples estudios han probado la terapia con SC en defectos óseos (Dufrane et al., 2015; Quarto et al., 2001), fracturas (Dallari et al., 2007; Gan et al., 2008; Kitoh et al., 2007; Liebergall et al., 2013; Qu et al., 2015), osteonecrosis (Aoyama et al., 2014; Kawate et al., 2006; Mao et al., 2015; Persiani et al., 2015; Zhao et al., 2012), lesiones meniscales (Vangsness et al., 2014), lesiones condrales (de Windt et al., 2017; Nejadnik et al., 2010; Sekiya et al., 2015; Wakitani et al., 2002), artrosis (C. J. Centeno et al., 2008a, 2008b; Davatchi et al., 2016; Orozco et al., 2014; Vangsness et al., 2014; Wong et al., 2013), patología tendinosa (Eliasberg et al., 2017; S. Lee et al., 2015), y discal. (Miguélez-Rivera et al., 2017; Sivakamasundri & Lufkin, 2013)

Vega et al (Vega et al., 2015) desarrollaron un ensayo controlado y aleatorizado con 2 grupos de 15 pacientes en los que se comparó el uso de CMM alogénica con el de ácido hialurónico y tras un año de seguimiento se confirmó la factibilidad y seguridad de la terapia con CMM alogénica, y una mejoría del dolor y la función, así como de la calidad del cartílago en comparación con el grupo control. Complementariamente a lo anterior y en coincidencia con los resultados obtenidos por Jo et al (Jo et al., 2014), Soler et al (Soler et al., 2016) presentaron los resultados de su ensayo clínico en fase I y II en 15 pacientes con artrosis de rodilla, de grados II y III, mediante CMM autólogas inyectadas intraarticularmente y concluyeron que este tratamiento era seguro y bien tolerado, al tiempo que se repetían los resultados obtenidos en el anterior ensayo.

Yubo et al (Yubo et al., 2017) realizaron un metaanálisis de los 11 ensayos clínicos más relevantes sobre el trasplante de CMM en la artrosis de rodilla y concluyen que es una terapia segura y con gran potencial de eficacia. Por su parte, Gao et al revisaron varios ensayos clínicos recientes en humanos que evalúan el uso de CMM para tratar la artrosis, en particular de rodilla (5 de cordón umbilical y 1 de placenta, 8 de médula ósea, y 10 de tejido adiposo / 6 aplicando CMM por cirugía abierta y 18 por inyección intraarticular). Los hallazgos más importantes en estos ensayos de pacientes tratados con CMM son reducción del dolor, mejoría en la función articular y en la calidad de vida, mejoras en las imágenes por resonancia magnética de los defectos estructurales en el cartílago (si bien el cartílago regenerado no muestra el mismo patrón de alineación celular que el cartílago sano). Por otra parte, se considera que todavía es necesario realizar estudios con mayor tamaño de muestra y en múltiples centros para establecer conclusiones más sólidas sobre la seguridad y eficacia del uso de CMM en artrosis. (Gao et al., 2023)

1.5 CÉLULAS MADRE DE CÉRVIX UTERINO

Desde el año 2012 se ha venido trabajando en un nuevo tipo de células madre mesenquimales derivadas del cuello uterino humano (human uterine cervical stem cells – hUCESC), con un gran potencial terapéutico. El secretoma o medio condicionado de las células madre, medio de cultivo en el que dichas células vierten sus secreciones, mantiene las propiedades de éstas sin necesidad de emplearlas en la aplicación clínica. Utilizando el medio condicionado se evita el uso de terapia celular al no tener que aplicar las propias células madre en el tejido a tratar (Costa et al., 2021). Recientes estudios han demostrado las propiedades del secretoma o medio condicionado de las hUCESC en la reducción de la proliferación celular, la modificación del ciclo celular, el aumento de la apoptosis, la capacidad para la regeneración epitelial, el potencial antiinflamatorio mediante la inhibición de metaloproteasas y de factores de crecimiento fibroblástico, así como un efecto bactericida frente a *E coli* y *S epidermidis* (M. Bermudez et al., 2016; Eiró et al., 2014; F. Vizoso et al., 2017).

1.5.1 Origen, definición, localización y caracterización

Las hUCESC son células madres mesenquimales que se hallan situadas en el epitelio de transición del cuello uterino, siendo accesibles durante el periodo de eversión del cuello, también conocido como ectropión cervical, que suele verse bien en la fase ovulatoria de forma cíclica o bien de forma más continuada en las pacientes que emplean anticonceptivos hormonales. En un primer momento se obtuvieron dichas células de pacientes donantes voluntarias en el momento en el que se les realizaba una citología o prueba de Papanicolaou. Con las muestras obtenidas con este método se desarrollaron los primeros estudios sobre la caracterización y valoración de efectos biológicos que estas células producían. Hoy en día, se obtienen de pacientes donantes una vez se haya producido una histerectomía por una patología tumoral no maligna (mioma) y que no presentan patología infecciosa, neoplásica (maligna) ni inmunológica.

Estas células madre mesenquimales son caracterizadas mediante la expresión positiva de los marcadores CD44, CD73, CD90 y CD105, y negativa de los marcadores CD31, CD34, CD45, y CD117 (Eiró et al., 2014).

1.5.2 Función

Las principales funciones de estas células madre de cérvix uterino humano se resumen en:

1. **Efecto antiinflamatorio e inmunomodulador:** Las hUCESC tienen un papel importante en la reducción de la inflamación y la modulación del sistema inmunológico. Su secretoma contiene citocinas y factores que regulan la respuesta inmune, haciéndolas útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como las úlceras corneales, la uveítis, y la enfermedad inflamatoria intestinal. (Sendon-Lago et al., 2021)
2. **Propiedades regenerativas:** Las células madre mesenquimales, incluyendo las hUCESC, tienen capacidades regenerativas notables. Su secretoma contiene factores que promueven la reparación de tejidos y la regeneración celular, lo que las hace útiles en terapias regenerativas para enfermedades crónicas y degenerativas. (F. J. Vizoso et al., 2023)
3. **Propiedades antitumorales:** Se destaca que las hUCESC, a través de su secretoma, pueden inhibir el crecimiento de ciertos tipos de tumores. El medio condicionado de hUCESC muestra un efecto inhibitorio sobre los Fibroblastos Asociados al Cáncer (CAF) y sobre los Macrófagos Asociados al Cáncer. En el caso de los CAF, el secretoma de hUCESC reduce su proliferación e invasión y aumenta la apoptosis. Además, el medio condicionado de hUCESC es capaz de inhibir y revertir la diferenciación de los monocitos a macrófagos, lo cual es importante porque los Macrófagos Asociados al Cáncer suelen promover la progresión tumoral (Eiró et al., 2014).
4. **Capacidad antimicrobiana:** Estas células también tienen la capacidad de combatir infecciones gracias a las propiedades antimicrobianas de su secretoma, que contiene sustancias que pueden inhibir el crecimiento de bacterias y hongos. (Schneider et al., 2018)

5. **Prevención del estrés oxidativo:** Las hUCESC juegan un rol en la protección contra el estrés oxidativo asociado con el daño celular y el envejecimiento. (Fraile et al., 2022)

En resumen, las células hUCESC son prometedoras en terapias regenerativas, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antitumorales y antimicrobianas, lo que sugiere un amplio potencial terapéutico para tratar diversas enfermedades.

1.6 SECRETOMA DE CÉLULAS MADRE DE CÉRVIX UTERINO

1.6.1 Definición de medio condicionado de hUCESC

Definimos el secretoma o medio condicionado de las células madre de cérvix uterino humano (MC-hUCESC) como un medio de cultivo en el que dichas células se nutren y en el que vierten sus secreciones (proteínas como las citocinas, y los factores de crecimiento y las vesículas extracelulares), posteriormente dicho medio de cultivo es recogido sin las células que se mantienen adheridas al recipiente y de esa manera se elimina el componente celular potencialmente inmunogénico, y se mantienen las sustancias generadas por las células y que producen los efectos que deseamos aprovechar.

1.6.2. Efectos del secretoma de hUCESC en los fibroblastos sinoviales

Siendo como es éste el primer estudio sobre el efecto del secretoma de hUCESC en los fibroblastos sinoviales no se tiene hasta este trabajo experiencia en la materia. Nuestro grupo de investigación tiene experiencia en el efecto del secretoma de hUCESC en otros fibroblastos, principalmente en el estudio de fibroblastos tumorales, en los que

produce en éstos un descenso en la proliferación y la invasión, así como un aumento de la apoptosis temprana de los fibroblastos involucrados en la patología tumoral (Eiró et al., 2014).

1.6.3. Efectos del secretoma de hUCESC en los mediadores inflamatorios

Varios trabajos recientes destacan la capacidad del secretoma de hUCESC para reducir la inflamación mediante la modulación de mediadores inflamatorios clave como TNF- α , IL-6 e IFN- γ al secretar estas CMM una variedad de factores paracrinos y solubles que influyen en la regulación de dichas citocinas inflamatorias. Los productos derivados del secretoma de las CMM reproducen sus efectos terapéuticos al promover además la regeneración de tejidos. Se plantea que el uso del secretoma de CMM es una alternativa segura y eficiente a la terapia celular, con beneficios potenciales en la disminución de los efectos adversos relacionados con la inflamación crónica. (Fernández-Francos et al., 2021)

El uso de hidrogeles para administrar localmente estos productos derivados de células madre en modelos de colitis mejora la efectividad terapéutica, produciendo una disminución significativa de los niveles de ARN mensajero (ARNm) de los mediadores proinflamatorios TNF- α , IL-6 e IFN- γ , analizados mediante PCR cuantitativa (qPCR). Estos resultados sugieren que el secretoma de hUCESC actúa modulando las respuestas inflamatorias locales, inhibiendo los mediadores clave implicados en la colitis lo que sugiere un gran potencial en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (Sendon-Lago et al., 2021).

1.7 JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Nuestro grupo de estudio sobre las células madre del cérvix uterino humano (hUCESC) cuenta con una sólida trayectoria en la investigación de los usos terapéuticos del secretoma derivado de estas células. Durante la última década, nuestro equipo ha demostrado el potencial antiinflamatorio y regenerativo del secretoma de hUCESC en diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, aplicados a múltiples patologías, como el síndrome de ojo seco (M. A. Bermudez et al., 2015; Sendon-Lago et al., 2019), la uveítis (M. Bermudez et al., 2016), y las enfermedades inflamatorias intestinales (Eiro et al., 2022; Sendon-Lago et al., 2021). Además, se ha evidenciado su efecto sobre Fibroblastos Asociados al Cáncer (CAF), donde el secretoma de hUCESC ha demostrado reducir la proliferación y la invasión de los CAF, contribuyendo así al control del crecimiento y la diseminación del cáncer (Eiró et al., 2014; Schneider et al., 2016).

El secretoma de hUCESC destaca, entre otros aspectos, por su elevado contenido de TIMP-1 y TIMP-2, inhibidores naturales de las metaloproteasas (Eiro et al., 2024; Sendon-Lago et al., 2019), asociados a la capacidad de prevenir una proteólisis excesiva y mitigar el daño inflamatorio. Asimismo, estudios recientes destacan las ventajas de su aplicación, tanto por su seguridad y reducción del riesgo inmunológico, como por su facilidad de almacenamiento y administración clínica (Costa et al., 2023).

A partir de las conclusiones reflejadas en la literatura científica de los últimos 15 años, que destacan el papel fundamental del tejido sinovial en la fisiopatología de la artrosis (Scanzello & Goldring, 2012), así como la implicación de los mediadores inflamatorios y condrolíticos en el desarrollo y progresión de esta enfermedad (Kapoor et al., 2011), y considerando los estudios que subrayan el potencial del secretoma de células madre para modular la inflamación sinovial en la artrosis (van Buul et al., 2012), nos planteamos el posible efecto terapéutico del secretoma de hUCESC. Teniendo en cuenta las ventajas prácticas y el amplio potencial terapéutico del secretoma de hUCESC, nos propusimos estudiar su impacto en una patología tan prevalente como la artrosis, caracterizada por procesos de inflamación y destrucción de tejido.

Al diseñar el estudio, consideramos las propiedades destacadas del secretoma de hUCESC descritos hasta la fecha del inicio del mismo, entre las cuales sobresalían el efecto antiinflamatorio y el efecto inhibidor sobre la proliferación e invasión de los fibroblastos. El 80% de los sinoviocitos en el tejido sinovial articular son fibroblastos sinoviales, y desempeñan un papel clave en la homeostasis articular, así como en la fisiopatología de la artrosis. Dado que el tejido sinovial es de fácil acceso quirúrgico y su obtención implica una baja morbilidad para el paciente, decidimos centrar nuestra investigación en los fibroblastos del tejido sinovial de la rodilla.

2

Hipótesis y Objetivos

2.1 HIPÓTESIS

El secretoma de células madre de cérvix uterino humano (hUCESC) puede jugar un papel preventivo y terapéutico en la artrosis de rodilla al actuar sobre los fibroblastos sinoviales y los mediadores de la inflamación y de la degradación celular implicados en la fisiopatología de la artrosis.

2.2 OBJETIVOS

1. Comparar los niveles basales de marcadores inflamatorios y condrolíticos (IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13) en fibroblastos sinoviales de rodilla entre pacientes sanos y con artrosis.
2. Analizar y comparar los niveles de marcadores inflamatorios y condrolíticos (IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13) en fibroblastos sinoviales de pacientes sanos y con artrosis, antes y después de la estimulación con IL-1 β .
3. Determinar el efecto del secretoma de hUCESC sobre la expresión de marcadores inflamatorios y condrolíticos (IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13) en fibroblastos sinoviales estimulados de pacientes sanos y con artrosis.
4. Evaluar el impacto del secretoma de hUCESC sobre la proliferación de fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β en pacientes sanos y con artrosis.
5. Examinar el efecto del secretoma de hUCESC en la capacidad invasiva de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β en pacientes sanos y con artrosis.

6. Investigar el efecto de los inhibidores de metaloproteasas TIMP-1 y TIMP-2 sobre la capacidad de invasión de los fibroblastos sinoviales en pacientes sanos y con artrosis.

3

Material y Métodos

3.1 MATERIAL Y MÉTODOS GENERAL

Realizamos un estudio experimental con fibroblastos sinoviales de rodilla obtenidos a partir de muestras quirúrgicas de pacientes que se sometieron a diferentes procedimientos quirúrgicos de patología en cirugía ortopédica. Se clasificaron los fibroblastos a partir del estado articular en el momento de la cirugía en dos grupos: sinovial normal (sin afectación osteoartítica), y sinovial en osteoartritis.

3.1.1 Toma de muestras sinoviales

Los fibroblastos sinoviales del primer grupo (Sinovial Normal) fueron obtenidos de pacientes intervenidos mediante artroscopia de rodilla por patología meniscal traumática en la que no se observaba afectación osteoartítica, con ausencia de sinovitis en fondo de saco suprapatelar y sin afectación condral a la exploración visual.

Los fibroblastos sinoviales del segundo grupo (Sinovial Artrósica) fueron obtenidos de:

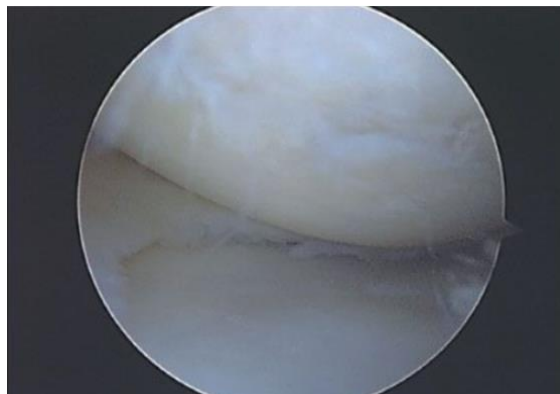
1. Pacientes intervenidos mediante artroscopia de rodilla por dolor secundario a lesión meniscal y que presentaban signos de afectación condral moderada/severa (clasificación Outerbridge III/IV) y que asociaban una sinovitis objetivable en fondo de saco suprapatelar.
2. Pacientes intervenidos mediante artroscopia de rodilla por dolor secundario a lesión condral moderada/severa (clasificación Outerbridge III/IV) que asociaban una sinovitis objetivable en fondo de saco suprapatelar.
3. Pacientes intervenidos mediante cirugía abierta por artrosis avanzada (clasificación Outerbridge IV) en la que se implantó una prótesis total de rodilla, todos ellos asociando una clínica de sinovitis. (Figura 4)

Para la toma de las muestras de los pacientes tratados mediante artroscopia se empleó un sistema de filtrado del aspirado con motor de artroscopia colocado en el terminal de aspiración (Figuras 5 y 6) y se aspiraron al menos 3 áreas de la sinovial del

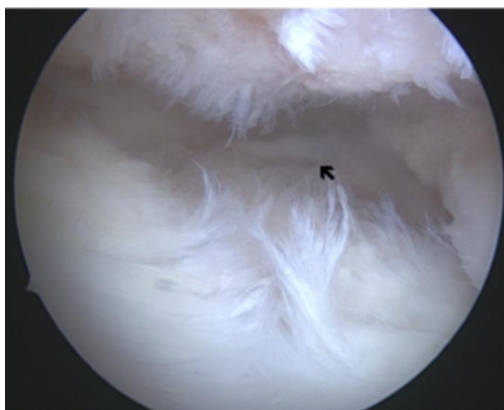
fondo de saco suprapatelar de la rodilla hasta obtener una muestra que llenara el filtro empleado. Una vez obtenida la muestra se realizó una hemostasia de la zona aspirada con vaporizador eléctrico artroscópico para evitar sangrado postoperatorio.



A.



B.



C.



D.

Figura 4. Clasificación de Outerbridge. a) Grado I: Reblandecimiento y edema del cartílago, sin fisuras. b) Grado II. Fisura o fragmentación en un área menor de 1,3 cm de superficie o menos del 50% de profundidad. c) Grado III: Fisura o fragmentación en un área mayor de 1,3 cm de superficie o mayor del 50% de profundidad. d) Grado IV: Exposición del hueso subcondral (desaparición focal del cartílago). (Kohl et al., 2015; Slattery & Kweon, 2018)

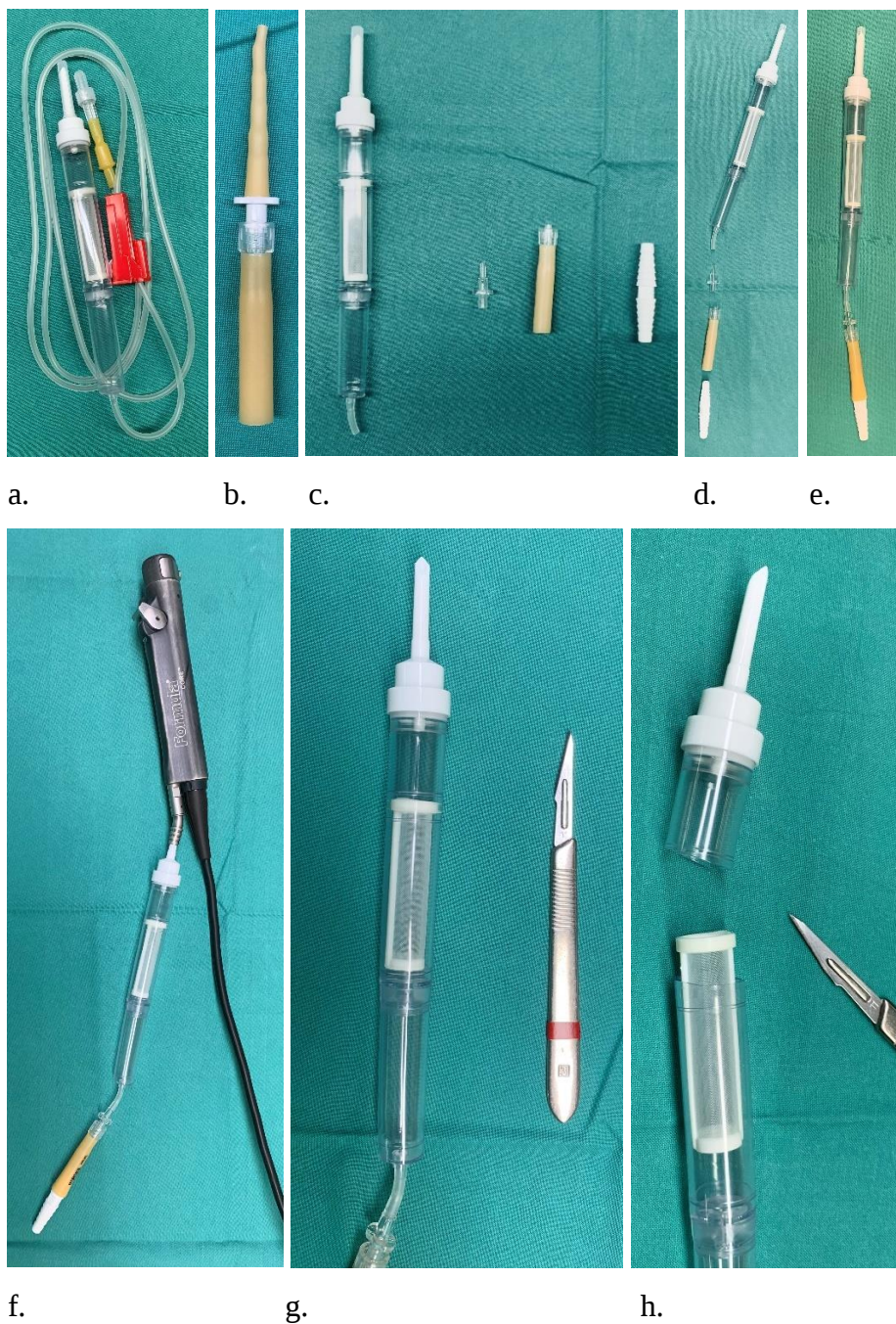
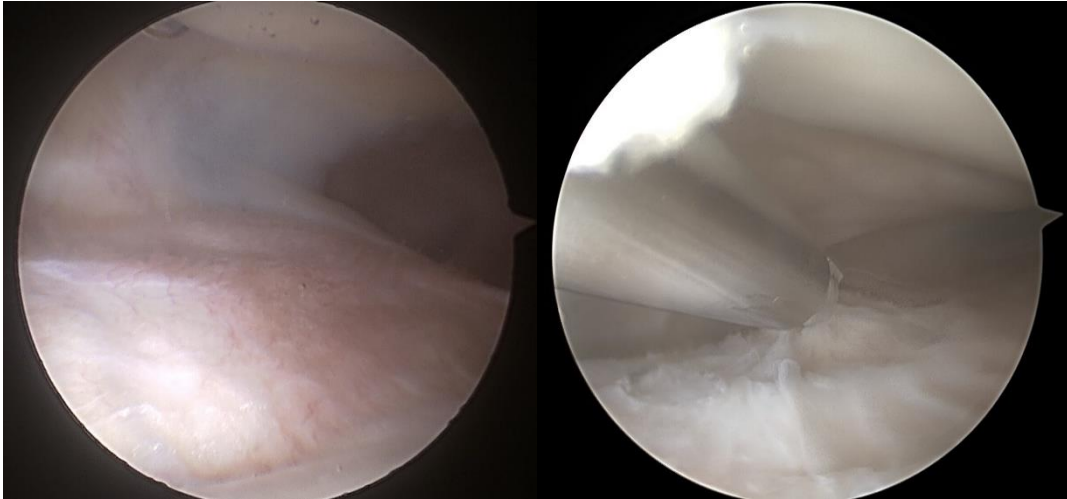


Figura 5. Material para la toma de muestra artroscópica. a) Equipo de transfusión hemática con filtro. b) Cánula de conexión doble para equipos urológicos. c, d y e) Componentes a (una vez se desecha la parte distal al filtro) y b junto con dos conexiones intermedias para vía parenteral y cánulas de aspiración. f) Conexión a motor artroscópico. g y h) una vez acabado se extrae el filtro con un bisturí.

A.



B.

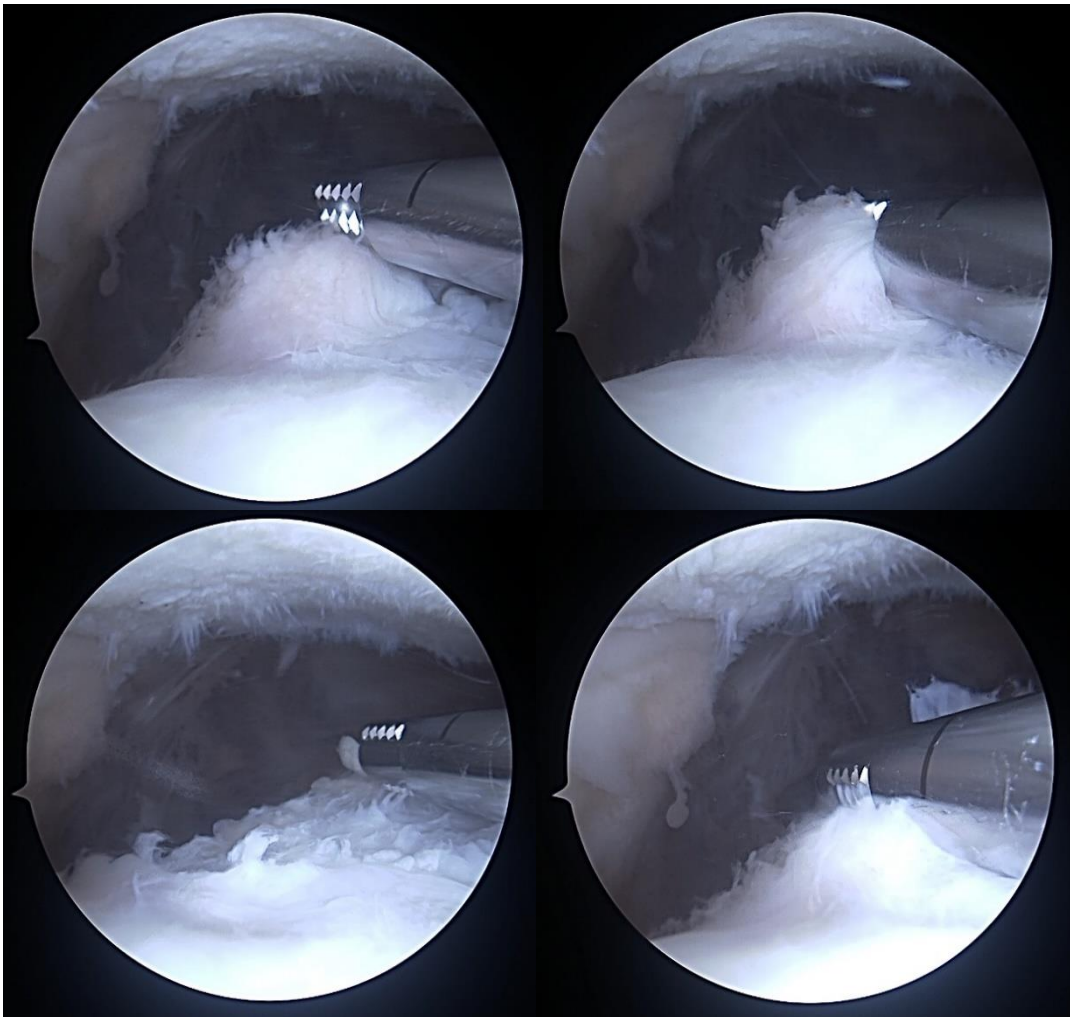


Figura 6. Toma de muestra artroscópica. Motor de sinoviotomo aspirando muestra de sinovial en fondo de saco suprapatelar. A) Sinovial Normal. B) Sinovial Artrósica.

La muestra alojada en el filtro se extrajo intraoperatoriamente dentro de su filtro y se alojó en un tubo con medio de cultivo (DMEM-F12 suplementado con antibiótico) evitando la desecación de la muestra y su exposición prolongada al aire, para posteriormente ser recogido y procesado en nuestro laboratorio.

Las muestras de los pacientes intervenidos de cirugía protésica de rodilla se tomaron del siguiente modo: una vez realizada la incisión cutánea de la vía quirúrgica y tras la apertura articular por un acceso parapatelar medial se procedió a voltear y lateralizar la rótula quedando expuesta la región intracapsular. Llegados a este punto, y antes de comenzar a realizar los cortes óseos, se procedió a un lavado articular con suero fisiológico y se tomó una muestra de la sinovial sinovítica suprapatelar procurando minimizar la toma de grasa subsinovial, con un área de muestra sinovial nunca inferior a los 2 centímetros cuadrados (Figura 7). De forma intraoperatoria, se introdujo la muestra en un tubo con medio de cultivo (DMEM-F12 suplementado con antibiótico), procurando que la muestra quedara embebida en el medio y sin exposición al aire, para posteriormente ser recogido y procesado en nuestro laboratorio.

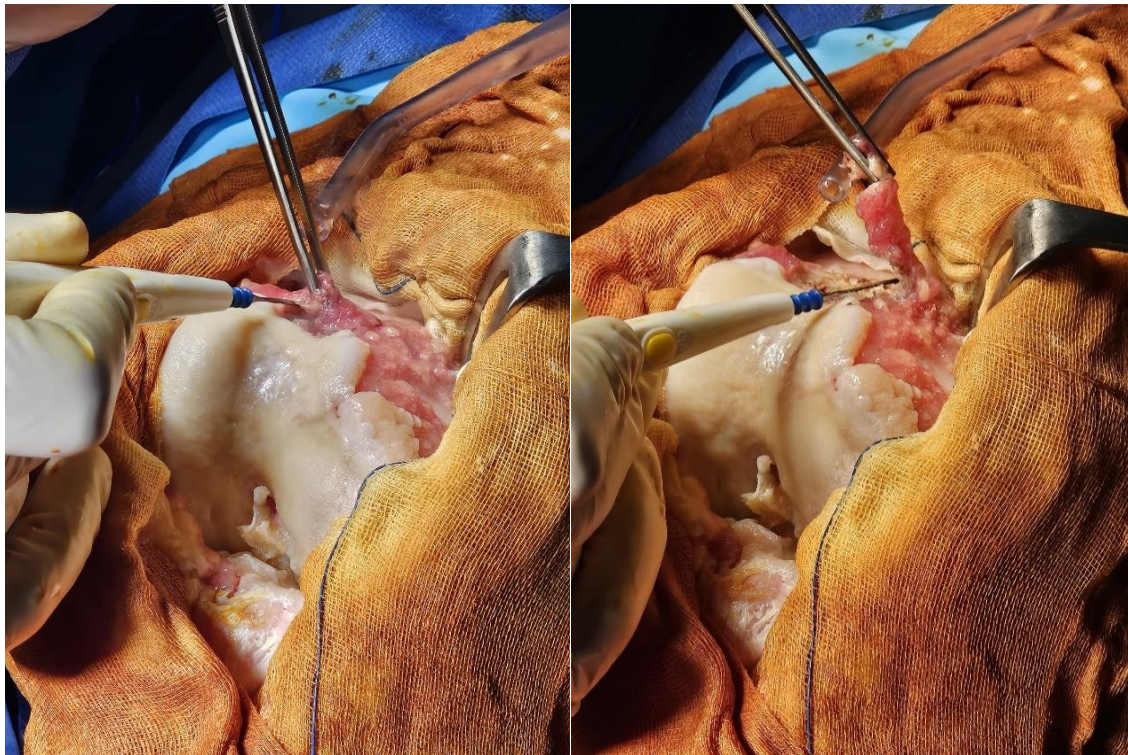


Figura 7. Toma muestra de tejido sinovial de región femoral suprapatelar en cirugía abierta protésica

Todos los pacientes que participaron en la toma de muestras fueron intervenidos en los quirófanos de la Fundación Hospital de Jove de Gijón (Asturias) coincidiendo la toma de la muestra con el momento en el que se intervenían de forma programada por patología de rodilla. Se excluyeron los pacientes menores de edad (menores de 18 años en el momento de la intervención), y aquellos que en el caso de presentar una patología articular ésta difiriera de ser una osteoartritis. Todos ellos fueron informados previamente a la cirugía del procedimiento a realizar para la toma de las muestras, del objeto del estudio y de las implicaciones que ello comportaba. Todos recibieron y firmaron un documento de consentimiento informado específico con motivo del estudio a realizar (ver documento en Anexo 1)

Todas las muestras fueron sumergidas en medio de cultivo (DMEM-F12 suplementado con antibiótico) en tubos estériles. Una vez fuera del quirófano se depositaban en el frigorífico del quirófano a una temperatura entre 2 y 4°C, y eran recogidas por nuestro personal de la Unidad de Investigación del Hospital de Jove para su procesamiento antes de las primeras 24 horas.

3.1.2 Procesamiento de las muestras

Se recogieron un total de 107 muestras de cirugía de rodilla. Se desecharon 6 casos que correspondieron a patologías que diferían de los criterios de inclusión iniciales (4 recambios de prótesis, 1 artropatía psoriásica y 1 condrocalcinosis). De los 101 casos restantes, 28 pacientes correspondieron a los criterios del grupo 1 (sinovial normal), y 73 al grupo 2 (artrosis) de los cuales 16 fueron obtenidas mediante artroscopia y 57 mediante cirugía abierta.

Una vez llegadas las muestras a la Unidad de Investigación del Hospital de Jove éstas fueron procesadas para la identificación y cultivo de los fibroblastos sinoviales a partir del material obtenido en el quirófano.

El tejido sinovial de las muestras se disgregó mecánica y enzimáticamente y fue cultivado hasta la obtención de un cultivo de fibroblastos. Las muestras fueron

disgregadas mecánicamente hasta conseguir explantes de 1 cm² aproximadamente, y posteriormente colocadas en placas de cultivo celular de 100 mm (muestras de cirugía abierta) o placas de seis pocillos (muestras de artroscopia), con medio de cultivo DMEM F-12 con 10% FBS y 1% penicilina-estreptomicina.

Posteriormente, se llevó a cabo la disgregación enzimática mediante la adición de Colagenasa A (Roche, ref. 10103586001) a una concentración final de 1 mg/ml. La incubación fue realizada durante 48 horas a 37°C en el incubador. Tras la digestión, las muestras fueron centrifugadas a 400 g durante 5 minutos y, posteriormente, sembradas en la misma placa donde se realizó la disgregación con el medio de cultivo (DMEM F-12 con 10% FBS y 1% penicilina-estreptomicina).

Los primeros días tras la disgregación de la muestra, se observaba en el cultivo una mezcla de células con morfología más redondeada, junto con otras de morfología fibroblastoide más alargadas. A medida que se continuaba con el cultivo de las muestras, predominaban las células con morfología alargada y con aspecto de fibroblastos, lo que posteriormente sería confirmado.

3.1.3 Caracterización de los fibroblastos sinoviales

La comprobación de la pureza de los cultivos de fibroblastos (ausencia de células epiteliales) se realizó mediante tinción inmunocitoquímica. Las células fueron teñidas con desmina, α -actina y vimentina (Tabla 1), siendo éstos positivos para los dos últimos factores (Figura 8). La tinción positiva de vimentina nos confirma el origen mesenquimal de las células, característico de los fibroblastos. La tinción positiva de α -actina en un alto porcentaje de los fibroblastos implica que muchos de los mismos habrían adquirido un fenotipo de miofibroblastos (fibroblastos activos). Éstos representan una subpoblación de fibroblastos con un fenotipo similar al de las células del músculo liso, debido a que expresan α -actina del músculo liso en su citoesqueleto y desempeñan una participación muy importante durante la embriogénesis, organogénesis, inflamación, reparación y cicatrización. Además, este tipo celular resulta fundamental en los diferentes procesos de regeneración y reparación (fibrosis) que ocurren en los distintos órganos. (Talbot et al., 2022; H. Wang et al., 2024; Yu et al., 2022). Los fibroblastos no son células musculares,

y la tinción negativa a desmina nos asegura que las células no pertenecen a un linaje muscular.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario	Recuperación antigénica	Dilución del Ac	Tiempo incubación	Casa comercial (referencia)
Vimentina	pH6	1:100	30´	Dako (M7020)
α -actina	pH9	Listo para uso	30´	Dako (IS611)
Desmina	pH6	Listo para uso	30´	Dako (IS606)

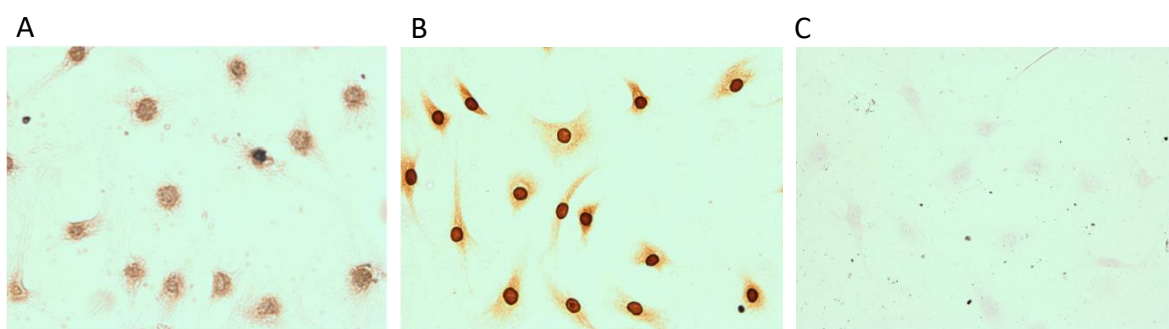


Figura 8. Ejemplos de tinción inmunohistoquímica de cultivos de fibroblastos de muestras de sinovial (200 X). A. Tinción positiva para α -actina. B. Tinción positiva para vimentina. C. Tinción negativa para desmina.

Los resultados de inmunocitoquímica confirman que la obtención de los cultivos primarios de fibroblastos llevada a cabo mediante el cultivo de las muestras fue adecuada.

De las 101 muestras procesadas (28 Sinovial Normal / 73 Sinovial Artrósica), se descartaron las muestras contaminadas durante el proceso de obtención, aislamiento o cultivo y las muestras que presentaban una tasa de proliferación muy lenta (alcanzar la confluencia 70% en un tiempo mayor de 10 días) o que presentaban una morfología agrandada, aplanada y vacuolada, y una disminución de la proliferación celular, característica de la senescencia celular (proceso celular que implica la detención permanente del ciclo celular).

3.1.3.1 Cálculo del tamaño muestral

Se realizó el cálculo del tamaño muestral, empleando GRANMO, aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un poder estadístico superior a 0,8, en un contraste bilateral y una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%. El análisis indicó que se necesitan al menos 4 muestras en el grupo 1 (Sinovial Normal) y 8 muestras en el grupo 2 (Sinovial Artrósica) para detectar una diferencia en el parámetro estudiado de al menos 2 unidades. Este número de muestras es consistente con los trabajos experimentales in vitro publicados en la literatura reciente. (Giannasi et al., 2020; Palamà et al., 2020; Rosochowicz et al., 2024)

3.1.4 Producción del secretoma de hUCESC

3.1.4.1 Aislamiento y caracterización de las hUCESC

Las hUCESC se obtienen a partir de una muestra de tejido de cuello uterino. Tras la obtención de la muestra se realiza una digestión enzimática de la misma y se centrifuga 5 min a 400 g, el pellet celular es entonces sembrado y cultivado en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS 1% de penicilina y estreptomicina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hidrocortisona e insulina.

Una vez realizado el aislamiento de las células, se procede a la caracterización mediante citometría de flujo. Para ello, se resuspenden 100.000 células en un volumen de 100 µl de PBS al cual se añade el volumen correspondiente de anticuerpo y se incuba. Posteriormente, las células son lavadas con 300µl de PBS, centrifugadas a 400g durante 5min. Finalmente, se resuspende el botón celular en 300µl de PBS y se analiza en el citómetro de flujo Cytomics FC500 de BeckmanCoulter.

Las células son caracterizadas por citometría de flujo para comprobar la expresión de los marcadores CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 y CD117 (Tabla 2).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la caracterización de las hUCESC mediante citometría de flujo.

Anticuerpo	Casa Comercial	Referencia	Volumen (μL)	Tiempo Incubación (min)	Temperatura (°C)
CD31	BD Biosciencias	555446	10	30	4
CD34	BD Biosciencias	555822	10	30	4
CD44	BD Biosciencias	555479	10	30	4
CD45	BD Biosciencias	555482	10	30	4
CD73	BD Biosciencias	550257	10	30	4
CD90	MACS MiltenyiBiotec	130-114-859	4	30	hielo
CD105	MACS MiltenyiBiotec	130-112-169	4	30	hielo
CD117	BD Biosciencias	332785	10	30	RT

3.1.4.2 Obtención del secretoma/medio condicionado de las hUCESC

El secretoma de las hUCESC se obtiene a partir de un cultivo con un 70% de confluencia. Una vez que la confluencia es del 70% en el fondo de la botella de cultivo, se retira por aspiración el medio de cultivo completo y se realizan 3 lavados con PBS (se debe retirar perfectamente todos los restos de suero fetal bovino, antibióticos y factores de crecimiento sin dañar a las células). Se añade medio DMEM-F12 sin FBS durante 48 horas en el incubador a 37°C. Durante ese tiempo las hUCESC adheridas al fondo de la botella, se multiplican y se relacionan con el medio extracelular secretando sustancias. Transcurridos esos dos días, el medio es recogido y centrifugado 5 minutos a 400 g. El sobrenadante (medio condicionado) es recogido (constituido por el DMEM-F12, cuya composición conocemos, más las sustancias que en él han liberado las hUCESC) y es utilizado inmediatamente o conservado en el congelador a - 80°C.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 1

Para comparar los niveles basales de marcadores inflamatorios y condrolíticos en fibroblastos sinoviales de pacientes sanos y con artrosis, se cuantificó la expresión génica de estos marcadores mediante RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR). Este análisis consiste en extraer el ARN mensajero de las células, convertirlo en ADNc mediante transcripción reversa y, finalmente, realizar una PCR en tiempo real. La técnica mide la expresión de estos factores a través de la fluorescencia generada durante la amplificación, lo que permite cuantificar sus niveles de expresión.

3.2.1 Procesamiento inicial

Se analizó la expresión génica de factores relacionados con la inflamación (IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4) y con la destrucción del cartílago (MMP-3, MMP-13).

Siguiendo el cálculo muestral previamente realizado, se tomaron 6 muestras del grupo de sinovial normal y 12 muestras del grupo de sinovial artrósica. Se sembraron 500.000 células por muestra en placas de cultivo de 100mm (p100). Transcurridas 48h se cultivaron en un medio DMEM-F12 sin FBS. Transcurridas otras 48h se recogieron las células para la extracción de ARN.

3.2.2 Extracción del ARN

Después de retirar el medio de la placa de cultivo, se procedió a la separación de las células mediante tripsinización. Una vez recolectadas, las células fueron centrifugadas a 1400 rpm durante 5 minutos. Todo el proceso subsiguiente se llevó a cabo utilizando el "Rneasy Mini Kit" (Qiagen, ref. 50974104), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se resuspendieron en 350 μ l de tampón RLT y se continuó con el protocolo del producto de la siguiente manera: a) se agregó etanol al 70% en un volumen 1:1 a las

células sumergidas en el tampón RLT; b) la mezcla se pasó a través de una columna mediante centrifugación a 8000 g durante 15 segundos; c) se añadieron 700 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; d) se añadieron 350 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; e) se incubó con 10 µl de DNasa y 70 µl de tampón RDD durante 30-45 minutos a temperatura ambiente; f) se añadieron 350 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; g) se añadieron 500 µl de tampón RPE y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; h) el ARN se eluyó añadiendo 20 µl de agua libre de ARNasa a la columna y centrifugando durante 1 minuto a 8000 g.

La concentración y calidad del ARN extraído se determinaron mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies, Wilmington, US) (Figura 9). Se utilizó la relación de absorbancias 260/280 nm como indicador de calidad. Por último, las muestras de ARN se almacenaron a -80°C hasta su uso.

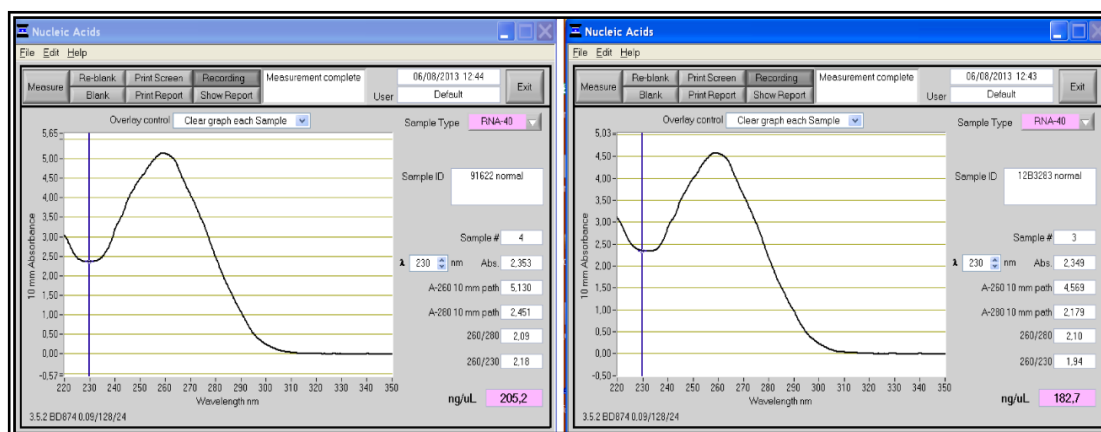


Figura 9. Captura de imagen del espectrofotómetro NanoDrop® para analizar la calidad del ARN extraído

3.2.3 Síntesis del ADNc

La transcripción reversa es un proceso en el que se sintetiza ADN complementario (ADNc) a partir de ARN monocatenario utilizando la enzima transcriptasa reversa.

Para llevar a cabo esta reacción, se utilizó el kit comercial "Transcriptor First Strand ADNc Síntesis Kit" (Roche, ref. 4896866001), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se preparó una mezcla que contenía 10 µl de ARN (20 ng/µl), 1 µl de oligo dT (100 mM) y 2 µl de hexámeros aleatorios (600 pmol/µl). La reacción se sometió a una desnaturalización a 65°C durante 10 minutos en un termociclador convencional y luego se colocó inmediatamente en hielo para evitar la renaturalización.

Llegados a este punto se añadieron 4 µl de tampón de reacción (5X), 0,5 µl de inhibidor de nucleasas de ARN (40 U/µl), 2 µl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (10 mM) y 0,5 µl de enzima transcriptasa reversa (20 U/µl).

La mezcla se incubó en un termociclador (NYX Technic ATC 40l) bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C, 5 minutos a 85°C y finalmente a 4°C hasta su uso.

3.2.4 PCR a tiempo real

Se empleó el sistema RealTime ready Custom Single Assays (Roche, 05532957001), que contiene los cebadores o primers específicos para cada gen unidos a la sonda, que produce luminiscencia cuando se desprende en la elongación durante la replicación del gen; y el kit LightCycler® 480 Probes Master (Roche, 4887301001). Los genes analizados se especifican en la Tabla 3, como gen de referencia se ha utilizado el gen GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Tabla 3. Referencias de los genes utilizados para el estudio.

Gen	Referencia (Assay ID)
IL-1 β	100950
IL-6	144013
IL-15	113161
IL-17A	136839
TNF- α	147880
TLR-4	135752
MMP-3	148638
MMP-13	140652
GAPDH	102052

Se empleó un termociclador LigthCycler 480 (Roche) para realizar las reacciones (Figura 10). Cada reacción se preparó con una mezcla de 20 μ l utilizando ADNc a una concentración final de 2 ng/ μ L. Posteriormente, el termociclador se programó de la siguiente manera:

1. Preincubación: 10 minutos a 95°C.
2. Amplificación durante 45 ciclos, cada uno con las siguientes etapas:
 - a. Desnaturalización: 10 segundos a 95°C.
 - b. Anillamiento: 30 segundos a 60°C.
 - c. Extensión: 1 segundo a 72°C.
3. Enfriamiento: 30 segundos a 40°

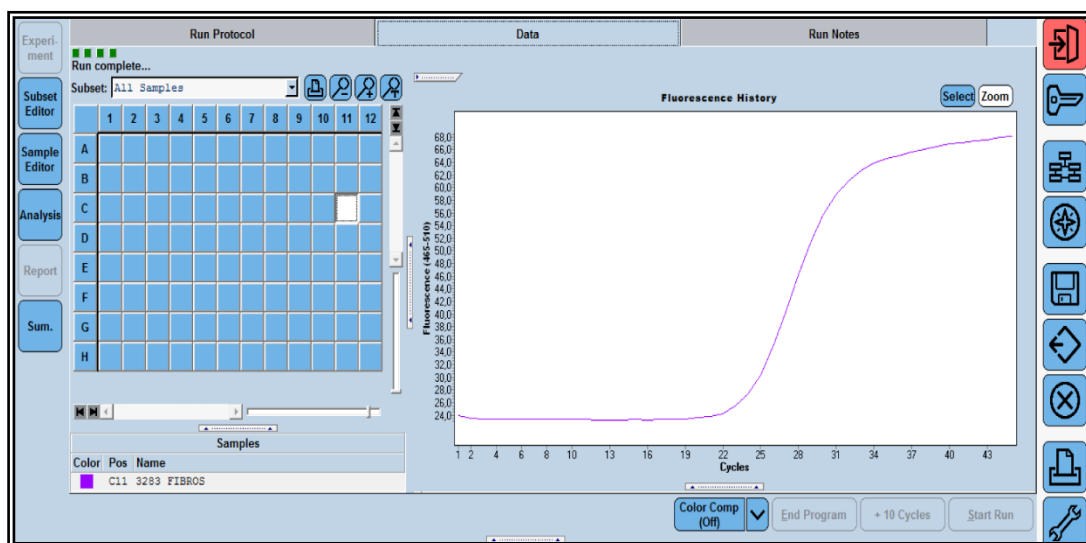


Figura 10. Captura de imagen del termociclador LigthCycler 480 (Roche) para analizar los resultados obtenidos por PCR semicuantitativa.

Para cuantificar la expresión génica, se optó por el método de cuantificación relativa avanzada. En este método, el punto de corte o crossing point (Cp) se calcula automáticamente utilizando el software LightCycler. Este punto corresponde al ciclo en el que la fluorescencia generada supera el umbral predefinido, y se determina como el primer máximo de la segunda derivada de la curva.

3.2.5 Análisis estadístico

Para analizar los datos recopilados, se utilizó el software PASW® Statistics 18. En primer lugar, se evaluó si las poblaciones seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se consideró que en este análisis las muestras a comparar no eran relacionadas. Para comparar los datos entre los grupos que mostraban una distribución normal, se empleó una prueba de t de Student para igualdad de medias (paramétrica). Para comparar los datos entre los grupos en los que al menos uno de ellos no mostraba una distribución normal se empleó una prueba de U de Mann-Whitney (no paramétrica). Se consideró en ambos casos diferencias estadísticamente significativas cuando el valor p era igual o menor a 0,05.

3.3 MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 2

Para analizar los niveles de marcadores inflamatorios y condrolíticos en fibroblastos sinoviales de pacientes sanos y con artrosis una vez estimulados con IL-1 β para reproducir un estado inflamatorio, se cuantificó la expresión génica de estos marcadores mediante RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR), siguiendo el procedimiento explicado anteriormente (Objetivo 1).

Así mismo, los niveles de expresión de los marcadores en los fibroblastos estimulados se compararon con los valores obtenidos en estado basal (estos últimos analizados en el Objetivo 1).

3.3.1 Procesamiento inicial

Se analizó la expresión génica de factores relacionados con la inflamación (IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4) y con la destrucción del cartílago (MMP-3, MMP-13).

Siguiendo el cálculo muestral previamente realizado, se tomaron 6 muestras del grupo de sinovial normal y 12 muestras del grupo de sinovial artrósica. Se sembraron 500.000 células por muestra en placas de cultivo de 100mm (p100). Transcurridas 48h, se trataron de acuerdo a las siguientes condiciones:

- Sin estimulación: medio DMEM-F12 sin FBS ¹
- Tras estimulación: medio DMEM-F12 sin FBS + IL1 β (10 μ g/ml)

(Nota: 1. Este grupo “Sin estimulación” es el correspondiente al Objetivo 1)

Transcurridas otras 48h se recogieron las células para la extracción de ARN.

3.3.2 Extracción del ARN

Después de retirar el medio de la placa de cultivo, se procedió a la separación de las células mediante tripsinización. Una vez recolectadas, las células fueron centrifugadas a 1400 rpm durante 5 minutos. Todo el proceso subsiguiente se llevó a cabo utilizando el "Rneasy Mini Kit" (Qiagen, ref. 50974104), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se resuspendieron en 350 µl de tampón RLT y se continuó con el protocolo del producto de la siguiente manera: a) se agregó etanol al 70% en un volumen 1:1 a las células sumergidas en el tampón RLT; b) la mezcla se pasó a través de una columna mediante centrifugación a 8000 g durante 15 segundos; c) se añadieron 700 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; d) se añadieron 350 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; e) se incubó con 10 µl de DNasa y 70 µl de tampón RDD durante 30-45 minutos a temperatura ambiente; f) se añadieron 350 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; g) se añadieron 500 µl de tampón RPE y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; h) el ARN se eluyó añadiendo 20 µl de agua libre de ARNasa a la columna y centrifugando durante 1 minuto a 8000 g.

La concentración y calidad del ARN extraído se determinaron mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies, Wilmington, US) (Figura 9). Se utilizó la relación de absorbancias 260/280 nm como indicador de calidad. Por último, las muestras de ARN se almacenaron a -80°C hasta su uso.

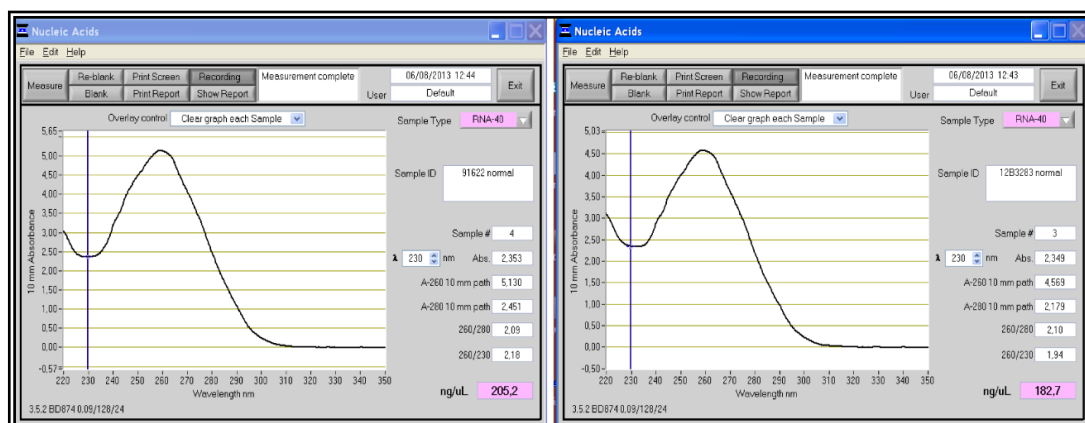


Figura 9. Captura de imagen del espectrofotómetro NanoDrop® para analizar la calidad del ARN extraído

3.3.3 Síntesis del ADNc

La transcripción reversa es un proceso en el que se sintetiza ADN complementario (ADNc) a partir de ARN monocatenario utilizando la enzima transcriptasa reversa.

Para llevar a cabo esta reacción, se utilizó el kit comercial "Transcriptor First Strand ADNc Síntesis Kit" (Roche, ref. 4896866001), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se preparó una mezcla que contenía 10 μL de ARN (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1 μL de oligo dT (100 mM) y 2 μL de hexámeros aleatorios (600 pmol/ μL). La reacción se sometió a una desnaturalización a 65°C durante 10 minutos en un termociclador convencional y luego se colocó inmediatamente en hielo para evitar la renaturalización.

Llegados a este punto se añadieron 4 μL de tampón de reacción (5X), 0,5 μL de inhibidor de nucleasas de ARN (40 U/ μL), 2 μL de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (10 mM) y 0,5 μL de enzima transcriptasa reversa (20 U/ μL).

La mezcla se incubó en un termociclador (NYX Technic ATC 40l) bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C, 5 minutos a 85°C y finalmente a 4°C hasta su uso.

3.2.4 PCR a tiempo real

Se empleó el sistema RealTime ready Custom Single Assays (Roche, 05532957001), que contiene los cebadores o primers específicos para cada gen unidos a la sonda, que produce luminiscencia cuando se desprende en la elongación durante la replicación del gen; y el kit LightCycler® 480 Probes Master (Roche, 4887301001). Los genes analizados se especifican en la Tabla 3, como gen de referencia se ha utilizado el gen GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Tabla 3. Referencias de los genes utilizados para el estudio.

Gen	Referencia (Assay ID)
IL-1 β	100950
IL-6	144013
IL-15	113161
IL-17A	136839
TNF- α	147880
TLR-4	135752
MMP-3	148638
MMP-13	140652
GAPDH	102052

Se empleó un termociclador LightCycler 480 (Roche) para realizar las reacciones (Figura 10). Cada reacción se preparó con una mezcla de 20 μ l utilizando ADNc a una concentración final de 2 ng/ μ L. Posteriormente, el termociclador se programó de la siguiente manera:

Preincubación: 10 minutos a 95°C.

1. Amplificación durante 45 ciclos, cada uno con las siguientes etapas:

- d. Desnaturalización: 10 segundos a 95°C.
- e. Anillamiento: 30 segundos a 60°C.
- f. Extensión: 1 segundo a 72°C.

2. Enfriamiento: 30 segundos a 40°

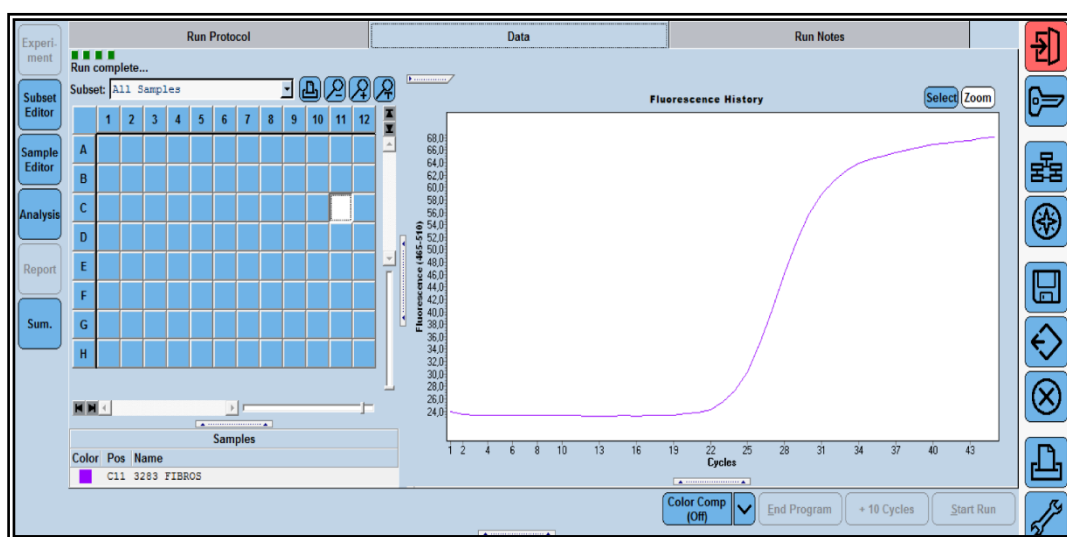


Figura 10. Captura de imagen del termociclador LigthCycler 480 (Roche) para analizar los resultados obtenidos por PCR semicuantitativa.

Para cuantificar la expresión génica, se optó por el método de cuantificación relativa avanzada. En este método, el punto de corte o crossing point (Cp) se calcula automáticamente utilizando el software LightCycler. Este punto corresponde al ciclo en el que la fluorescencia generada supera el umbral predefinido, y se determina como el primer máximo de la segunda derivada de la curva.

3.3.5 Análisis estadístico

Para analizar los datos recopilados, se utilizó el software PASW® Statistics 18. En primer lugar, se evaluó si las poblaciones seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

En este análisis, al comparar los valores de los mismos fibroblastos antes y después de la estimulación, se consideraron relacionadas las muestras. Para analizar estos datos:

a) En los grupos con distribución normal, se aplicó la prueba t de Student para muestras emparejadas (prueba paramétrica).

b) En los casos donde al menos uno de los grupos no presentó una distribución normal, se utilizó la prueba de signo de Wilcoxon para muestras relacionadas (prueba no paramétrica).

De nuevo, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor p fue igual o menor a 0,05.

Por otro lado, se consideraron no relacionadas las muestras de fibroblastos estimulados de pacientes sanos y de pacientes con artrosis. Para comparar los niveles de los marcadores entre estos dos grupos:

a) Cuando los datos mostraron una distribución normal, se utilizó la prueba t de Student para igualdad de medias (prueba paramétrica) tras aplicar un test de Levene para valorar la igualdad de varianzas.

b) Cuando al menos uno de los grupos no presentaba una distribución normal, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney (prueba no paramétrica).

En ambos casos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor p fue igual o menor a 0,05.

3.4 MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 3

Para determinar el efecto del secretoma de hUCESC sobre la expresión de marcadores inflamatorios y condrolíticos en fibroblastos sinoviales de pacientes sanos y con artrosis una vez estimulados con IL-1 β para reproducir un estado inflamatorio, se cuantificó el material genético de estos marcadores mediante RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR) tras ser expuestos los fibroblastos al secretoma de hUCESC, siguiendo el procedimiento explicado anteriormente (Objetivo 1).

Una vez analizados, los niveles de los marcadores en los fibroblastos tras ser expuestos al secretoma de hUCESC se compararon con los valores obtenidos en los fibroblastos estimulados antes de ser expuestos al secretoma (estos últimos analizados en el Objetivo 2).

3.4.1 Procesamiento inicial

Se analizó la expresión génica de factores relacionados con la inflamación (IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4) y con la destrucción del cartílago (MMP3, MMP13).

Siguiendo el cálculo muestral previamente realizado, se tomaron 6 muestras del grupo de sinovial normal y 12 muestras del grupo de sinovial artrósica. Se sembraron 500.000 células por muestra en placas de cultivo de 100mm (p100). Transcurridas 48h, se trataron de acuerdo a las siguientes condiciones:

- Estimulación: medio DMEM-F12 sin FBS + IL1 β (10 μ g/ml)¹
- Tratamiento con secretoma de hUCESC: MC-hUCESC + IL1 β (10 μ g/ml)

(Nota: 1. Este grupo Estimulación es el correspondiente al Objetivo 2)

Transcurridas otras 48h se recogieron las células para la extracción de ARN.

3.4.2 Extracción del ARN

Después de retirar el medio de la placa de cultivo, se procedió a la separación de las células mediante tripsinización. Una vez recolectadas, las células fueron centrifugadas a 1400 rpm durante 5 minutos. Todo el proceso subsiguiente se llevó a cabo utilizando el "Rneasy Mini Kit" (Qiagen, ref. 50974104), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se resuspendieron en 350 µl de tampón RLT y se continuó con el protocolo del producto de la siguiente manera: a) se agregó etanol al 70% en un volumen 1:1 a las células sumergidas en el tampón RLT; b) la mezcla se pasó a través de una columna mediante centrifugación a 8000 g durante 15 segundos; c) se añadieron 700 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; d) se añadieron 350 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; e) se incubó con 10 µl de DNasa y 70 µl de tampón RDD durante 30-45 minutos a temperatura ambiente; f) se añadieron 350 µl de tampón de lavado y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; g) se añadieron 500 µl de tampón RPE y se centrifugó durante 15 segundos a 8000 g; h) el ARN se eluyó añadiendo 20 µl de agua libre de ARNasa a la columna y centrifugando durante 1 minuto a 8000 g.

La concentración y calidad del ARN extraído se determinaron mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® (NanoDrop Technologies, Wilmington, US) (Figura 9). Se utilizó la relación de absorbancias 260/280 nm como indicador de calidad. Por último, las muestras de ARN se almacenaron a -80°C hasta su uso.

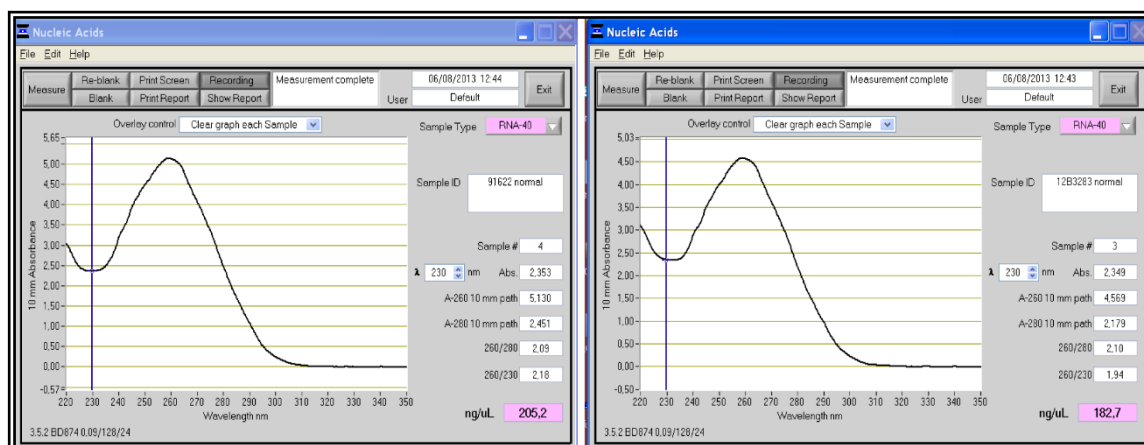


Figura 9. Captura de imagen del espectrofotómetro NanoDrop® para analizar la calidad del ARN extraído

3.4.3 Síntesis del ADNc

La transcripción reversa es un proceso en el que se sintetiza ADN complementario (ADNc) a partir de ARN monocatenario utilizando la enzima transcriptasa reversa.

Para llevar a cabo esta reacción, se utilizó el kit comercial "Transcriptor First Strand ADNc Síntesis Kit" (Roche, ref. 4896866001), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se preparó una mezcla que contenía 10 μl de ARN (20 ng/μl), 1 μl de oligo dT (100 mM) y 2 μl de hexámeros aleatorios (600 pmol/μl). La reacción se sometió a una desnaturalización a 65°C durante 10 minutos en un termociclador convencional y luego se colocó inmediatamente en hielo para evitar la renaturalización.

Llegados a este punto se añadieron 4 μl de tampón de reacción (5X), 0,5 μl de inhibidor de nucleasas de ARN (40 U/μl), 2 μl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (10 mM) y 0,5 μl de enzima transcriptasa reversa (20 U/μl).

La mezcla se incubó en un termociclador (NYX Technic ATC 40l) bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C, 5 minutos a 85°C y finalmente a 4°C hasta su uso.

3.2.4 PCR a tiempo real

Se empleó el sistema RealTime ready Custom Single Assays (Roche, 05532957001), que contiene los cebadores o primers específicos para cada gen unidos a la sonda, que produce luminiscencia cuando se desprende en la elongación durante la replicación del gen; y el kit LightCycler® 480 Probes Master (Roche, 4887301001). Los genes analizados se especifican en la Tabla 3, como gen de referencia se ha utilizado el gen GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Tabla 3. Referencias de los genes utilizados para el estudio.

Gen	Referencia (Assay ID)
IL-1 β	100950
IL-6	144013
IL-15	113161
IL-17A	136839
TNF- α	147880
TLR-4	135752
MMP-3	148638
MMP-13	140652
GAPDH	102052

Se empleó un termociclador LightCycler 480 (Roche) para realizar las reacciones (Figura 10). Cada reacción se preparó con una mezcla de 20 μ l utilizando ADNc a una concentración final de 2 ng/ μ L. Posteriormente, el termociclador se programó de la siguiente manera:

1. Preincubación: 10 minutos a 95°C.
2. Amplificación durante 45 ciclos, cada uno con las siguientes etapas:
 - g. Desnaturalización: 10 segundos a 95°C.
 - h. Anillamiento: 30 segundos a 60°C.
 - i. Extensión: 1 segundo a 72°C.
3. Enfriamiento: 30 segundos a 40°

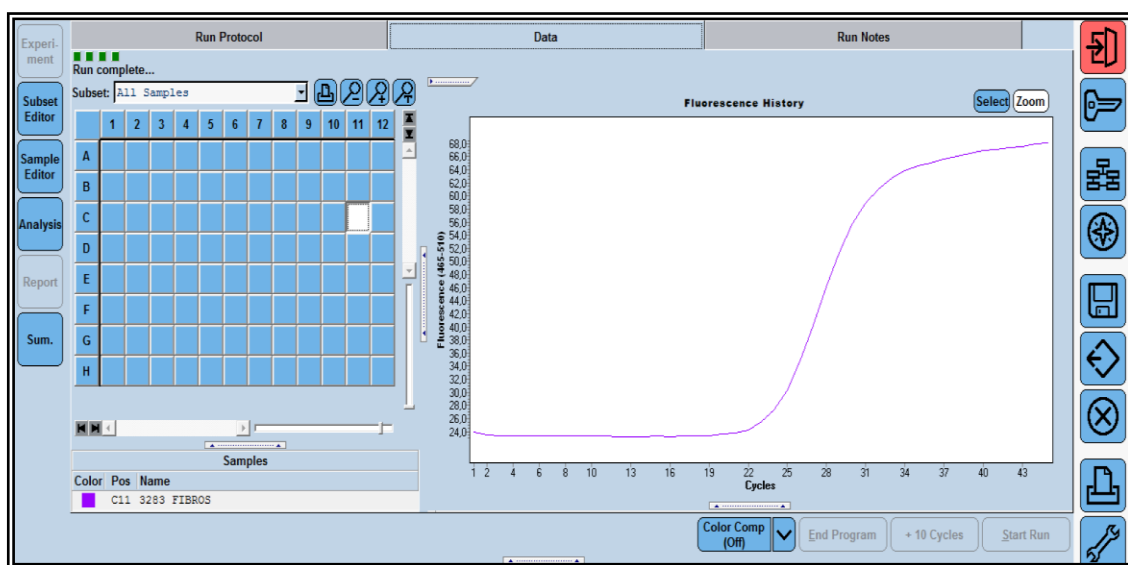


Figura 10. Captura de imagen del termociclador LigthCycler 480 (Roche) para analizar los resultados obtenidos por PCR semicuantitativa.

Para cuantificar la expresión génica, se optó por el método de cuantificación relativa avanzada. En este método, el punto de corte o crossing point (Cp) se calcula automáticamente utilizando el software LightCycler. Este punto corresponde al ciclo en el que la fluorescencia generada supera el umbral predefinido, y se determina como el primer máximo de la segunda derivada de la curva.

3.4.5 Análisis estadístico

Para analizar los datos recopilados, se utilizó el software PASW® Statistics 18. En primer lugar, se evaluó si las poblaciones seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

En este análisis, al comparar los valores de los mismos fibroblastos antes y después de la exposición al secretoma de hUCESC, se consideraron relacionadas las muestras. Para analizar estos datos:

a) En los grupos con distribución normal, se aplicó la prueba t de Student para muestras emparejadas (prueba paramétrica).

b) En los casos donde al menos uno de los grupos no presentó una distribución normal, se utilizó la prueba de signo de Wilcoxon para muestras relacionadas (prueba no paramétrica).

De nuevo, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor p fue igual o menor a 0,05.

3.5 MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 4

Para evaluar el impacto del secretoma de hUCESC en la capacidad proliferativa de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β en pacientes sanos y con artrosis se realizó un estudio comparativo de un grupo control (previo a la exposición del secretoma) frente a los grupos de sinovial normal y de sinovial artrósica tras la exposición al secretoma.

Se analizó la proliferación celular mediante un ensayo colorimétrico para medir la actividad metabólica celular. El ensayo de proliferación se basa en una prueba colorimétrica que utilizan un reactivo, el WST-1, para analizar la actividad de unas enzimas llamadas hidrogenasas en las mitocondrias de las células. Esto se hace mediante la conversión de un compuesto químico, el cloruro de tetrazolio, en un producto llamado formazán, que tiene un color específico. Como este proceso solo ocurre en células vivas y activas metabólicamente, la cantidad de formazán producido está relacionada con el número de células que están activas. La cantidad de formazán se mide midiendo la absorbancia, es decir, la capacidad de la solución para absorber la luz.

3.5.1 Estudio de proliferación

Para determinar el efecto del secretoma de hUCESC sobre la viabilidad de los fibroblastos sinoviales se realizaron ensayos colorimétricos de proliferación con el reactivo WST-1 (Roche, 05015944001).

Siguiendo el cálculo muestral previamente realizado, se emplearon 4 muestras del grupo de sinovial normal y 11 muestras del grupo de sinovial osteoartrítica.

Se sembraron en placas de 96 pocillos (Figura 11) fibroblastos de los grupos estudiados tras someterse a estimulación con IL1 β (10ng/mL): 4x10³ células/pocillo, y se cultivaron 24 horas en medio DMEM-F12 (Corning, ref.: 10-092-CV) suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina. Posteriormente, se retiró el medio con FBS y se trataron de acuerdo a las siguientes condiciones:

- Control: medio DMEM-F12 sin FBS + IL-1 β
- Sinovial normal: + IL-1 β + secretoma de hUCESC
- Sinovial artrósica: + IL-1 β + secretoma de hUCESC

Los tratamientos fueron realizados por triplicado, en 100 μ L, y se cultivaron durante 48 horas. Posteriormente, se añadieron 10 μ L del reactivo de proliferación WST-1 (Merck ref.: 11644807001) y se incubó durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂. La proliferación se cuantificó mediante la lectura de la placa en un lector de placas: Biorad, iMark™ (Figura 12), midiendo la absorbancia a 450 nm y sustrayendo el valor de la absorbancia a 655 nm.

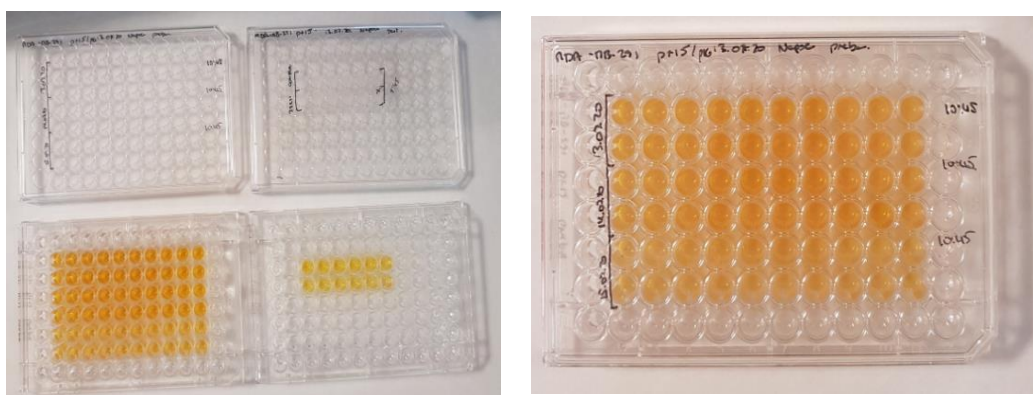


Figura 11. Placas de 96 pocillos para su lectura en lector de absorbancia.



Figura 12. Lector de absorbancia BioRad.

3.5.2 Análisis estadístico

Para analizar los datos recopilados, se utilizó el software PASW® Statistics 18. En primer lugar, se evaluó si las poblaciones seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En función del resultado obtenido se aplicó una prueba paramétrica (t de Student) o una prueba no paramétrica (U de Mann-Whitney) para muestras no relacionadas.

Se consideró en ambos casos diferencias estadísticamente significativas cuando el valor p era igual o menor a 0,05.

3.6 MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 5

Para evaluar la capacidad invasiva de una línea celular, se estudia cuántas células pueden atravesar una delgada capa de Matrigel, un material gelatinoso que imita la matriz extracelular. Este análisis se lleva a cabo utilizando cámaras de invasión que constan de dos compartimentos divididos por una membrana de polietileno, la cual permite el paso de las células a través de ella.

Para examinar el efecto del secretoma de hUCESC en la capacidad invasiva de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β en pacientes sanos y con artrosis, se utilizaron cámaras de invasión diseñadas para placas de 24 pocillos (Corning, BiocoatMatrigel™, 354480). Estas cámaras tienen una membrana de polietileno tereftalato con poros de 8 μ m que separan los compartimentos. (Figura 13)

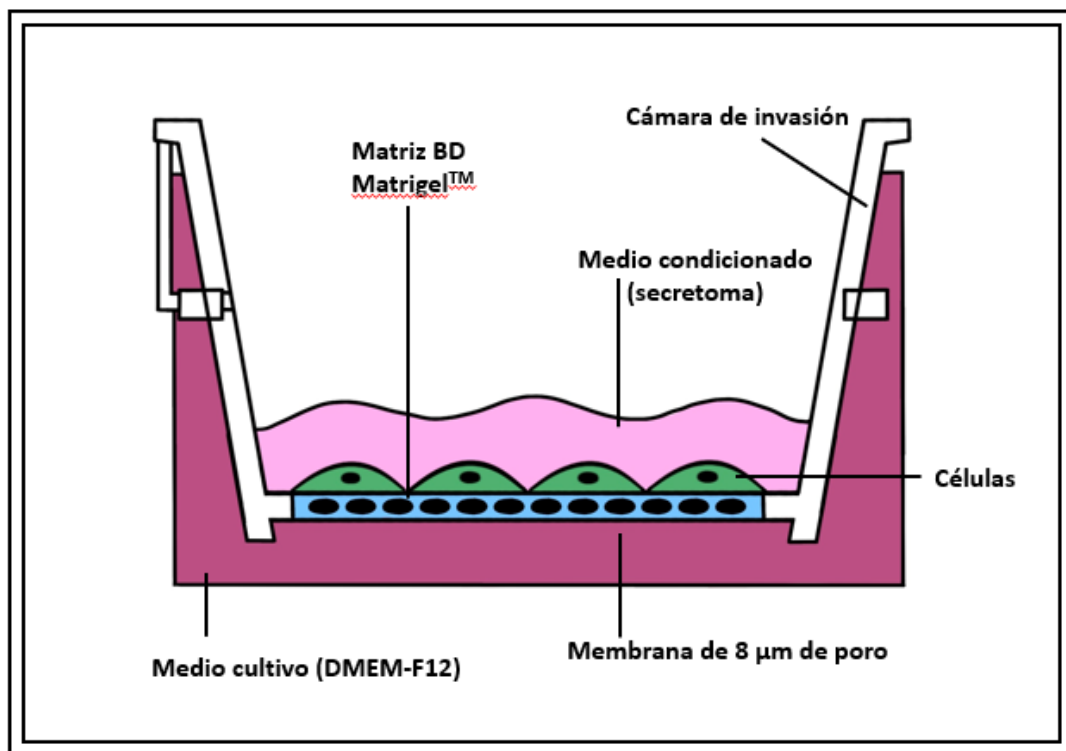


Figura 13. Esquema de la cámara de invasión.

Se analizó la invasión celular y se realizó una comparación de invasión de fibroblastos de sinovial normal y fibroblastos de sinovial artrósica antes y después de aplicarles secretoma de hUCESC.

3.6.1 Estudio de invasión

En la cámara superior, sobre el Matrigel, se sembraron los fibroblastos estudiados: 100.000 células en 500µL, en presencia del tratamiento correspondiente y en el compartimiento inferior el medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina.

Siguiendo el cálculo muestral previamente realizado, se emplearon 4 muestras del grupo de sinovial normal y 8 muestras del grupo de sinovial osteoartrítica.

El análisis comparativo se planteó valorando 4 grupos a comparar dos a dos:

- 1) Fibroblastos de sinovial normal estimulados (para reproducir estado inflamatorio activado) frente a Fibroblastos de sinovial normal estimulados tras ser expuestos al secretoma de hUCESC.
- 2) Fibroblastos de sinovial artrósica estimulados (para reproducir un estado inflamatorio activado) frente a Fibroblastos de sinovial artrósica estimulados tras ser expuestos al secretoma de hUCESC.

Los diferentes grupos a analizar fueron los siguientes:

- Control Sinovial Normal: medio DMEM-F12 sin FBS + IL-1 β (10ng/mL)
- Sinovial Normal + secretoma hUCESC: medio DMEM-F12 sin FBS en combinación con secretoma hUCESC + IL-1 β
- Control Sinovial Artrosis: medio DMEM-F12 sin FBS + IL-1 β (10ng/mL)
- Sinovial Artrosis: + secretoma hUCESC: medio DMEM-F12 sin FBS en combinación con secretoma hUCESC + IL-1 β

Los análisis fueron realizados por duplicado y se cultivaron durante 48 horas. Después de la incubación, las células que no habían invadido la membrana fueron eliminadas suavemente mediante frotamiento con un bastoncillo de algodón. Mientras tanto, las células que habían alcanzado la parte inferior de la membrana fueron fijadas con metanol absoluto frío (Fisher Chemical ref.: M/4070/PB17) durante 20 minutos. Posteriormente, se tiñeron con una solución de cristal violeta (Acros Organics ref.: 405830250) al 0,5% en metanol al 20% durante 30 minutos en condiciones de oscuridad.

Finalmente, los insertos fueron lavados con agua destilada (Asturlab ref.: AS005) y dejados secar al aire. Para contar las células, se utilizó un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) con un aumento de 40x. El análisis de la invasión se realizó tomando entre 5 y 10 campos por muestra analizada, y se contaron utilizando el software ImageJ en cada campo.

3.6.2 Análisis estadístico

Para analizar los datos recopilados, se utilizó el software PASW® Statistics 18. En primer lugar, se evaluó si las poblaciones seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

En este análisis, al comparar los valores de los mismos fibroblastos antes y después de la exposición al secretoma de hUCESC, se consideraron relacionadas las muestras. Para analizar estos datos:

- a) En los grupos con distribución normal, se aplicó la prueba t de Student para muestras emparejadas (prueba paramétrica).
- b) En los casos donde al menos uno de los grupos no presentó una distribución normal, se utilizó la prueba de signo de Wilcoxon para muestras relacionadas (prueba no paramétrica).

De nuevo, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor p fue igual o menor a 0,05.

3.7 MATERIAL Y MÉTODOS DEL OBJETIVO 6

Para investigar el efecto de los inhibidores de metaloproteasas TIMP-1 y TIMP-2 sobre la capacidad de invasión de los fibroblastos sinoviales en pacientes sanos y con artrosis, se realizó un estudio en que se deplecionaron en el secretoma de hUCESC TIMP-1 y TIMP-2 por inmunoprecipitación (IP) y se analizó la actividad de dicho secretoma sobre la capacidad invasiva de las células mediante ensayos de invasión en Matrigel in vitro.

Para conseguir la IP de TIMP-1 y TIMP-2 en el secretoma de hUCESC se emplearon unos anticuerpos anti-TIMP-1 y anti-TIMP-2. Para poder comparar el efecto en un grupo control, se empleó un anticuerpo IgG1 mouse que no actúa frente a TIMPs. El esquema del ensayo se puede observar en la figura 14.

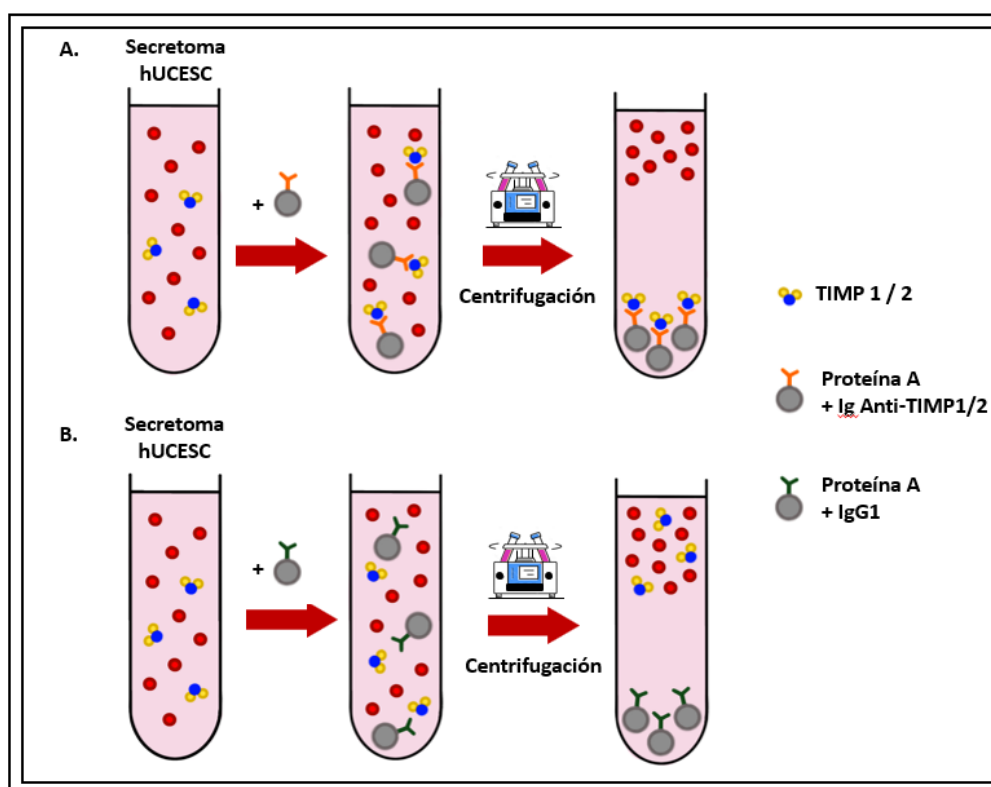


Figura 14. Esquema del ensayo de inmunoprecipitación. A) Al secretoma se añade Proteína A con Ig anti-TIMP-1 y Proteína A con Ig anti-TIMP-2. Posteriormente se centrifuga y se produce la IP de TIMP-1 y TIMP-2. B) Al secretoma se añade Proteína A con IgG1 (control). Tras la centrifugación no se produce la IP de las TIMP-1 y TIMP-2.

3.7.2 Estudio de inmunoprecipitación

Se realizó un estudio de inmunoprecipitación (IP) de TIMP-1 y TIMP-2 del secretoma de las hUCESC, para lo cual se preparó una mezcla de 70 μ l de proteína A/G PLUS-Agarosa (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EE. UU.) con 5 μ l de anticuerpo anti-TIMP-1 (sc-365905, Santa Cruz Biotechnology) + 5 μ l de anticuerpo anti-TIMP-2 (sc-365671, Santa Cruz Biotechnology), o 5 μ l de IgG1 mouse (usado como control IP, sc-3877, Santa Cruz Biotechnology), se mezclaron con 8 ml de secretoma de hUCESC y se incubaron durante la noche a 4°C con agitación orbital. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se utilizó para los ensayos de invasión.

3.7.3 Estudio de invasión tras inmunoprecipitación

Para evaluar la capacidad invasiva de una línea celular, se estudia cuántas células pueden atravesar una delgada capa de Matrigel, un material gelatinoso que imita la matriz extracelular. Este análisis se lleva a cabo utilizando cámaras de invasión que constan de dos compartimentos divididos por una membrana de polietileno, la cual permite el paso de las células a través de ella.

Para investigar el efecto del secretoma de hUCESC en la capacidad invasiva de los fibroblastos de los grupos estudiados, se utilizaron cámaras de invasión diseñadas para placas de 24 pocillos (Corning, BiocoatMatrigel™, 354480). Estas cámaras tienen una membrana de polietileno tereftalato con poros de 8 μ m que separan los compartimentos. (Figura 13)

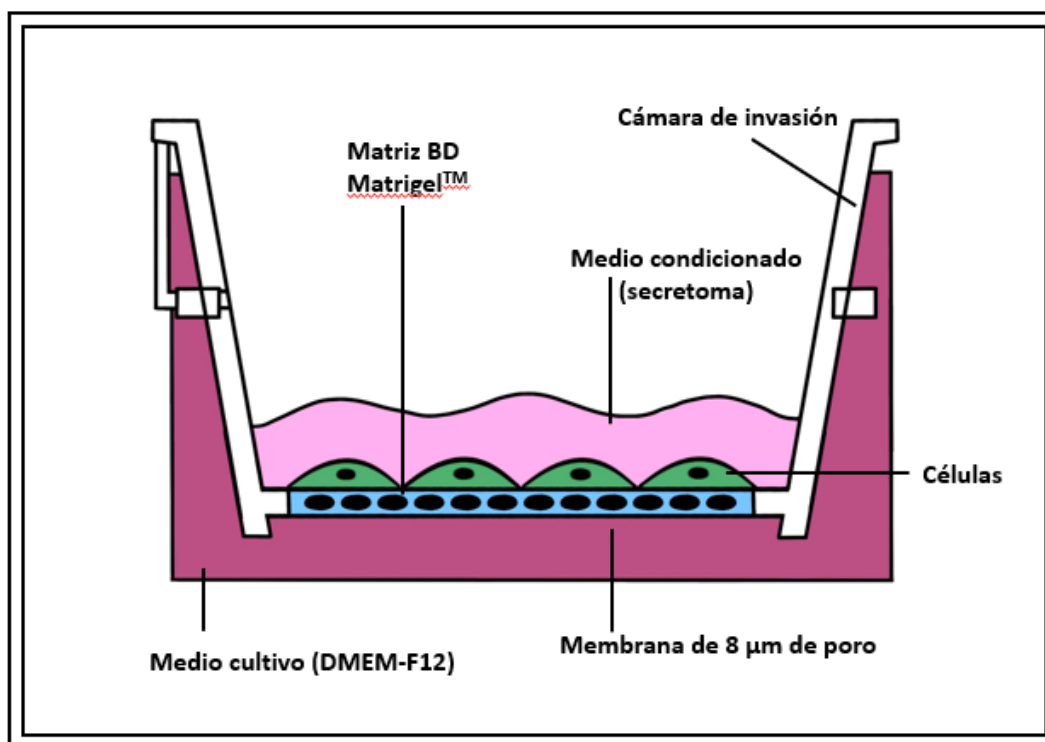


Figura 13. Esquema de la cámara de invasión.

En la cámara superior, sobre el Matrigel, se sembraron los fibroblastos estudiados: 100.000 células en 500µL, en presencia del tratamiento correspondiente y en el compartimiento inferior el medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina.

Siguiendo el cálculo muestral previamente realizado, se emplearon 4 muestras del grupo de sinovial normal y 8 muestras del grupo de sinovial osteoartítica.

El análisis comparativo se planteó valorando 4 grupos a comparar dos a dos:

1) Fibroblastos de sinovial normal estimulados (para reproducir estado inflamatorio activado) tras ser expuestos al secretoma de hUCESC en que no se ha producido una depleción de TIMP-1 y TIMP-2 frente a Fibroblastos de sinovial normal estimulados tras ser expuestos al secretoma de hUCESC en el que sí se han deplecionado TIMP-1 y TIMP-2.

2) Fibroblastos de sinovial artrósica estimulados (para reproducir estado inflamatorio activado) tras ser expuestos al secretoma de hUCESC en que no se ha producido una depleción de los TIMP-1 y TIMP-2 frente a Fibroblastos de sinovial artrósica estimulados tras ser expuestos al secretoma de hUCESC en el que sí se han deplecionado TIMP-1 y TIMP-2.

Los diferentes grupos a analizar fueron por tanto los siguientes:

- Sinovial Normal + secretoma hUCESC + IP IgG1: medio DMEM-F12 sin FBS en combinación con secretoma hUCESC IP IgG1+ IL1 β (10ng/mL)
- Sinovial Normal + secretoma hUCESC + IP TIMP1/2: medio DMEM-F12 sin FBS en combinación con secretoma hUCESC IP TIMP1/2 + IL1 β (10ng/mL)
- Sinovial Artrosis: + secretoma hUCESC + IP IgG1: medio DMEM-F12 sin FBS en combinación con secretoma hUCESC IP IgG1+ IL1 β (10ng/mL)
- Sinovial Artrosis + secretoma hUCESC + IP TIMP1/2: medio DMEM-F12 sin FBS en combinación con secretoma hUCESC IP TIMP1/2 + IL1 β (10ng/mL)

Los análisis fueron realizados por duplicado y se cultivaron durante 48 horas. Después de la incubación, las células que no habían invadido la membrana fueron eliminadas suavemente mediante frotamiento con un bastoncillo de algodón. Mientras tanto, las células que habían alcanzado la parte inferior de la membrana fueron fijadas con metanol absoluto frío (Fisher Chemical ref.: M/4070/PB17) durante 20 minutos. Posteriormente, se tiñeron con una solución de cristal violeta (Acros Organics ref.: 405830250) al 0,5% en metanol al 20% durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. Finalmente, los insertos fueron lavados con agua destilada (Asturlab ref.: AS005) y dejados secar al aire. Para contar las células, se utilizó un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) con un aumento de 40x. El análisis de la invasión se realizó tomando entre 5 y 10 campos por muestra analizada, y se contaron utilizando el software ImageJ en cada campo.

3.7.4 Análisis estadístico

Para analizar los datos recopilados, se utilizó el software PASW® Statistics 18. En primer lugar, se evaluó si las poblaciones seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

En este análisis, al comparar los valores de los mismos fibroblastos sin y con depleción de TIMP-1 y TIMP-2 en el secretoma de hUCESC, se consideraron relacionadas las muestras. Para analizar estos datos:

a) En los grupos con distribución normal, se aplicó la prueba t de Student para muestras emparejadas (prueba paramétrica).

b) En los casos donde al menos uno de los grupos no presentó una distribución normal, se utilizó la prueba de signo de Wilcoxon para muestras relacionadas (prueba no paramétrica).

De nuevo, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el valor p fue igual o menor a 0,05.

4

Resultados

4.1 RESULTADOS DEL OBJETIVO 1

Para comparar los niveles basales de marcadores relacionados con la inflamación y con la destrucción del cartílago en fibroblastos sinoviales de rodilla entre pacientes sanos y con artrosis se analizó la expresión génica por RT-qPCR de IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3, y MMP-13. Se muestran los resultados obtenidos:

4.1.1 Estadística descriptiva

En la tabla 4 se recogen los datos característicos obtenidos en la determinación de IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13 para cada uno de los grupos.

Tabla 4. Estadística descriptiva de los puntos característicos de los dos grupos

MUESTRA	Parámetros	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Sinovial Normal	IL-1 β	0,0002	0,00007	0,000	0,0005	0,0002
	IL-6	0,012	0,008	0,004	0,022	0,007
	IL-15	0,015	0,014	0,004	0,027	0,007
	IL-17A	0,00006	0,00006	0,000	0,0002	0,00005
	TNF- α	0,0007	0,0007	0,0003	0,001	0,0003
	TLR-4	0,007	0,008	0,004	0,006	0,002
	MMP-3	0,042	0,016	0,001	0,155	0,058
	MMP-13	0,0001	0,00009	0,000	0,0003	0,0001
Sinovial Artrosis	IL-1 β	0,037	0,0003	0,0001	0,441	0,127
	IL-6	8,388	0,014	0,008	100,2	28,913
	IL-15	0,009	0,009	0,002	0,018	0,005
	IL-17A	0,00007	0,00003	0,000	0,0004	0,0001
	TNF- α	0,0009	0,0006	0,000	0,004	0,001
	TLR-4	0,008	0,007	0,003	0,017	0,005
	MMP-3	2,554	0,018	0,003	30,447	8,785
	MMP-13	0,001	0,0001	0,000	0,006	0,002

4.1.2 Estadística inferencial

Antes de comparar los datos, se procedió a comprobar la normalidad de los grupos mediante el Test de Shapiro-Wilk (tabla 5) correspondiente a los dos grupos, observándose que existía una distribución normal (significación estadística $>0,05$ en ambos grupos) para los factores de IL-15 y de TLR-4 y los demás presentaban una distribución no normal.

Tabla 5. Test de Shapiro-Wilk correspondiente a los dos grupos (expresado en Sig.)

MUESTRA	IL-1 β	IL-6	IL-15	IL-17A	TNF- α	TLR-4	MMP-3	MMP-13
Sinovial normal	0,000	0,229	0,545	0,583	0,985	0,402	0,011	0,356
Sinovial artrosis	0,055	0,000	0,589	0,000	0,001	0,097	0,000	0,000

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test no paramétrico, Prueba de U de Mann-Whitney, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , MMP-3 y MMP-13. Se observó que existía una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de IL-1 β ($p= 0,018$) entre los fibroblastos de sinovial normal y los fibroblastos de sinovial artrósica, y no se observó diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica del resto de los factores estudiados (tabla 6).

Tabla 6. Prueba de U de Mann-Whitney (prueba no paramétrica) correspondientes a los dos grupos

	UMW	Sig.*
IL-1 β	61,00	0,018 *
IL-6	57,00	0,053
IL-17A	28,50	0,494
TNF- α	28,00	0,494
MMP-3	35,00	0,964
MMP-13	40,00	0,750

* significación en nivel 0,05

Se utilizó un test paramétrico, prueba de t de Student, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en IL-15 y en TLR-4. Se aplicó primeramente un test de Levene para igualdad de varianzas (se asumen varianzas iguales o no se asumen varianzas iguales) obteniendo el resultado de que en el caso de IL15 sí se asumen varianzas iguales y en el caso de TLR4 no se asumen varianzas iguales (tabla 7)

Tabla 7. Prueba de Levene para igualdad de varianzas

	Se asumen varianzas iguales	F	Sig.*
IL-15	Sí	0,524	0,479
TLR-4	No	5,315	0,035

* significación en nivel 0,05

Se obtuvo una t de Student de 2,00 para IL-15 y de -0.55 para TLR-4 con una significación de $p > 0,05$; lo que indica que no existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de IL-15 y TLR-4 entre los fibroblastos de sinovial normal y los fibroblastos de sinovial artrósica (tabla 8).

Tabla 8. Prueba t de Student para igualdad de medias (prueba paramétrica)
correspondientes a los dos grupos

	t	Sig.*
IL-15	2,00	0,063
TLR-4	-0,550	0,590

* significación en nivel 0,05

4.1.3 Representación gráfica de los resultados

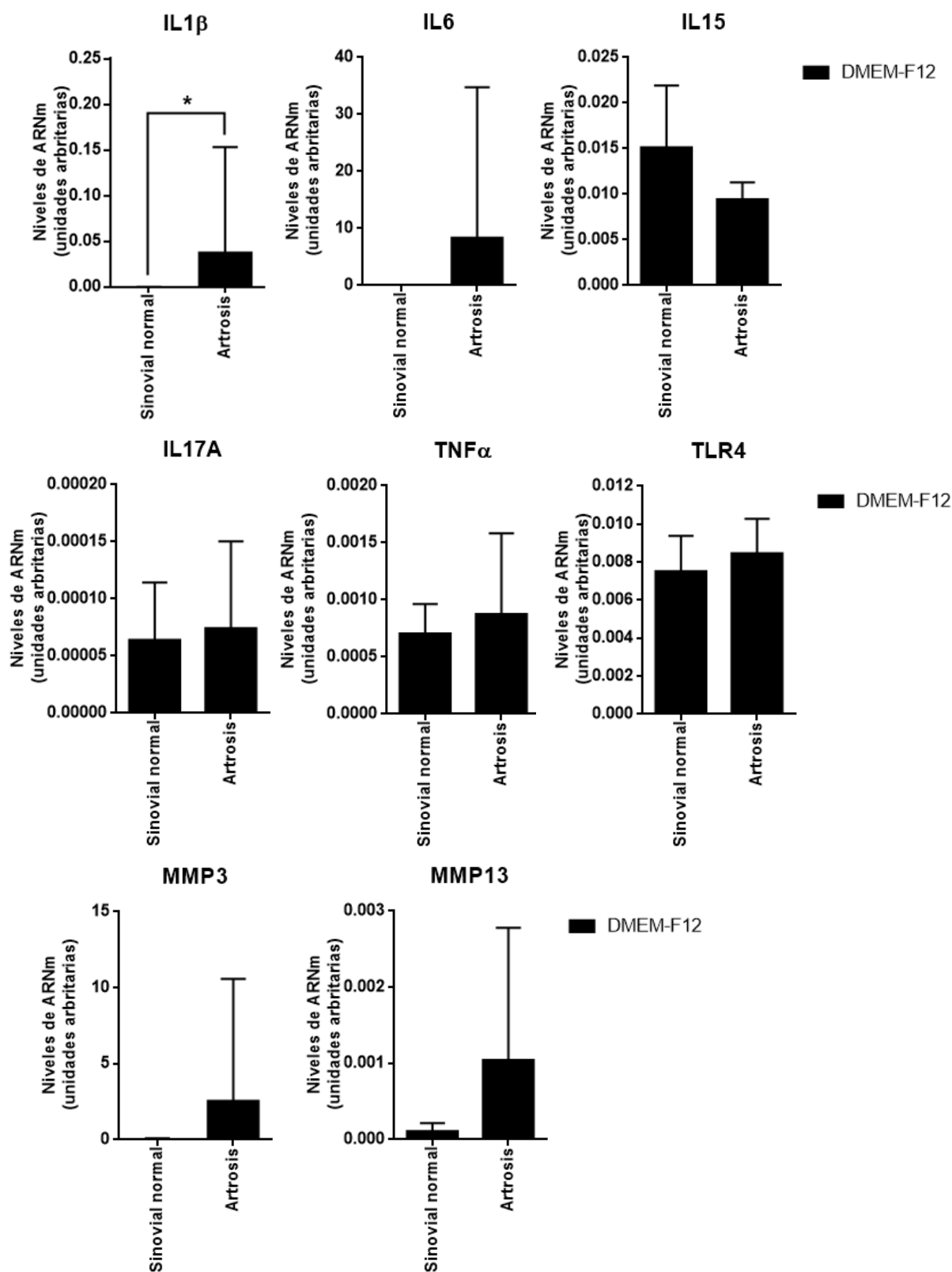


Figura 14. Expresión de IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13 en ambos grupos de estudio (Sinovial normal y Sinovial artrósica). DMEM-F12: medio de cultivo.

El análisis estadístico revela que los fibroblastos sinoviales de pacientes con artrosis presentan una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los fibroblastos sinoviales de pacientes sanos en la expresión de IL-1 β , siendo mayor en artrosis (Figura 14).

Aunque no se observa una diferencia estadísticamente significativa, las muestras de sinovial artrósica muestran una tendencia hacia una mayor expresión de IL-6, MMP-3 y MMP-13 y una menor expresión de IL-15 en comparación con las muestras de sinovial normal. En los niveles de IL-17A, TNF- α y TLR-4, no se aprecian diferencias significativas ni tendencias claras de mayor o menor expresión entre los tipos de muestra (Figura 14).

4.2 RESULTADOS DEL OBJETIVO 2

Para analizar y comparar los niveles de marcadores inflamatorios y condrolíticos en los fibroblastos sinoviales de pacientes sanos y con artrosis, antes y después de la estimulación con IL-1 β , se analizó la expresión génica por RT-qPCR de IL-1 β , IL-6, IL-15, IL17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3, MMP-13 una vez estimulados con IL-1 β y se compararon con los valores previos a su estimulación (estudiados en Objetivo 1). Se muestran los resultados obtenidos:

4.2.1 Estadística descriptiva

En la tabla 4 se recogen los datos característicos obtenidos en la determinación de IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13 para cada uno de los grupos antes de ser estimulados con IL-1 β .

Tabla 4. Estadística descriptiva de los puntos característicos de los dos grupos

MUESTRA	Parámetros	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Sinovial Normal	IL-1 β	0,0002	0,00007	0,000	0,0005	0,0002
	IL-6	0,012	0,008	0,004	0,022	0,007
	IL-15	0,015	0,014	0,004	0,027	0,007
	IL-17A	0,00006	0,00006	0,000	0,0002	0,00005
	TNF- α	0,0007	0,0007	0,0003	0,001	0,0003
	TLR-4	0,007	0,008	0,004	0,006	0,002
	MMP-3	0,042	0,016	0,001	0,155	0,058
	MMP-13	0,0001	0,00009	0,000	0,0003	0,0001
Sinovial Artrosis	IL-1 β	0,037	0,0003	0,0001	0,441	0,127
	IL-6	8,388	0,014	0,008	100,2	28,913
	IL-15	0,009	0,009	0,002	0,018	0,005
	IL-17A	0,00007	0,00003	0,000	0,0004	0,0001
	TNF- α	0,0009	0,0006	0,000	0,004	0,001
	TLR-4	0,008	0,007	0,003	0,017	0,005
	MMP-3	2,554	0,018	0,003	30,447	8,785
	MMP-13	0,001	0,0001	0,000	0,006	0,002

En la tabla 9 se recogen los datos característicos obtenidos en la determinación de IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13 tras ser estimulados con IL-1 β para cada uno de los grupos tras ser estimulados con IL-1 β .

Tabla 9. Estadística descriptiva de los puntos característicos de los dos grupos tras ser estimulados con IL-1 β

MUESTRA	Parámetros	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Sinovial Normal Estimulada (+ IL-1β)	IL-1 β	0,019	0,014	0,000	0,048	0,197
	IL-6	32,988	35,045	0,026	62,10	21,862
	IL-15	0,056	0,056	0,012	0,127	0,041
	IL-17A	0,00005	0,0005	0,000	0,0002	0,00006
	TNF- α	0,005	0,004	0,0009	0,009	0,003
	TLR-4	0,003	0,003	0,0006	0,005	0,002
	MMP3	139,852	94,25	0,014	415,6	158,958
	MMP13	0,015	0,009	0,0003	0,044	0,017
Sinovial Artrosis Estimulada (+ IL-1β)	IL-1 β	0,124	0,038	0,012	0,647	0,179
	IL-6	52,412	48,85	13,70	131,40	30,416
	IL-15	0,047	0,034	0,014	0,105	0,032
	IL-17A	0,00005	0,00004	0,000	0,0002	0,00005
	TNF- α	0,004	0,003	0,004	0,014	0,004
	TLR-4	0,003	0,002	0,0009	0,007	0,002
	MMP-3	91,083	45,495	0,728	360,00	118,109
	MMP-13	0,021	0,021	0,0003	0,052	0,017

4.2.2 Estadística inferencial

4.2.2.1. Análisis comparativo de los grupos de estudio (Sinovial Normal y Sinovial Artrósica) antes y después de ser estimulados con IL-1 β

Antes de comparar los datos entre los grupos tras la estimulación con IL-1 β , se procedió a comprobar la normalidad de los grupos mediante el Test de Shapiro-Wilk (tabla 10) correspondiente a los ambos grupos, antes y después de ser estimulados con IL-1 β , observándose que existía una distribución normal (significación estadística $>0,05$ en ambos casos) en sinovial normal en IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α , TLR-4 y de MMP-13, y en sinovial artrósica en TLR-4. El resto de los factores presentaban una distribución no normal.

Tabla 10. Test de Shapiro-Wilk correspondiente a los dos grupos (expresado en Sig.)

MUESTRA	IL-1 β	IL-6	IL-15	IL-17A	TNF- α	TLR-4	MMP-3	MMP-13
Sinovial Normal NO estimulada (sin IL-1 β)	0,055	0,229	0,545	0,583	0,985	0,402	0,011	0,356
Sinovial Normal estimulada (+ IL-1 β)	0,280	0,984	0,479	0,014	0,590	0,443	0,246	0,204
Sinovial Artrosis NO estimulada (sin IL-1 β)	0,000	0,000	0,589	0,000	0,001	0,097	0,000	0,000
Sinovial Artrosis estimulada (+ IL-1 β)	0,000	0,058	0,031	0,008	0,008	0,089	0,002	0,323

* significación en nivel 0,05

4.2.2.1.1. Análisis entre grupos Sinovial Normal antes y después de estimulación con IL-1 β

Se utilizó el test no paramétrico, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los grupos de estudio de sinovial normal en IL-17A, y MMP-3 comparando los valores obtenidos antes y después de ser estimulados con IL-1 β . Se observó que existe una diferencia

estadísticamente significativa en la expresión génica de MMP-3 ($p=0,028$) entre los fibroblastos de sinovial normal antes y después de ser estimulados con IL-1 β , y no se observó diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de IL-17A (tabla 11).

Tabla 11. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon (prueba no paramétrica) correspondientes a los dos grupos

	PW	Sig.*
IL-17A en muestras de Sinovial Normal antes y después de ser estimuladas con IL-1β	3,00	0,225
MMP-3 en muestras de Sinovial Normal antes y después de ser estimuladas con IL-1β	21,00	0,028 *

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test paramétrico, Prueba de t de Student para muestras emparejadas, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos de Sinovial Normal antes y después de la estimulación con IL-1 β en IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α , TLR-4 y MMP-13. Se observó que existía una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de IL-6 ($p=0,014$), IL-15 ($p=0,036$), TNF- α ($p=0,022$), y TLR-4 ($p=0,005$), y no se observó diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de IL-1 β y MMP-13 (tabla 12).

Tabla 12. Prueba de t de Student de muestras emparejadas (prueba paramétrica) correspondientes a los dos grupos

	t	Sig.*
IL-1 β en muestras de Sinovial Normal antes y después de ser estimuladas con IL-1 β	-2,402	0,061
IL-6 en muestras de Sinovial Normal antes y después de ser estimuladas con IL-1 β	-3,695	0,014 *
IL-15 en muestras de Sinovial Normal antes y después de ser estimuladas con IL-1 β	-2,856	0,036 *
TNF- α en muestras de Sinovial Normal antes y después de ser estimuladas con IL-1 β	-3,275	0,022 *
TLR-4 en muestras de Sinovial Normal antes y después de ser estimuladas con IL-1 β	4,760	0,005 *
MMP-13 en muestras de Sinovial Normal antes y después de ser estimuladas con IL-1 β	-2,088	0,091

* significación en nivel 0,05

4.2.2.1.2. Análisis entre grupos Sinovial Artrósica antes y después de estimulación con IL-1 β

Se utilizó el test no paramétrico, Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los grupos de estudio de sinovial artrósica en IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , MMP-3 y MMP-13 comparando los valores obtenidos antes y después de ser estimulados con IL-1 β . Se observó que existía una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de IL-1 β ($p=0,028$), IL-6 ($p=0,002$), IL-15 ($p=0,002$), TNF- α ($p=0,012$), TLR-4

($p=0,005$), MMP-3 ($p=0,002$) y MMP-13 ($p=0,002$), y no se observó diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de IL-17A (tabla 13).

Tabla 13. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon (prueba no paramétrica) correspondiente a los dos grupos

	PW	Sig.*
IL-1β en muestras de Sinovial Artrósica antes y después de ser estimuladas con IL-1β	67,00	0,028 *
IL-6 en muestras de Sinovial Artrósica antes y después de ser estimuladas con IL-1β	78,00	0,002 *
IL-15 en muestras de Sinovial Artrósica antes y después de ser estimuladas con IL-1β	78,00	0,002 *
IL-17A en muestras de Sinovial Artrósica antes y después de ser estimuladas con IL-1β	30,00	0,799
TNF-α en muestras de Sinovial Artrósica antes y después de ser estimuladas con IL-1β	71,00	0,012 *
MMP-3 en muestras de Sinovial Artrósica antes y después de ser estimuladas con IL-1β	78,00	0,002 *
MMP-13 en muestras de Sinovial Artrósica antes y después de ser estimuladas con IL-1β	78,00	0,002 *

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test paramétrico, Prueba de t de Student para muestras emparejadas, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos de sinovial artrósica antes y después de la estimulación con IL-1 β en TLR-4. Se observó que existía una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de TLR-4 ($p=0,001$) (tabla 14).

Tabla 14. Prueba de T de Student de muestras emparejadas (prueba paramétrica) correspondientes a los dos grupos

	t	Sig.*
TLR-4 en muestras de Sinovial Artrósica antes y después de ser estimuladas con IL-1β	4,648	0,001

* significación en nivel 0,05

4.2.2.2. Análisis entre Sinovial Normal y Sinovial Artrósica tras ser estimulados con IL-1 β

Antes de comparar los datos entre los grupos tras la estimulación con IL-1 β , se procedió a comprobar la normalidad de los grupos mediante el Test de Shapiro-Wilk (tabla 15) correspondiente a los dos grupos, observándose que existe una distribución normal (significación estadística $>0,05$ en ambos grupos) para los factores IL-6, TLR-4 y MMP-13 y los demás presentaban una distribución no normal.

Tabla 15. Test de Shapiro-Wilk correspondiente a los dos grupos (expresado en Sig.)

MUESTRA	IL-1 β	IL-6	IL-15	IL-17A	TNF- α	TLR-4	MMP-3	MMP-13
Sinovial normal + IL-1β	0,280	0,984	0,479	0,014	0,590	0,443	0,246	0,204
Sinovial artrosis + IL-1β	0,000	0,058	0,031	0,008	0,008	0,089	0,002	0,323

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test no paramétrico, Prueba de U de Mann-Whitney, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en IL-1 β , IL-15, IL-17A y MMP-3. Se no se observó diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de ninguno de ellos (tabla 16).

Tabla 16. Prueba de U de Mann-Whitney (prueba no paramétrica) correspondientes a los dos grupos

	UMW	Sig.*
IL-1β	55,00	0,083
IL-15	32,00	0,750
IL-17A	36,50	1,000
TNF-α	27,00	0,437
MMP-3	33,00	0,820

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test paramétrico, prueba de t de Student, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en IL-6, TNF- α , TLR-4 y MMP-13. Se aplicó primeramente un test de Levene para igualdad de varianzas (se asumen varianzas iguales o no se asumen varianzas iguales) obteniendo el resultado de que en todos los casos sí se asumen varianzas iguales (tabla 17)

Tabla 17. Prueba de Levene para igualdad de varianzas

	Se asumen varianzas iguales	F	Sig.*
IL-6	Sí	0,128	0,725
TLR-4	Sí	0,382	0,382
MMP-13	Sí	0,232	0,232

* significación en nivel 0,05

Se obtuvo una t de Student para cada uno de ellos con una significación de $p > 0,05$; lo que nos indica que no existían diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de IL-6, TLR-4 y MMP-13 entre fibroblastos de sinovial normal y fibroblastos de sinovial artrósica (tabla 18).

Tabla 18. Prueba de T de Student (prueba paramétrica) correspondientes a los dos grupos

	t	Sig.*
IL-6	-1,386	0,185
TLR-4	-0,103	0,919
MMP-13	-0,765	0,455

* significación en nivel 0,05

4.2.3 Representación gráfica de los resultados

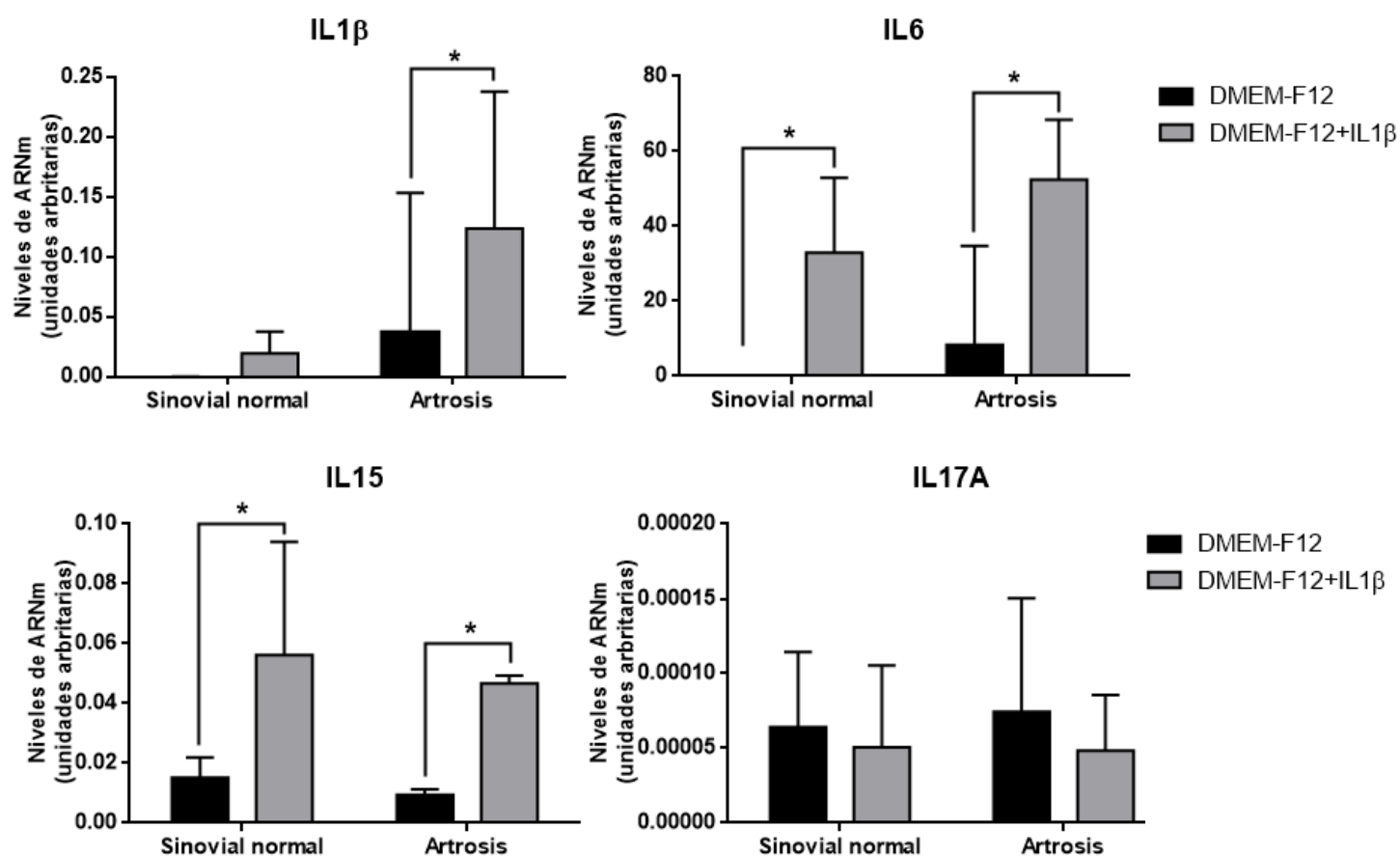


Figura 15. Expresión de IL-1 β , IL-6, IL-15 y IL-17A en ambos grupos de estudio (Sinovial normal y Sinovial artrósica) antes (DMEM-F12) y después (DMEM-F12+IL-1 β) de la estimulación con IL-1 β . DMEM-F12: medio de cultivo; DMEM-F12+IL-1 β : medio de cultivo tras ser estimulado con IL-1 β para reproducir ambiente inflamatorio.

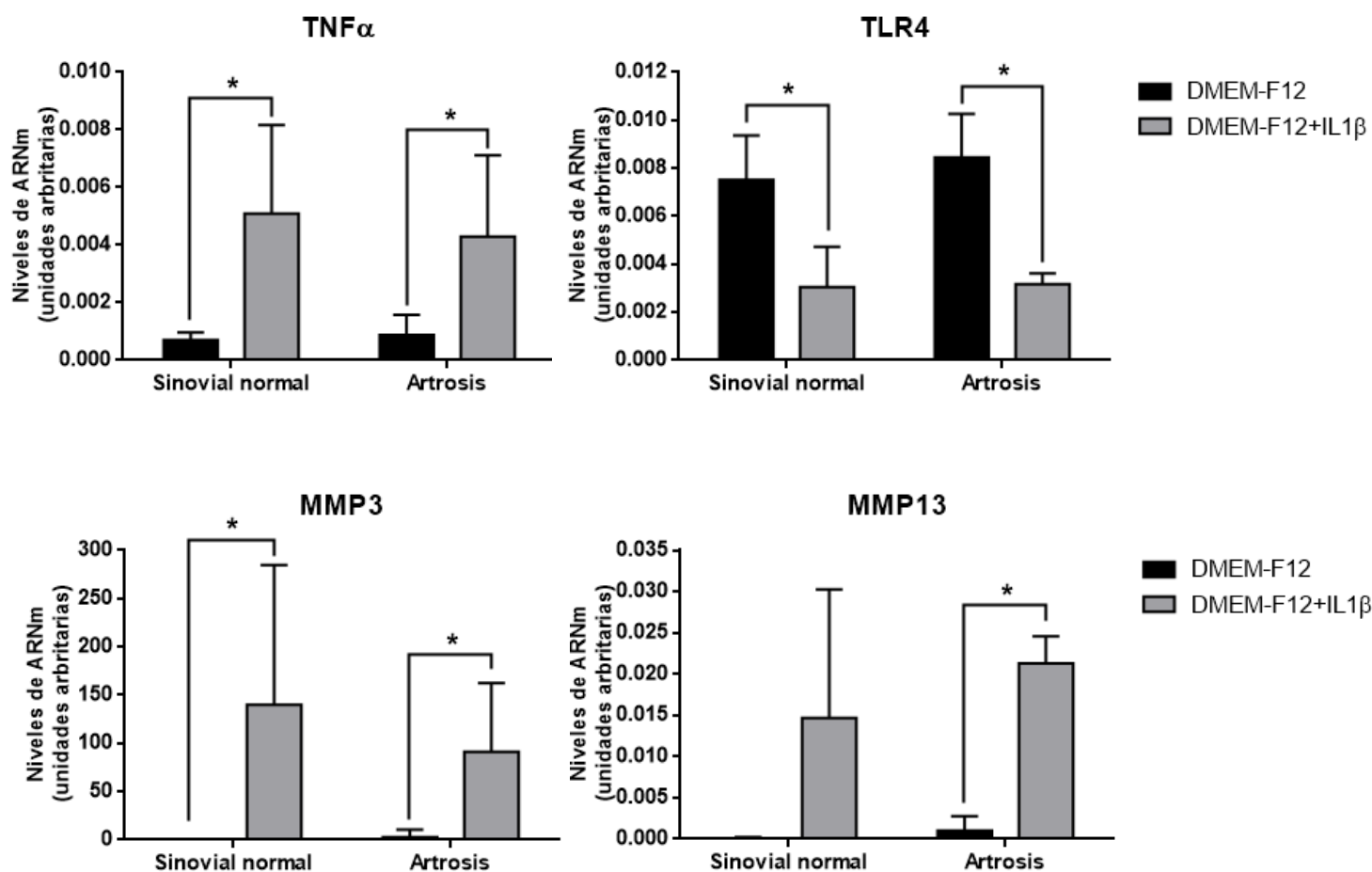


Figura 16. Expresión de TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13 en ambos grupos de estudio (Sinovial normal y Sinovial artrósica) antes (DMEM-F12) y después (DMEM-F12+IL-1 β) de la estimulación con IL-1 β . DMEM-F12: medio de cultivo; DMEM-F12+IL-1 β : medio de cultivo tras ser estimulado con IL-1 β para reproducir ambiente inflamatorio.

Al analizar la expresión de IL-1 β en los fibroblastos, se observó que la estimulación de las muestras con IL-1 β aumentaba su expresión tanto en el grupo de sinovial normal como en el de sinovial artrósica. Antes de la estimulación, la sinovial artrósica ya presentaba niveles más altos de IL-1 β en comparación con la sinovial normal, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,018$) (Tabla 6, Figura 14). Tras la estimulación, la sinovial artrósica mostró un aumento estadísticamente significativo ($p=0,028$) en la expresión de IL-1 β , aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (sinovial normal y artrósica) después de la estimulación. (Figura 15)

Al analizar la expresión de IL-6 en los fibroblastos, se observó que la estimulación con IL-1 β aumentó sus niveles tanto en la sinovial normal como en la sinovial artrósica, con una diferencia estadísticamente significativa en ambos grupos (SN $p=0,014$; SA $p=0,002$). Antes de la estimulación, la sinovial artrósica ya mostraba niveles más altos de IL-6 en comparación con la sinovial normal, aunque esta diferencia no era significativa. Después de la estimulación, aunque la sinovial artrósica tuvo un aumento mayor de IL-6 respecto a la sinovial normal, la diferencia entre ambos grupos siguió sin ser estadísticamente significativa. (Figura 15)

El análisis de la expresión de IL-15 en los fibroblastos mostró que la estimulación con IL-1 β aumentó sus niveles tanto en la sinovial normal como en la artrósica presentando una diferencia estadísticamente significativa en ambos casos (SN $p=0,036$; SA $p=0,002$). Antes de la estimulación, los niveles de IL-15 eran más altos en la sinovial normal que en la artrósica, aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa. Después de la estimulación con IL-1 β , tampoco se observaron diferencias significativas entre la sinovial normal y la artrósica. (Figura 15)

En el caso de la expresión de la IL-17A en los fibroblastos se observó que al ser estimulados con IL-1 β la expresión de IL-17A apenas generaba cambio en su expresión tanto en el grupo de sinovial normal como en la sinovial artrósica, siendo su expresión igualmente similar en ambos grupos ya antes de ser estimulados, sin observarse obviamente diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. (Figura 15).

El análisis de la expresión de TNF- α en los fibroblastos mostró que la estimulación con IL-1 β aumentó significativamente sus niveles tanto en la sinovial normal como en la artrósica (SN $p=0,022$; SA $p=0,012$). Antes de la estimulación, los niveles de TNF- α eran más altos en la sinovial artrósica que en la normal, aunque sin diferencias significativas. Tras la estimulación con IL-1 β , los niveles de TNF- α resultaron más altos en la sinovial normal, pero tampoco se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. (Figura 16)

El análisis de la expresión de TLR-4 en los fibroblastos mostró que, tras la estimulación con IL-1 β , sus niveles disminuyeron de manera estadísticamente significativa tanto en la sinovial normal como en la artrosis (SN $p=0,005$; SA $p=0,001$). La sinovial normal presentó una mayor expresión de TLR-4 en comparación con la artrósica, tanto antes como después de la estimulación, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los casos. (Figura 16)

El análisis de la expresión de MMP3 en los fibroblastos mostró que la estimulación con IL-1 β aumentó de forma estadísticamente significativa sus niveles tanto en la sinovial normal como en la artrósica (SN $p=0,028$; SA $p=0,002$). Antes de la estimulación, los niveles de MMP3 eran más altos en la sinovial artrósica, aunque la diferencia no era estadísticamente significativa. Después de la estimulación con IL-1 β , los niveles de MMP3 fueron mayores en la sinovial normal, pero sin diferencias significativas entre ambos grupos. (Figura 16)

El análisis de la expresión de MMP-13 en los fibroblastos mostró que la estimulación con IL-1 β aumentó sus niveles en ambos grupos, con un incremento estadísticamente significativo en la sinovial artrósica ($p=0,002$). Antes de la estimulación, la sinovial artrósica ya presentaba niveles más altos de MMP-13 que la sinovial normal, aunque esta diferencia no era significativa. Tras la estimulación, a pesar de que el aumento de MMP-13 fue mayor en la sinovial artrósica, la diferencia entre ambos grupos continuó sin ser estadísticamente significativa. (Figura 16)

En definitiva, el análisis estadístico muestra que tras la estimulación con IL-1 β , se observa un incremento estadísticamente significativo en la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α , MMP-3 y MMP-13 en los fibroblastos sinoviales de pacientes con artrosis, un incremento en la expresión de IL-6, IL-15, TNF- α y MMP-3 en los fibroblastos sinoviales de pacientes sanos, y una reducción estadísticamente significativa en la expresión de TLR-4 tanto en pacientes sanos como en pacientes con artrosis.

Por otro lado, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los marcadores analizados entre los grupos de sinovial normal y sinovial artrósica tras la estimulación con IL-1 β .

4.3 RESULTADOS DEL OBJETIVO 3

Para determinar el efecto del secretoma de hUCESC sobre la expresión génica de marcadores inflamatorios y condrolíticos en fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β de pacientes sanos y con artrosis, se estudió la expresión génica por RT-qPCR de IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3, MMP-13 en los fibroblastos de ambos grupos tras ser estimulados con IL-1 β y aplicarles el secretoma de hUCESC, y se comparó con las muestras antes de aplicarles el secretoma de hUCESC (estudiados en Objetivo 2). Se muestran los resultados obtenidos:

4.3.1 Estadística descriptiva

En la tabla 9 se recogen los datos característicos obtenidos en la determinación de IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13 para cada uno de los grupos tras ser estimulados con IL-1 β .

Tabla 9. Estadística descriptiva de los puntos característicos de los dos grupos tras ser estimulados con IL-1 β

MUESTRA	Parámetros	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Sinovial Normal Estimulada (+ IL-1β)	IL-1 β	0,019	0,014	0,000	0,048	0,197
	IL-6	32,988	35,045	0,026	62,10	21,862
	IL-15	0,056	0,056	0,012	0,127	0,041
	IL-17A	0,00005	0,0005	0,000	0,0002	0,00006
	TNF- α	0,005	0,004	0,0009	0,009	0,003
	TLR-4	0,003	0,003	0,0006	0,005	0,002
	MMP3	139,852	94,25	0,014	415,6	158,958
	MMP13	0,015	0,009	0,0003	0,044	0,017
Sinovial Artrosis Estimulada (+ IL-1β)	IL-1 β	0,124	0,038	0,012	0,647	0,179
	IL-6	52,412	48,85	13,70	131,40	30,416
	IL-15	0,047	0,034	0,014	0,105	0,032
	IL-17A	0,00005	0,00004	0,000	0,0002	0,00005
	TNF- α	0,004	0,003	0,004	0,014	0,004
	TLR-4	0,003	0,002	0,0009	0,007	0,002
	MMP-3	91,083	45,495	0,728	360,00	118,109
	MMP-13	0,021	0,021	0,0003	0,052	0,017

En la tabla 19 se recogen los datos característicos obtenidos en la determinación de IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13 tras ser estimulados con IL-1 β y aplicado el secretoma de hUCESC para cada uno de los grupos.

Tabla 19. Estadística descriptiva de los puntos característicos de los dos grupos tras ser estimulados con IL-1 β y ser expuestos al secretoma de hUCESC

MUESTRA	Parámetros	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Sinovial Normal Estimulada (+ IL-1β) + secretoma hUCESC	IL-1 β	0,103	0,050	0,0004	0,365	0,136
	IL-6	26,945	23,775	0,343	56,50	19,086
	IL-15	0,045	0,052	0,014	0,072	0,024
	IL-17A	0,00003	0,00003	0,000	0,0004	0,00001
	TNF- α	0,002	0,002	0,001	0,004	0,001
	TLR-4	0,005	0,004	0,002	0,016	0,005
	MMP-3	61,655	33,35	0,032	231,70	87,024
	MMP-13	0,005	0,002	0,000	0,020	0,008
Sinovial Artrosis Estimulada (+ IL-1β) + secretoma hUCESC	IL-1 β	0,204	0,135	0,0001	0,482	0,181
	IL-6	39,032	30,960	0,023	75,10	25,594
	IL-15	0,031	0,022	0,003	0,078	0,026
	IL-17A	0,00005	0,00004	0,000	0,0002	0,00005
	TNF- α	0,002	0,002	0,0004	0,004	0,001
	TLR-4	0,005	0,003	0,001	0,014	0,004
	MMP-3	35,495	12,250	0,064	234,00	65,839
	MMP-13	0,009	0,002	0,000	0,049	0,014

4.3.2 Estadística inferencial

Antes de comparar los datos, se procedió a comprobar la normalidad de los grupos mediante el Test de Shapiro-Wilk (tabla 20) correspondiente a los dos grupos, observándose que existía una distribución normal (significación estadística en ambos grupos $>0,05$) en los casos de IL-6 (tanto en sinovial normal como en sinovial artrósica) y en IL-15 y TNF- α en el grupo de sinovial normal. Todos los demás factores presentaban una distribución no normal.

Tabla 20. Test de Shapiro-Wilk correspondiente a los dos grupos de ambos tipos de muestras (expresado en Sig.)

MUESTRA	IL-1 β	IL-6	IL-15	IL-17A
Sinovial Normal Estimulada (+ IL-1 β)	0,280	0,984	0,479	0,014
Sinovial Normal Estimulada (+ IL-1 β) + secretoma hUCESC	0,033	0,920	0,262	0,381
Sinovial Artrósica Estimulada (+ IL-1 β)	0,000	0,058	0,031	0,008
Sinovial Artrósica Estimulada (+ IL-1 β) + secretoma hUCESC	0,032	0,152	0,075	0,024

MUESTRA	TNF- α	TLR-4	MMP-3	MMP-13
Sinovial Normal Estimulada (+ IL-1 β)	0,590	0,443	0,246	0,204
Sinovial Normal Estimulada (+ IL-1 β) + secretoma hUCESC	0,758	0,014	0,019	0,002
Sinovial Artrósica Estimulada (+ IL-1 β)	0,008	0,089	0,002	0,323
Sinovial Artrósica Estimulada (+ IL-1 β) + secretoma hUCESC	0,427	0,019	0,000	0,000

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test no paramétrico, prueba de rangos con signo de Wilcoxon, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los grupos de estudio de sinovial normal y sinovial artrósica en IL-1 β , IL-17A, TLR-4, MMP-3 y MMP-13, y en el grupo de sinovial artrósica en IL-15 y TNF- α , comparando los grupos antes y después de ser tratados con secretoma de hUCESC. Se observó que existía una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de IL-15 ($p=0,006$), MMP-3 ($p=0,006$) y MMP-13 ($p=0,012$) entre los fibroblastos de sinovial artrósica antes y después de aplicar el secretoma de hUCESC. Así mismo se observó que existía una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de IL-1 β ($p=0,028$), MMP-3 ($p=0,046$) y MMP-13 ($p=0,028$) entre los fibroblastos de sinovial normal antes y después de aplicar el secretoma de hUCESC. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para el resto de los valores estudiados (tabla 21).

Tabla 21. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon (prueba no paramétrica)
correspondientes a los dos grupos

		PW	Sig.*
IL-1β en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial normal	21,00	0,028
	Sinovial artrosis	51,00	0,347
IL-15 en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial artrosis	4,00	0,006
IL-17A en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial normal	5,00	0,500
	Sinovial artrosis	24,00	0,721
TNF-α en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial artrosis	29,00	0,433
TLR-4 en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial normal	16,00	0,249
	Sinovial artrosis	61,00	0,084
MMP-3 en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial normal	1,00	0,046
	Sinovial artrosis	4,00	0,006
MMP-13 en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial normal	0,00	0,028
	Sinovial artrosis	7,00	0,012

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test paramétrico, prueba de t de Student para muestras emparejadas, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos de sinovial normal y sinovial artrósica en IL-6, y en sinovial normal en IL-15, y TNF- α comparando los grupos antes y después de ser tratados con secretoma. Se obtuvo una t de Student de muestras emparejadas con una significación de $p > 0,05$ en todos los casos estudiados lo que indica que no existían diferencias estadísticamente significativas

en la expresión génica de IL-6 en fibroblastos sinovial normal y artrósica, ni de IL-15 y TNF- α en fibroblastos de sinovial normal. (tabla 22).

Tabla 22. Prueba de t de Student de muestras emparejadas (prueba paramétrica)
correspondientes a los dos grupos

		t	Sig.*
IL-6 en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial normal	0,899	0,410
	Sinovial artrosis	1,183	0,262
IL-15 en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial normal	1,311	0,247
TNF-α en muestras estimuladas, y en estimuladas y tratadas con secretoma	Sinovial normal	2,312	0,069

* significación en nivel 0,05

4.3.3 Representación gráfica de los resultados

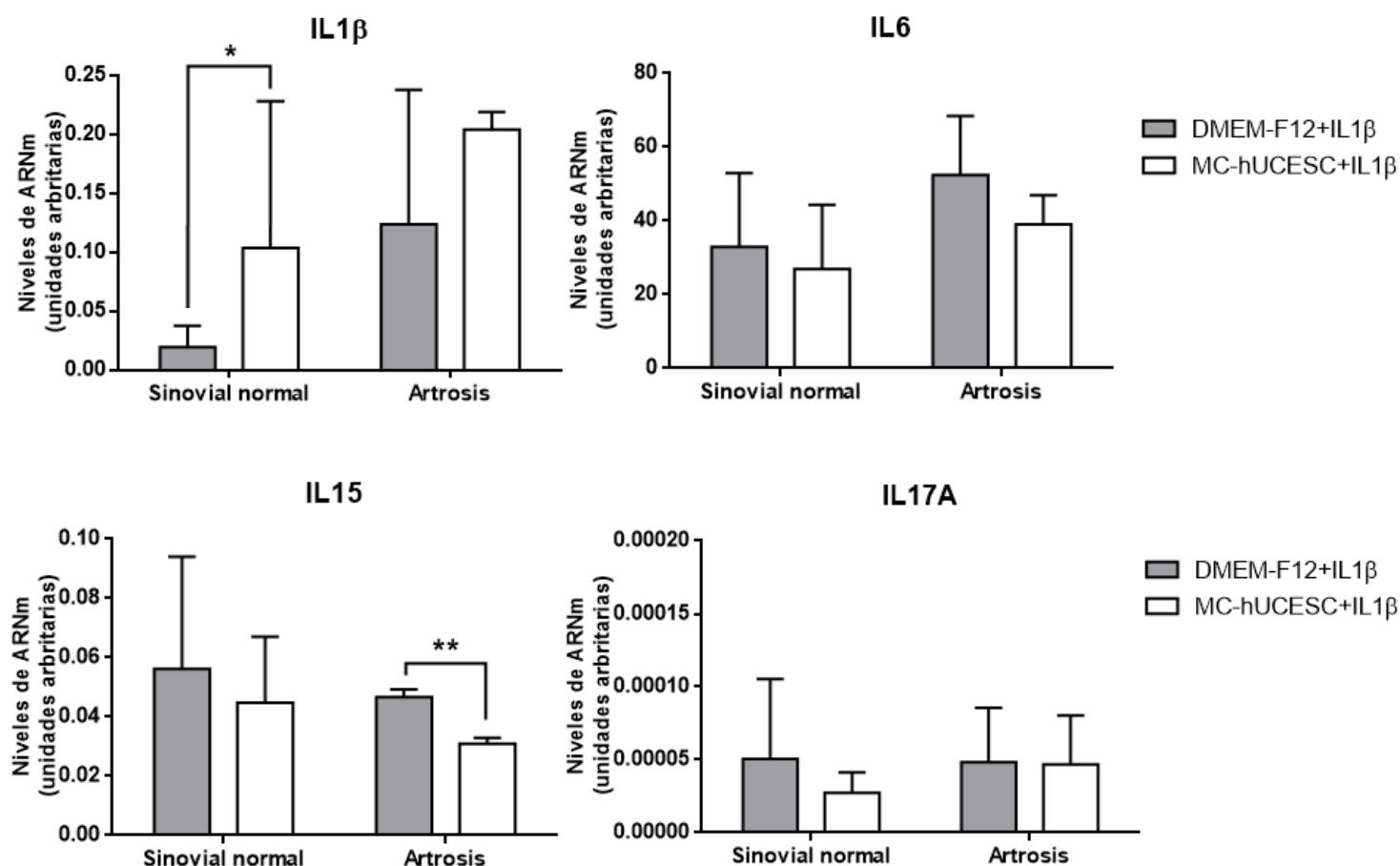


Figura 17: Expresión de IL-1 β , IL-6, IL-15 e IL-17A en ambos grupos de estudio (Sinovial normal y Sinovial artrósica) tras estimulación con IL-1 β , y tras añadir además secretoma de hUCESC. DMEM-F12 + IL-1 β : medio de cultivo tras ser estimulado con IL-1 β para reproducir ambiente inflamatorio; MC-hUCESC + IL-1 β : medio condicionado (secretoma) de hUCESC tras estimular los fibroblastos con IL-1 β .

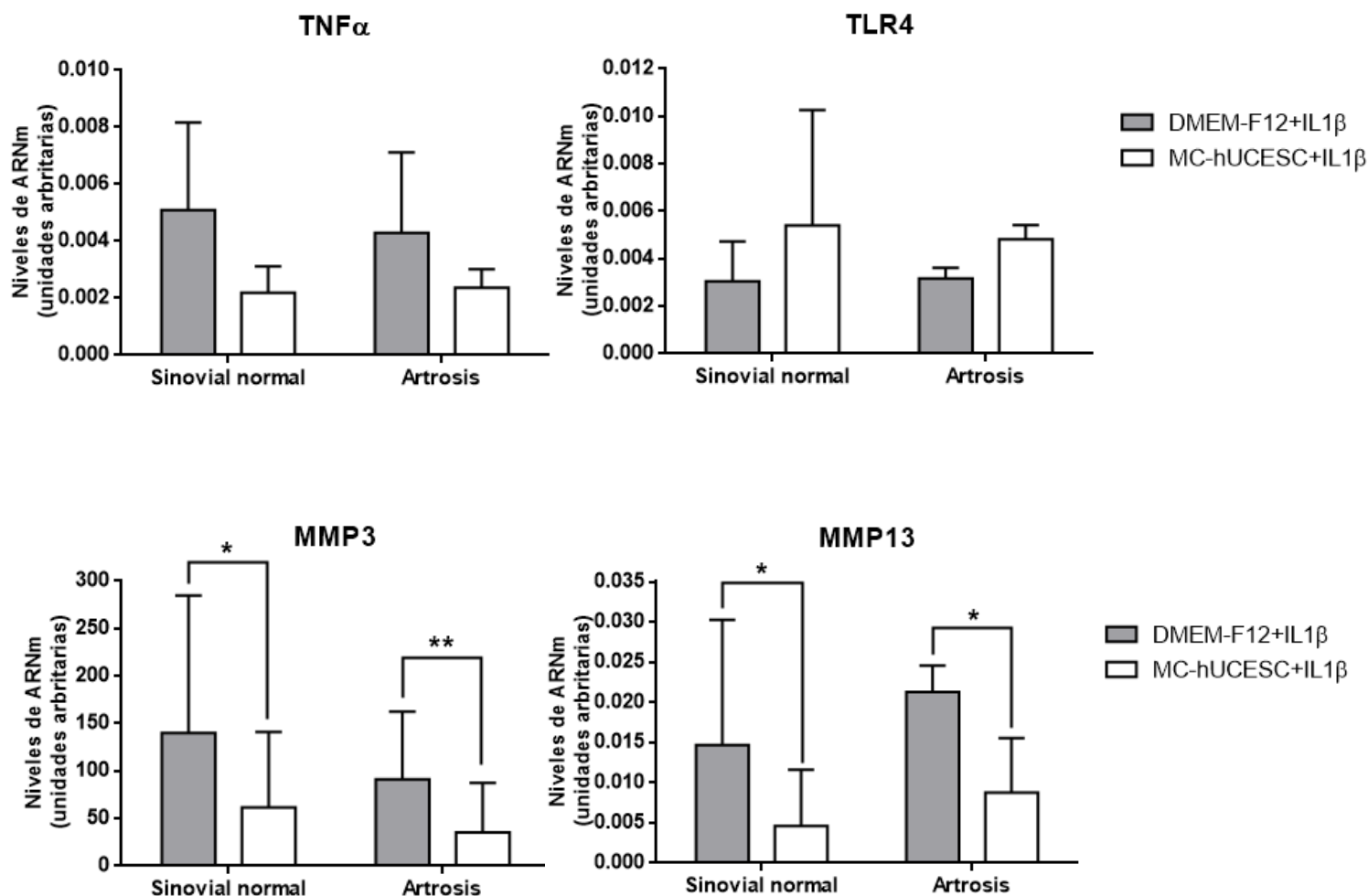


Figura 18: Expresión de $TNF\alpha$, TLR-4, MMP-3 y MMP-13 en ambos grupos de estudio (Sinovial normal y Sinovial artrósica) tras estimulación con IL-1 β , y tras añadir además secretoma de hUCESC. DMEM-F12 + IL-1 β : medio de cultivo tras ser estimulado con IL-1 β para reproducir ambiente inflamatorio; MC-hUCESC + IL-1 β : medio condicionado (secretoma) de hUCESC tras estimular los fibroblastos con IL-1 β .

Al comparar los grupos de sinovial normal y de sinovial artrósica estimulados con IL-1 β con los respectivos grupos una vez añadido el secretoma de hUCESC observamos que la expresión de IL-6 en los fibroblastos disminuyó tras la aplicación del secretoma en ambos grupos de estudio, la expresión de IL-17A en los fibroblastos disminuyó tras la aplicación del secretoma en el grupo de sinovial normal, sin producir apenas cambio en el grupo de sinovial artrósica, la expresión de TNF- α en los fibroblastos disminuyó tras la aplicación del secretoma en ambos grupos de estudio, y la expresión de TLR-4 en los fibroblastos fue mayor tras la aplicación del secretoma en ambos grupos de estudio, si bien en todos estos casos no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figuras 17 y 18).

La expresión de IL-1 β en los fibroblastos era mayor tras la aplicación del secretoma en ambos grupos de estudio, y en este caso sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de sinovial normal ($p=0,028$), no así en la sinovial artrósica (Figura 17).

La expresión de IL-15 en los fibroblastos disminuyó tras la aplicación del secretoma en ambos grupos de estudio, y en este caso sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de sinovial artrósica ($p=0,006$), no así en la sinovial normal (Figura 17).

La expresión tanto de MMP-3 como de MMP-13 en los fibroblastos disminuyó tras la aplicación del secretoma en ambos grupos de estudio, y en este caso sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas en ambos grupos de estudio (MMP-3: SN $p=0,046$; SA $p=0,006$) (MMP-13: SN $p=0,028$; SA $p=0,012$) (Figura 18).

En definitiva, el análisis estadístico muestra que el secretoma de hUCESC provoca una disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión génica de IL-15, MMP-3 y MMP-13 en fibroblastos de muestras activadas con IL-1 β en el caso de sinovial artrósica.

Aunque no se alcanza significación estadística, se observa que el secretoma de hUCESC induce en los fibroblastos de pacientes con artrosis una tendencia hacia la disminución en la expresión de IL-6 y de TNF- α , junto con un aumento en la expresión de TLR-4, y una ausencia de respuesta en IL-17A.

En los fibroblastos de muestras de sinovial normal activados con IL-1 β , se observa una respuesta similar a la de los fibroblastos de sinovial artrósica, excepto en el caso de la IL-15, donde la diferencia no alcanza la significación estadística, y en el caso de la IL-1 β , donde sí que se produce un aumento estadísticamente significativo.

4.4 RESULTADOS DEL OBJETIVO 4

Para evaluar el impacto del secretoma de hUCESC sobre la proliferación de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β , se comparó la proliferación de los fibroblastos de sinovial normal y de sinovial con artrosis estimulados con IL-1 β y tratados con secretoma de hUCESC con el control (fibroblastos de sinovial normal estimulados con IL-1 β). Se muestran los resultados obtenidos:

4.4.1 Estadística descriptiva

En la tabla 23 se recogen los datos característicos obtenidos en la determinación de la proliferación de fibroblastos tras ser estimulados con IL-1 β para cada uno de los grupos.

Tabla 23. Estadística descriptiva de los puntos característicos de los tres grupos

MUESTRA	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Control + IL1 β	100	100	100	100	0,000
Sinovial Normal + IL1 β + secretoma hUCESC	55,22	53,93	52,37	60,67	3,716
Sinovial Artrosis + IL1 β + secretoma hUCESC	50,87	52,25	34,94	63,49	8,564

4.4.2 Estadística inferencial

Antes de comparar los datos, se procedió a comprobar la normalidad de los grupos mediante el Test de Shapiro-Wilk (tabla 24) correspondiente a los dos grupos, observándose que los grupos de estudio de proliferación presentaban una distribución normal (significación estadística $>0,05$), si bien el grupo control no presentaba una distribución normal dado que era un grupo en el que se producía una proliferación del 100%. Es por ello que, al realizarse una comparación entre un grupo sin distribución normal, frente a dos respectivos grupos con distribución normal, el test a emplear debía ser no paramétrico.

Tabla 24. Test de Shapiro-Wilk correspondiente a los dos grupos

MUESTRA	Estadístico	Sig.*
Sinovial Normal + secretoma hUCESC	0,818	0,139
Sinovial Artrosis + Secretoma hUCESC	0,963	0,807

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test no paramétrico, prueba de U de Mann-Whitney, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los grupos de estudio de proliferación. Se observó que existía una diferencia estadísticamente significativa en la proliferación de los fibroblastos sinoviales entre el grupo control y cada uno de los grupos analizados: Sinovial normal ($p= 0,029$) y Sinovial artrósica ($p= 0,000$) (tabla 25).

Tabla 25. Prueba de U de Mann-Whitney (prueba no paramétrica) correspondientes a los dos grupos

	UMW	Sig.*
Control / Sinovial normal	0,000	0,029
Control / Sinovial artrosis	0,000	0,000

* significación en nivel 0,05

4.4.3 Representación gráfica de los resultados

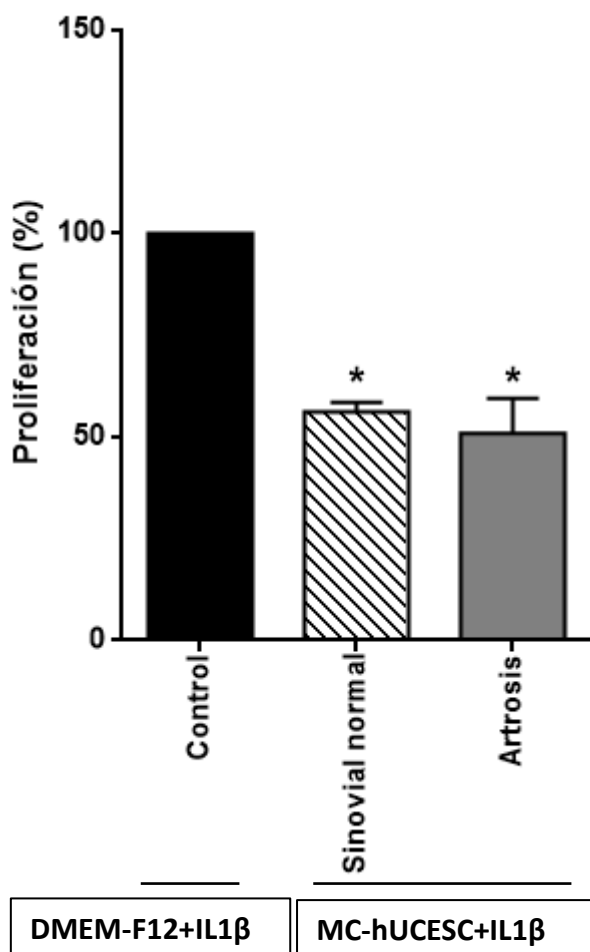


Figura 19. Proliferación relativa de los fibroblastos de sinovial normal y de sinovial artrósica estimulados IL-1 β y tratados con secretoma de hUCESC (MC-hUCESC), con respecto a grupo control (DMEM-F12). * $p < 0,05$. DMEM-F12 + IL-1 β : medio de cultivo tras ser estimulado con IL-1 β para reproducir ambiente inflamatorio; MC-hUCESC + IL-1 β : medio condicionado (secretoma) de hUCESC tras estimular los fibroblastos con IL-1 β .

Al comparar el grupo control (fibroblastos en medio de DMEM-F12 tras ser estimulados con IL-1 β para estimular la proliferación en un ambiente inflamatorio), con los fibroblastos estimulados de ambos grupos (sinovial normal y sinovial artrósica) tras su exposición al secretoma de hUCESC (MC-hUCESC) se observa una diferencia

estadísticamente significativa frente al control tanto en pacientes con sinovial normal ($p=0,029$) como de pacientes con artrosis ($p=0,000$) (Figura 19).

En definitiva, el análisis estadístico evidenció que el secretoma de hUCESC inhibe de forma estadísticamente significativa la proliferación de los fibroblastos estimulados con IL-1 β tanto en pacientes sanos como en pacientes con artrosis. En ambos casos, se observó una reducción de más del 44% en la proliferación de los fibroblastos sinoviales.

4.5 RESULTADOS DEL OBJETIVO 5

Para examinar el efecto del secretoma de hUCESC sobre la capacidad invasiva de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β , se realizaron ensayos de invasión en Matrigel in vitro, y se comparó la capacidad invasiva de fibroblastos sinoviales de pacientes sanos y con artrosis antes y después de ser tratados con secretoma de hUCESC. Se muestran los resultados obtenidos:

4.5.1 Estadística descriptiva

En la tabla 26 se recogen los datos característicos obtenidos en la determinación de la invasión de fibroblastos tras ser estimulados con IL-1 β para cada uno de los grupos.

Tabla 26. Estadística descriptiva de los puntos característicos de los dos grupos

MUESTRA	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Sinovial normal sin secretoma	198,00	201,50	171,00	246,00	22,54
Sinovial normal con secretoma	181,60	179,50	134,00	241,00	29,41
Sinovial artrosis sin secretoma	143,38	125,50	11,00	353,00	69,53
Sinovial artrosis con secretoma	126,88	112,00	40,00	341,00	67,95

4.5.2 Estadística inferencial

Antes de comparar los datos, se procedió a comprobar la normalidad de los grupos mediante el Test de Shapiro-Wilk (tablas 27) correspondiente a los dos grupos, observándose que existe una distribución normal (significación estadística $>0,05$) en el caso del grupo de sinovial normal, mientras que en el de sinovial de artrosis presentaba una distribución no normal.

Tabla 27. Test de Shapiro-Wilk correspondiente a los dos grupos

MUESTRA	Sig.
Sinovial Normal sin secretoma	0,211
Sinovial Normal con secretoma	0,921
Sinovial Artrosis sin secretoma	0,000
Sinovial Artrosis con secretoma	0,000

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test paramétrico, prueba de t de Student para muestras emparejadas, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los grupos de estudio de invasión de Sinovial Normal entre el grupo control y el grupo tras aplicar el secretoma de hUCESC, y se utilizó el test no paramétrico, prueba de rangos con signo de Wilcoxon, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los grupos de estudio de invasión en Sinovial de Artrosis entre el grupo control y el grupo tras aplicar el secretoma de hUCESC. Se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa en el estudio de invasión tanto el grupo de Sinovial normal ($p=0,047$), como en el grupo de Sinovial artrósica ($p= 0,006$) (tablas 28 y 29)

Tabla 28. Prueba de t de Student para muestras emparejadas (prueba paramétrica) correspondientes al grupo de Sinovial Normal.

	t	Sig.*
Sinovial normal: sin secretoma / con secretoma	2,09	0,047

* significación en nivel 0,05

Tabla 29. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon (prueba no paramétrica) correspondiente al grupo de Sinovial Artrósica.

	PW	Sig.*
Sinovial artrosis: sin secretoma / con secretoma	901,50	0,006

* significación en nivel 0,05

4.5.3 Representación gráfica de los resultados

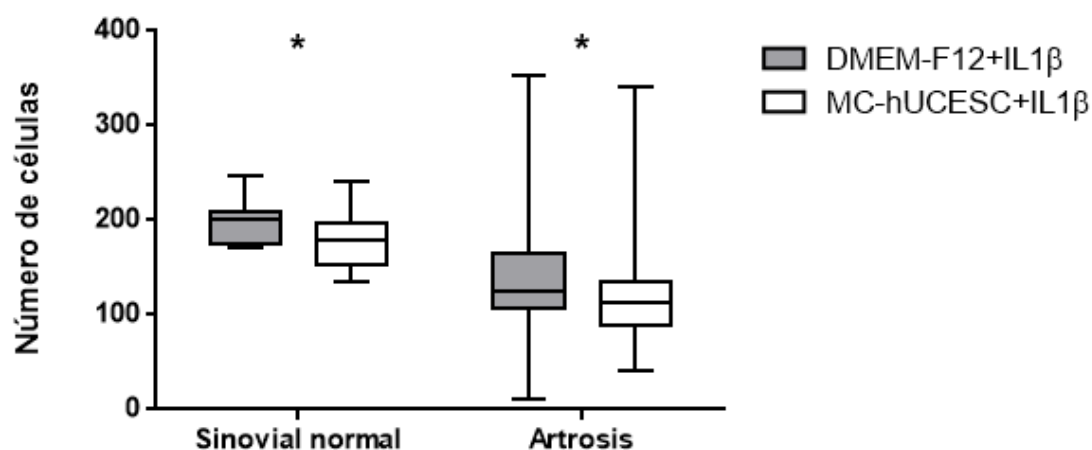


Figura 20. Análisis de la capacidad invasiva de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β en grupos de Sinovial normal y de Sinovial artrósica. Contaje del número de células que atraviesan el Matrigel tras tratamiento o no con secretoma de hUCESC. DMEM-F12 + IL-1 β : medio de cultivo tras ser estimulado con IL-1 β para reproducir ambiente inflamatorio; MC-hUCESC + IL-1 β : medio condicionado (secretoma) de hUCESC tras estimular los fibroblastos con IL-1 β .

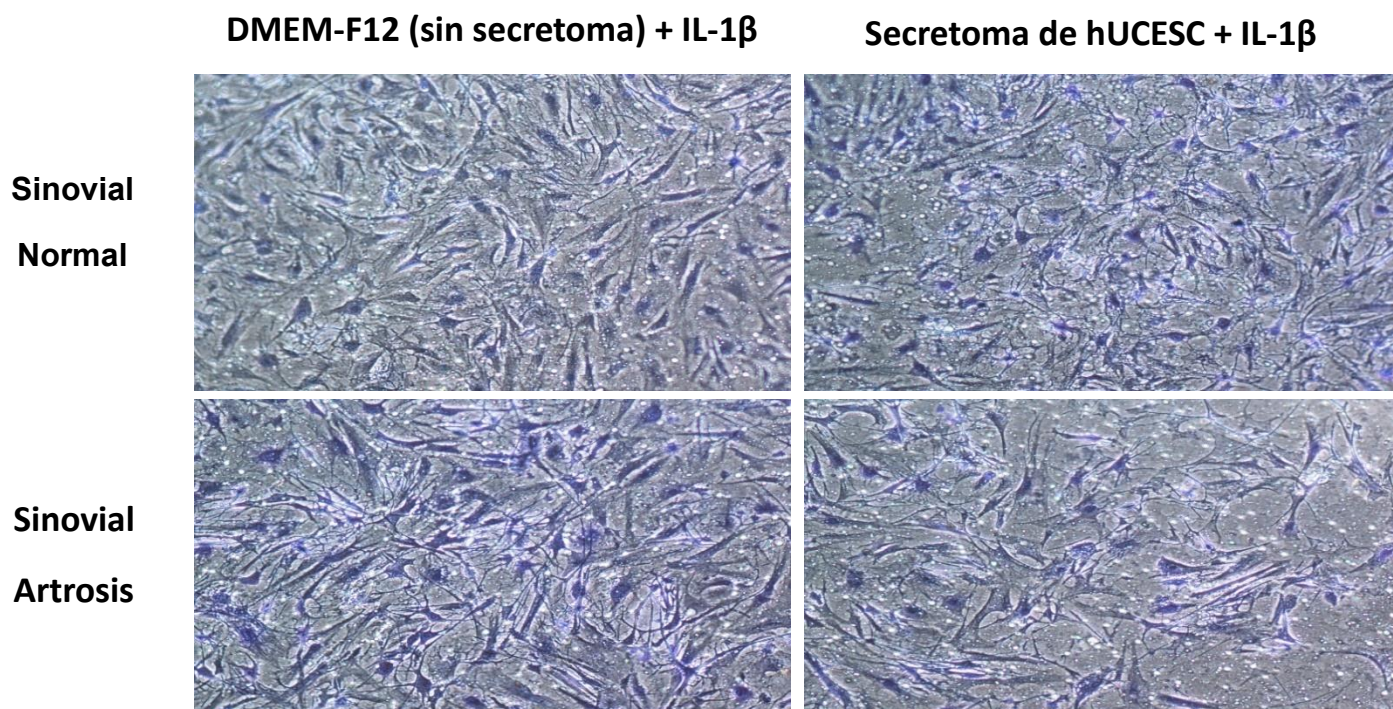


Figura 21. Imagen microscópica de la invasión de los fibroblastos de ambos grupos de estudio (Sinovial Normal y Sinovial Artrósica) en sus grupos control y tras añadir secretoma de hUCESC.

Tras valorar el efecto del secretoma de hUCESC sobre la capacidad invasiva de los fibroblastos sinoviales, se evidenció que el secretoma de hUCESC disminuye de forma estadísticamente significativa la capacidad de invasión de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β tanto en pacientes con sinovial normal ($p=0,049$) como de pacientes con artrosis ($p=0,006$) (Figuras 20 y 21).

4.6 RESULTADOS DEL OBJETIVO 6

Para investigar el efecto de los inhibidores de metaloproteasas TIMP-1 y TIMP-2 sobre la capacidad de invasión de los fibroblastos sinoviales en pacientes sanos y con artrosis se realizaron estudios de inmunoprecipitación de TIMP-1 y TIMP-2 en el secretoma de hUCESC mediante el empleo de anticuerpos anti-TIMP-1 y anti-TIMP-2, utilizando como control un anticuerpo IgG1 sin actividad anti-TIMP. Finalmente, se realizaron ensayos de invasión en Matrigel in vitro de fibroblastos sinoviales tanto de sinovial normal como de sinovial artrósica. Se muestran los resultados obtenidos:

4.6.1 Estadística descriptiva

En la tabla 30 se recogen los datos característicos obtenidos en la determinación de la invasión de fibroblastos tras ser estimulados con IL-1 β para los grupos control secretoma de hUCESC tras aplicar anticuerpos anti-IgG1, y secretoma de hUCESC tras aplicar anticuerpos anti-TIMP-1 y anti-TIMP-2.

Tabla 30. Estadística descriptiva de los puntos característicos de los dos grupos

MUESTRA	Muestras	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar
Secretoma de hUCESC IP IgG1 + IL-1β	Sinovial Normal	248,94	260,00	38,00	454,00	108,11
	Sinovial Artrosis	118,08	101,00	31,00	255,00	65,30
Secretoma de hUCESC IP TIMP 1/2 + IL-1β	Sinovial Normal	317,67	333,00	38,00	782,00	199,15
	Sinovial Artrosis	195,81	179,00	88,00	373,00	78,42

4.6.2 Estadística inferencial

Antes de comparar los datos, se procedió a comprobar la normalidad de los grupos mediante el Test de Shapiro-Wilk (tablas 31) correspondiente a los dos grupos, observándose que existe una distribución normal (significación estadística $>0,05$) en el grupo de Sinovial normal, y una distribución no normal en el grupo de Sinovial artrósica.

Tabla 31. Test de Shapiro-Wilk correspondiente a los dos grupos

MUESTRA	Sig.
Sinovial Normal + Secretoma IP IgG1 (control)	0,247
Sinovial Normal + Secretoma IP TIMP 1/2	0,220
Sinovial Artrosis + Secretoma IP IgG1 (control)	0,027
Sinovial Artrosis + Secretoma IP TIMP 1/2	0,001

* significación en nivel 0,05

Se utilizó el test paramétrico, prueba de t de Student para muestras emparejadas, para determinar diferencias estadísticamente significativas en el grupo de estudio de invasión en Sinovial normal con secretoma de hUCESC y Sinovial normal con secretoma de hUCESC tras aplicar anticuerpos anti-TIMP-1 y anti-TIMP-2 (Tabla 32), y se utilizó el test no paramétrico, prueba de rangos con signo de Wilcoxon, para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el grupo de estudio de invasión en Sinovial artrósica con secretoma de hUCESC y Sinovial artrósica con secretoma de hUCESC tras aplicar anticuerpos anti-TIMP-1 y anti-TIMP-2 (Tabla 33).

Se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa en el estudio de invasión de Sinovial artrósica tras aplicarle anticuerpos anti-TIMP-1 y anti-TIMP-2 ($p=0,000$), pero no se observó una diferencia estadísticamente significativa en el estudio de invasión de Sinovial normal.

Tabla 32. Prueba de t de Student para muestras emparejadas (prueba paramétrica)
correspondiente al grupo de Sinovial Normal

	t	Sig.*
Sinovial normal: Secretoma IP IgG1 (control) / Secretoma IP TIMP1/2	-1,79	0,091

* significación en nivel 0,05

Tabla 33. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon (prueba no paramétrica)
correspondiente al grupo de Sinovial Artrósica

	PW	Sig.*
Sinovial artrosis: Secretoma IP IgG1 (control) / Secretoma IP TIMP1/2	555,50	0,000

* significación en nivel 0,05

4.5.3 Representación gráfica de los resultados

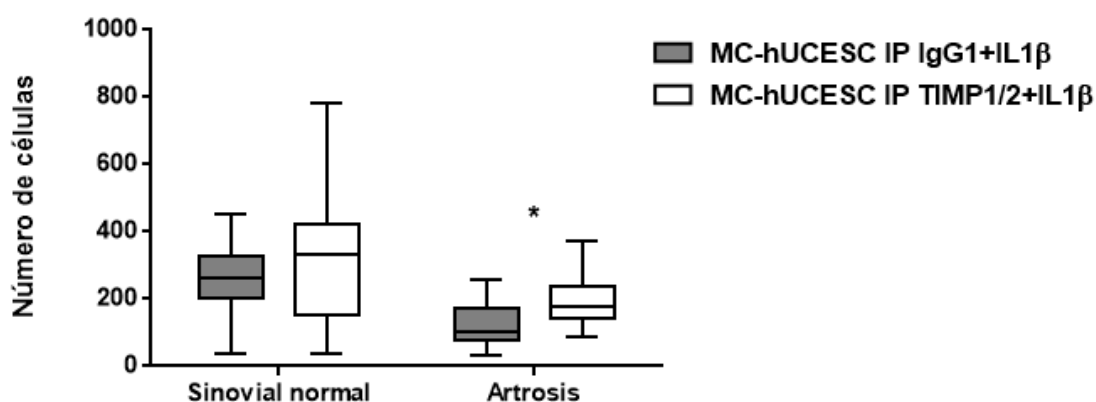


Figura 22: Expresión de invasión en ambos grupos de estudio (Sinovial normal y Sinovial artrósica) en sus respectivos grupos secretoma de hUCESC IP IgG1 con estimulación con IL-1 β y secretoma de hUCESC IP TIMP-1/TIMP-2 con estimulación con IL-1 β . MC-hUCESC IP IgG1 + IL-1 β : medio condicionado (secretoma) de hUCESC tras estimular los fibroblastos con IL-1 β en el que se ha realizado la inmunoprecipitación control con IgG1; MC-hUCESC IP TIMP-1/TIMP-2 + IL-1 β : medio condicionado (secretoma) de hUCESC tras estimular los fibroblastos con IL-1 β en el que se ha realizado la inmunoprecipitación de TIMP-1 y de TIMP-2.

En los distintos grupos de estudio de invasión (objetivo 5) se observó que al comparar las muestras del grupo control (DMEM-F12 + IL1 β) con las muestras con secretoma estimulado (MC-hUCESC + IL-1 β) se produjo una disminución de la invasión de los fibroblastos sinoviales, si bien esta disminución desapareció al aplicar la inmunoprecipitación de TIMP-1 y TIMP-2 presentando una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de sinovial en artrosis ($p=0,000$). (Figura 22)

En definitiva, el análisis estadístico muestra que el bloqueo de los inhibidores de metaloproteasas TIMP-1 y TIMP-2 en el secretoma de hUCESC disminuye de forma estadísticamente significativa el efecto de inhibición de la capacidad de invasión de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β en pacientes con artrosis.

5

Discusión

5.1 DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 1

Los factores relacionados con la inflamación y la destrucción del cartílago evaluados en nuestro estudio se encuentran entre los componentes principales en la fisiopatología de la artrosis. Diversos estudios destacan el impacto de las citocinas inflamatorias en la patogénesis de la artrosis de rodilla. Xiang et al. mencionan la implicación de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-15, IL-17A e IL-18 en este proceso (Xiang et al., 2022). Por su parte, Huang y Mei destacan el papel de las MMP-13 y MMP-3 en la patogenia de la artrosis, centrándose principalmente en la importancia del tejido condral (S. Huang et al., 2017; Mei et al., 2017).

La IL-1 β , TNF- α e IL-6 se encuentran en los tejidos de la articulación artrósica y se consideran factores proalgésicos (Wood et al., 2022). Múltiples estudios han demostrado que la IL-1 β y el TNF- α son capaces de inducir la expresión de enzimas que degradan el cartílago, como las MMPs (van den Bosch et al., 2024). Cheleschi et al. confirmaron un aumento significativo en la producción de IL-1 β , TNF- α , IL-6 y MMP-13 por parte de los fibroblastos sinoviales cuando fueron estimulados con visfatina y resistina, dos adipocinas implicadas en la inflamación y el daño articular asociado con la artrosis (Cheleschi et al., 2019). Asimismo, Harvanova observó un aumento en la producción de IL-1 β , TNF- α , IL-6 y MMP-3 por parte de los fibroblastos sinoviales al ser estimulados principalmente con medio condicionado de membrana sinovial o grasa infrapatelar (Harvanova et al., 2022). Aunque los ensayos clínicos con anticuerpos que neutralizan citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α han sido en gran medida decepcionantes (Persson et al., 2018), la falta de éxito en estas terapias sugiere que la patogénesis de la artrosis es más compleja y multifactorial por lo que es necesario considerar otros mediadores inflamatorios y vías moleculares en el tratamiento de la artrosis (Vincent, 2019). Esto resalta la necesidad de considerar múltiples mediadores y explorar la posibilidad de aplicar terapias que actúen simultáneamente sobre varios agentes implicados.

La IL-17A puede potenciar la producción de IL-1 β , TNF- α , IL-6 y MMPs, creando un circuito de amplificación de la inflamación y la degradación del cartílago (Nejabatbakhsh Samimi et al., 2020). Varios estudios recientes han encontrado niveles

elevados de IL-17 en sangre periférica y en el líquido sinovial durante la artrosis (Faust et al., 2020; Riewruja et al., 2022). Además, la reducción de los niveles de IL-17 se ha asociado con una disminución del dolor y de la destrucción del cartílago (Na et al., 2020). Cabe señalar que, aunque la IL-17 está presente en los fibroblastos sinoviales, su principal fuente son los linfocitos T, que participan activamente en el proceso inflamatorio (Lubberts et al., 2005).

La IL-15 es una citocina que desempeña un papel crucial en la regulación de la respuesta inmunitaria, actuando sobre células T y células Natural Killer (NK). En el contexto de la artrosis, los niveles de IL-15 se encuentran elevados en el líquido sinovial durante las etapas tempranas de la enfermedad, y su concentración se correlaciona con la severidad de las lesiones y la percepción del dolor. La IL-15 puede inducir la secreción de MMPs por las células sinoviales, lo que facilita la descomposición del colágeno y otros componentes del cartílago. Además, la IL-15 regula de manera autocrina y paracrina el entorno inflamatorio en la articulación afectada, interactuando con otras citocinas y contribuyendo al mantenimiento de la inflamación crónica, característica de la progresión de la artrosis (Mukherjee & Das, 2024).

El TLR-4 es un receptor de la inmunidad innata que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos y señales de daño liberados por tejidos lesionados, como los productos de la degradación del cartílago en la artrosis. Su activación en los fibroblastos sinoviales promueve una respuesta inflamatoria que involucra la producción de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β y TNF- α , y MMPs, que contribuyen a la degradación de la matriz extracelular y el cartílago articular. En los fibroblastos sinoviales, la activación de TLR-4 induce la producción de prostaglandina E2 (PGE2), IL-6 y otras moléculas proinflamatorias, agravando la sinovitis y contribuyendo a una sinovial hiperplásica caracterizada por la proliferación anormal de fibroblastos sinoviales y una mayor infiltración de macrófagos activados, que son mediadores clave en la inflamación crónica de la artrosis (Kalaitzoglou et al., 2017).

Los hallazgos de nuestro estudio son coherentes con la literatura existente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los niveles de marcadores obtenidos en nuestras muestras corresponden a fibroblastos sinoviales adultos, que presentan un crecimiento lento en laboratorio y una capacidad limitada para producir los marcadores

estudiados. Por esta razón, fue necesario estimular los fibroblastos con IL-1 β para alcanzar un estado basal activo en condiciones de inflamación. Aun así, resulta valioso comparar los niveles de marcadores inflamatorios y condrolíticos de los fibroblastos sinoviales de pacientes con sinovial normal y de aquellos con artrosis antes de ser estimulados. En estas condiciones iniciales, observamos un aumento notable en la expresión de los niveles de IL-1 β , IL-6, MMP-3 y MMP-13 a favor de la muestra de sinovial artrósica mientras que apenas se detecta presencia de estos marcadores en la sinovial normal. Sin embargo, la cantidad de MMP-13 es muy baja en ambos casos, y sólo se observa una diferencia estadísticamente significativa en el caso de la IL-1 β . En cuanto a IL-15, IL-17A, TNF- α y TLR-4, no se encontraron diferencias significativas, ya que sus valores fueron similares y bajos en ambos grupos.

5.2 DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 2

Después de analizar los marcadores inflamatorios y catabólicos en los fibroblastos en su estado basal de laboratorio, la activación de estos mediante la estimulación con IL-1 β nos proporcionó una perspectiva más detallada de la respuesta de los fibroblastos en un entorno proinflamatorio. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en el grupo de sinovial normal y el de sinovial artrósica tras la estimulación de los fibroblastos.

La estimulación con IL-1 β incrementó de forma estadísticamente significativamente la expresión de IL-6, IL-15, TNF- α y MMP-3 tanto en la sinovial normal como en la artrósica. Además, en la sinovial artrósica, también se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de IL-1 β y MMP-13. Por otro lado, la expresión de TLR-4 disminuyó de manera estadísticamente significativa en ambos grupos, mientras que la expresión de IL-17A no mostró cambios.

La IL-1 β mostraba un patrón similar al observado antes de la activación, con una mayor expresión en el grupo de artrosis, triplicando su expresión tras la estimulación y

sextuplicando los niveles observados en el grupo de sinovial normal. La IL-6 también vio aumentada su expresión en ambos grupos, manteniéndose mayor también tras la estimulación en el grupo de artrosis. La TNF- α , presentó un aumento en ambos grupos cuadruplicando su valor en el grupo patológico y multiplicando por 7 su valor en el grupo de sinovial normal. Sin embargo, el mayor aumento se observó en la estimulación de las muestras con MMPs. La MMP-13 mostró un incremento en ambos grupos, con una respuesta 21 veces mayor en la sinovial artrósica y 150 veces mayor en la sinovial normal. En comparación, la MMP-3 incrementó su expresión 35 veces en la sinovial artrósica y 3330 veces en la sinovial normal. Todo ello nos da una perspectiva coherente con la respuesta de los fibroblastos a la inflamación de la artrosis. (Cheleschi et al., 2019; Harvanova et al., 2022)

En el caso de la IL-15, si bien no presenta tampoco diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio y se observa una leve tendencia a una mayor expresión en la sinovial normal, esta diferencia se atenúa al ser estimulada con IL-1 β , y presenta un aumento de casi 4 veces en la sinovial normal y de más de 5 en la artrósica lo que va en consonancia con el comportamiento esperado (Molnar et al., 2021). A este respecto, Scanzello et al describieron que la IL-15, factor fundamental en la fisiopatología de la artrosis presenta un aumento en las primeras fases de la patología si bien su concentración se ve disminuida a medida que la artrosis entra en su fase más tardía. (Scanzello et al., 2009) El hallazgo de que nuestras muestras de sinovial normal presenten un valor aumentado de IL-15 tanto de base como al ser estimuladas para entrar en un ambiente inflamatorio plantea dos posibilidades. Por una parte, puede hacer deducir que la IL-15 se expresa de forma continua en los fibroblastos sinoviales y que aumenta su expresión como respuesta al estímulo inflamatorio para potenciar la respuesta inflamatoria de la membrana sinovial inicial, quedando su función iniciadora relegada una vez se produce un establecimiento sostenido de una artrosis avanzada. Por otra parte, la respuesta de nuestro estudio podría deberse a que en las muestras de sinovial normal que se tomaron en el momento de una afectación meniscal sin patología artrósica, la propia patología meniscal generara una respuesta inflamatoria leve pero suficiente para activar la expresión de IL-15, si bien esta última posibilidad sería más coherente si se acompañara de un aumento equivalente del resto de marcadores inflamatorios, que por otra parte no se produce.

La respuesta de la estimulación a la IL-17A presente en los fibroblastos es prácticamente nula en ambos grupos de estudio. En nuestro estudio valoramos la posibilidad de obtener una respuesta de esta citocina, la cual encontramos en muy escasa cantidad en nuestros fibroblastos. Tenida cuenta la principal producción de la IL-17 se debe a varias células inmunitarias (Células T CD4⁺ (Th17) y Células T $\gamma\delta$) presentes en el tejido sinovial, el resultado obtenido nos hace deducir que la cantidad presente en los fibroblastos sinoviales presenta una importancia limitada en la fisiopatología artrósica dependiente de la sinovial, por lo que concluimos que la respuesta de esta citocina a un tratamiento no se produciría en los fibroblastos sinoviales y sería interesante valorar la posibilidad de analizar la respuesta del secretoma en las células T. (Faust et al., 2020)

El TLR-4 (Toll-like receptor 4) es un receptor de la familia de los receptores tipo Toll, que pertenece al sistema inmunitario innato. Estos receptores son fundamentales para reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y moléculas de daño endógeno (DAMPs), permitiendo la detección de infecciones y daños celulares. El TLR-4 se encuentra en la membrana plasmática de varias células del sistema inmunitario como macrófagos, células dendríticas y monocitos, así como en algunos otros tipos celulares como fibroblastos sinoviales que pueden responder a la activación del TLR-4, contribuyendo a la inflamación local en enfermedades articulares (Nair et al., 2012).

En nuestro estudio, el nivel de expresión de TLR-4 de los fibroblastos de ambos grupos, sin presentar diferencias estadísticamente significativas, presentó una reducción en su expresión a menos de la mitad de lo obtenido antes de ser estimulados con IL-1 β , si bien se mantuvo una cantidad equivalente en ambos tipos de fibroblastos (sinovial normal y sinovial artrósica). Este receptor actúa potenciando en los fibroblastos la producción de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-6 al ser activados principalmente por moléculas derivadas de la degradación de la MEC como fragmentos de ácido hialurónico de bajo peso molecular (AH-BPM) y tenascina-C actuando como DAMP, o la proteína HMGB1 liberada en el ambiente extracelular cuando hay daño celular en la artrosis. En nuestro estudio no empleamos ninguna de estas sustancias, por lo que concluimos que la estimulación con IL-1 β en los fibroblastos sinoviales tanto normales como artrósicos no afecta al aumento de la expresión de TLR-4.

5.3 DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 3

Tras la aplicación del secretoma de hUCESC en los grupos de estudio, observamos que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de IL-6 y TNF- α . Sin embargo, se detectó una reducción en la expresión de IL-6 y TNF- α en ambos grupos, tanto en el de sinovial normal como en el de sinovial artrósica, lo que coincide con estudios previos sobre el secretoma de hUCESC (F. Vizoso et al., 2017) . Si bien nuestros resultados no presentaron una diferencia estadísticamente significativa siguen la tendencia observada en el trabajo de de Sendon-Lago et al., quienes también observaron una disminución en la expresión de IL-6 y TNF- α al aplicar el secretoma de hUCESC. Sin embargo, mientras que su estudio se centró en el efecto del tratamiento en ratones con colitis inducida, nuestro enfoque se dirigió a su impacto en la sinovial normal y la artrósica. A pesar de las diferencias en el objeto de estudio, los resultados similares refuerzan la eficacia potencial del secretoma de hUCESC en la modulación de mediadores inflamatorios, lo que sugiere que los efectos beneficiosos observados podrían extenderse a diferentes contextos patológicos. Esto no solo valida nuestros hallazgos, sino que también subraya la versatilidad del secretoma de hUCESC como una herramienta terapéutica (Sendon-Lago et al., 2021). Sorprendentemente, la expresión de IL-1 mostró una tendencia al alza en ambos grupos, lo cual contrasta con las expectativas iniciales.

En línea con lo mencionado anteriormente, la respuesta de los fibroblastos al secretoma de hUCESC no mostró una alteración en la expresión de IL-17A, lo cual es coherente con la hipótesis de que la principal producción de esta citocina no depende de los fibroblastos sinoviales (Xiao et al., 2023). Además, la respuesta de la expresión de TLR-4 tras la exposición al secretoma de hUCESC tampoco mostró variaciones significativas.

Por el contrario, el tratamiento con secretoma de hUCESC provocó una disminución significativa en la expresión de IL-15 en ambos grupos de estudio, con una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de sinovial artrósica. Dado que la IL-15 está implicada en la modulación del dolor asociado a la artrosis, este resultado sugiere que el secretoma de hUCESC podría ser una opción terapéutica prometedora para el manejo del dolor en esta patología (Sun et al., 2013). Además, la IL-15 desempeña un papel crucial en la respuesta inflamatoria de la artritis reumatoide (AR), al contribuir a la activación y proliferación de células T, un proceso fundamental en la progresión de la enfermedad. Yang et al. plantean que la inhibición de IL-15 o de su receptor podría reducir la inflamación en pacientes con AR representando una alternativa para aquellos que no responden adecuadamente a tratamientos convencionales, como los inhibidores de TNF- α . Estudios preclínicos respaldan que el uso de antagonistas de IL-15 puede disminuir significativamente la severidad de la AR en modelos animales (Yang et al., 2015). De forma similar, Meghnam et al. destacan la eficacia de bloquear la acción de IL-15 para mitigar la inflamación en enfermedades autoinmunes, incluyendo la AR (Meghnam et al., 2022). En este contexto, la disminución de la expresión de IL-15 en fibroblastos sinoviales observada en nuestro estudio tras la aplicación de secretoma de hUCESC sugiere su potencial como estrategia terapéutica en el tratamiento de la AR.

El efecto más notable en nuestro estudio fue la reducción de la expresión de las metaloproteasas estudiadas, específicamente MMP-3 y MMP-13, en ambos grupos de estudio. Este descenso fue estadísticamente significativo en todos los casos. Las MMPs son agentes clave en la degradación del cartílago durante el desarrollo y la progresión de la artrosis, ya que los productos de degradación del cartílago resultantes estimulan la secreción de otros factores proinflamatorios (Milaras et al., 2021; Mukherjee & Das, 2024). Este resultado refuerza la idea de considerar el secretoma de hUCESC como una posible opción terapéutica para la artrosis.

Nuestros hallazgos coinciden parcialmente con las conclusiones de van Buul et al., siendo este, si no el primero, uno de los primeros estudios en señalar que los factores secretados por las células madre mesenquimales (CMM) generan efectos antiinflamatorios y anticatabólicos en el cartílago y la sinovial artrósica. En su trabajo, estimularon CMM de médula ósea de donantes con TNF- α y aplicaron el medio condicionado obtenido a tejido sinovial de pacientes con artrosis sometidos a la

colocación de prótesis articular. Ellos reportaron una reducción significativa en la secreción de IL-1 β y MMP-13 en el tejido sinovial, aunque no evaluaron el impacto sobre IL-15 ni MMP-3 (van Buul et al., 2012).

5.4 DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 4

La fibrosis de la membrana sinovial es un proceso crucial en la progresión de la artrosis. En particular, la inflamación promueve la proliferación de los fibroblastos sinoviales (FS) y su diferenciación en miofibroblastos, células que son clave en la deposición de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Esto contribuye al engrosamiento y endurecimiento del tejido sinovial. La proliferación de los FS y la posterior fibrosis de la sinovial contribuyen a la rigidez articular y al empeoramiento de los síntomas de la artrosis, como el dolor y la limitación de la movilidad. La acumulación de colágeno y la rigidez del tejido sinovial afectan negativamente la función articular, acelerando la degradación del cartílago. Su et al estudió el papel de FGF10 como un agente anti-fibrótico que inhibe la proliferación de FS inducida por Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), reduciendo la fibrosis sinovial y mejorando los síntomas de la artrosis en modelos animales. (Su et al., 2023)

Wei et al. investigó el papel de TGF- β 1 como un promotor clave de la proliferación de FS, lo que contribuye al aumento de la fibrosis en el tejido sinovial. Este proceso de proliferación y fibrosis limita la movilidad de las articulaciones, asociándose directamente con la rigidez y el dolor articular característicos de la artrosis. Además, la fibrosis exacerbada por TGF- β 1 contribuye a una mayor rigidez articular. En su estudio, evalúa el uso de la pirfenidona, un medicamento con propiedades antiinflamatorias y antifibróticas, conocido por su efectividad en el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. Esta enfermedad causa la cicatrización progresiva del tejido pulmonar, dificultando la respiración. La pirfenidona actúa inhibiendo la síntesis de colágeno y la proliferación de fibroblastos, que son las células responsables de la formación del tejido cicatricial. Su potencial para reducir la fibrosis también ha sido explorado en otros contextos, como la sinovitis crónica asociada a la artrosis, mostrando resultados prometedores en la mejora de la función articular. (Q. Wei et al., 2021)

A partir de los resultados obtenidos sobre el efecto del secretoma de hUCESC en la proliferación de fibroblastos activados, tanto en la sinovial normal como en la artrósica, podemos concluir que este secretoma inhibe de manera notable la proliferación celular. Esto sugiere que el secretoma de hUCESC podría reducir uno de los factores clave en el desarrollo de la fibrosis y la rigidez articular asociadas a la artrosis.

Aunque el secretoma de hUCESC inhibe la proliferación sinovial tanto en el tejido sinovial normal como en el artrósico, esta inhibición en la sinovial normal tiene una importancia limitada, dado que la proliferación en este tejido es poco relevante durante las etapas iniciales de la artrosis. Los efectos patológicos de la proliferación solo se vuelven significativos cuando la artrosis progresa más allá de estas etapas tempranas. Por otro lado, el efecto inhibitorio del secretoma de hUCESC sobre la proliferación de fibroblastos en la sinovial artrósica le confiere un valor terapéutico clave para el manejo y tratamiento de la enfermedad en fases más avanzadas.

5.5 DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 5

Paralelamente a la proliferación de fibroblastos, su capacidad de invasión desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la fibrosis sinovial, lo que contribuye de manera directa a la rigidez articular característica de la artrosis, así como a la destrucción del cartílago articular. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo respaldan el papel del secretoma de hUCESC no solo en inhibición de la proliferación sino también en inhibición de la invasión de los fibroblastos sinoviales en la artrosis.

Wei et al. También estudiaron la importancia de la invasión fibroblástica en la fisiopatología de la fibrosis sinovial y la rigidez articular, al valorar el uso de la pirfenidona, fármaco que actúa inhibiendo la síntesis de colágeno y la proliferación de fibroblastos, que son las células responsables de la formación del tejido cicatricial, y

constató que también obtenía una reducción en la invasión de los fibroblastos en artrosis (Q. Wei et al., 2021).

Basándose en el trabajo de Ding et al. sobre la importancia de la cadherina-11 en la capacidad invasiva de los fibroblastos sinoviales (Ding et al., 2015), Liu et al. destacan en su estudio cómo la inhibición de la cadherina-11 en el tejido sinovial revela el papel crucial de la vía PI3K/Akt en los fibroblastos sinoviales de pacientes con artrosis. Esta vía, a través de la sobreexpresión de cadherina-11, favorece la migración e invasión de los fibroblastos sinoviales, regulando proteínas clave implicadas en la invasión celular, como las MMPs. Además, subraya que la cadherina-11 es esencial para la adhesión celular y facilita la invasión del cartílago por estos fibroblastos. (Liu et al., 2019).

Considerando lo anterior, los resultados de nuestro estudio sugieren varias vías potenciales mediante las cuales el secretoma de hUCESC podría disminuir la invasión de los fibroblastos sinoviales. Una de estas vías podría ser la inhibición de la cadherina-11, un mecanismo que promueve la invasión de fibroblastos y que ha sido señalado en estudios previos (Cao et al., 2020; Liu et al., 2019, 2022).

Un posible mecanismo de acción podría implicar la inhibición de la vía PI3K/AKT, un conocido regulador positivo de la expresión de cadherina-11, por parte del secretoma de hUCESC. En los fibroblastos sinoviales, la activación de la vía PI3K/AKT bajo estímulos como la presión mecánica en la articulación y la presencia de factores inflamatorios incrementa la expresión de cadherina-11 a nivel de ARN y proteína. Este aumento promueve la adhesión celular y la reorganización del citoesqueleto, lo que mejora la capacidad de los fibroblastos para invadir tejidos adyacentes (M. Wu et al., 2013). La inhibición de esta vía por el secretoma de hUCESC podría, por tanto, reducir de forma secundaria la expresión de cadherina-11, disminuyendo así la capacidad invasiva de los fibroblastos sinoviales, lo que coincide con los resultados observados en nuestro estudio.

Por otra parte, la capacidad del secretoma hUCESC para inhibir las MMPs a través de sus inhibidores naturales, TIMP-1 y TIMP-2, ha sido respaldada por investigaciones recientes (Fraile et al., 2022; Sendon-Lago et al., 2019).

Se plantean tres posibles mecanismos para explicar el efecto inhibitorio del secretoma hUCESC sobre la capacidad invasiva de los fibroblastos sinoviales: la regulación de cadherina-11, la modulación de la vía PI3K/AKT y la acción de TIMP-1 y TIMP-2. Dado el conocimiento disponible sobre las características del secretoma de hUCESC, hemos decidido centrar nuestra evaluación en la tercera opción, considerando la inhibición de la actividad invasiva a través de los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP-1/TIMP-2).

5.6 DISCUSIÓN DEL OBJETIVO 6

El ensayo de invasión se realizó sobre Matrigel que presenta una composición con un 60% de laminina, un 30% de colágeno IV y un 8% de entactina. La entactina es una molécula puente que interactúa con la laminina y el colágeno IV y contribuye a la organización estructural de estas moléculas de la matriz extracelular. Las MMPs degradan tanto los colágenos como la laminina, entre otros. Nuestro estudio de valoración de presencia de factores catabólicos en los fibroblastos sinoviales nos demuestra la presencia de un aumento de la expresión en fibroblastos sinoviales estimulados (replicando un ambiente inflamatorio) tanto de MMP-3 y la MMP-13 de una forma estadísticamente significativa, principalmente en sinovial artrósica. Por otra parte, constatamos que el secretoma de hUCESC reduce la expresión de esos dos factores de forma estadísticamente significativa. La literatura nos indica que el secretoma de hUCESC contiene TIMP-1 y TIMP-2.

Los resultados obtenidos en la experimentación con la inmunoprecipitación de TIMP-1 y TIMP-2 muestran que, al bloquear estas proteínas, se anula el efecto del secretoma en la invasión de los fibroblastos, corroborando que el secretoma de hUCESC presenta en su composición dichas proteínas inhibitoras de MMPs ya descrito en los estudios previos (Sendon-Lago et al., 2019). La invasión celular requiere que las células invasoras atraviesen la membrana extracelular (MEC) para migrar hacia otros tejidos. Las MMPs facilitan este proceso al degradar componentes de la MEC, creando un camino por

el cual las células pueden invadir tejidos adyacentes. Tal y como señalan estudios previos, la secreción de MMP-3 y MMP-13 se ve inhibida por TIMP-1 y TIMP-2 (Fraile et al., 2022; Lozito & Tuan, 2011), lo que nos lleva a deducir que el contenido de TIMP-1 y TIMP-2 en el secretoma de hUCESC sea el motivo por el que el secretoma inhibe la secreción de estas MMPs en los fibroblastos sinoviales.

La trascendencia del efecto inhibitor de la invasión de los fibroblastos, así como de su proliferación en artrosis, obtenido con la aplicación del secretoma de hUCESC abre la puerta a su aplicación futura como tratamiento para frenar el proceso de inflamación, rigidez y destrucción condral que empeora la calidad de vida de los pacientes que presentan artrosis. Por otra parte, comprender los mecanismos mediante los cuales el secretoma de células madre actúa a nivel celular facilita una aplicación más fundamentada de sus posibles beneficios terapéuticos.

5.7 DISCUSION GENERAL

Tras el análisis de los resultados obtenidos en nuestro estudio creemos que se puede afirmar que el secretoma de hUCESC presenta capacidad de inhibición de proliferación de fibroblastos activados y de inhibición de invasión de fibroblastos activados en artrosis. Así mismo, presenta actividad inhibitoria de la inflamación sinovial, de la producción de fibrosis sinovial y de la destrucción condral. Podrían por tanto jugar un papel preventivo y terapéutico en la artrosis de rodilla al actuar sobre los fibroblastos sinoviales y sobre los mediadores de la inflamación y de la degradación celular implicados en la fisiopatología de la artrosis.

Durante mucho tiempo, la artrosis se ha entendido como un proceso degenerativo, atribuible principalmente a factores como la edad, los traumatismos o enfermedades reumáticas o infecciosas que comprometen la integridad del cartílago articular. Sin embargo, en la actualidad se reconoce cada vez más el papel crítico de la inflamación recurrente en el desarrollo de esta enfermedad (Knights et al., 2023; Sanchez-Lopez et al., 2022). Este proceso inflamatorio desencadena un ciclo continuo de inflamación, degradación del cartílago y afectación del hueso subcondral, que con el tiempo da lugar a una progresiva destrucción de la arquitectura articular y, consecuentemente, a una limitación funcional y deterioro en la calidad de vida del paciente.

Se ha identificado el tejido sinovial como el principal iniciador y perpetuador de esta inflamación crónica. Además, la fibrosis resultante de la proliferación de fibroblastos sinoviales y la degradación del cartílago, facilitada por la invasión sinovial, contribuyen de manera significativa al deterioro tanto estructural como funcional de la articulación afectada por artrosis.

Este estudio concluye por tanto que el secretoma de hUCESC presenta una potencial triple acción terapéutica frente a la artrosis, con capacidad para inhibir la inflamación, reducir la proliferación de fibroblastos sinoviales y limitar su invasión en el tejido articular.

El uso del secretoma derivado de células madre se encuentra en la vanguardia de la investigación terapéutica para diversas patologías (da Silva et al., 2023; Faria et al., 2023; Joshi et al., 2023; Margiana et al., 2024; Partan et al., 2023; Trigo et al., 2024).

En el caso de la artrosis, el tratamiento con células madre se ha propuesto como una alternativa terapéutica prometedora (Giorgino et al., 2023; R. Huang et al., 2020; Shang et al., 2023; Tan et al., 2024). Este enfoque tiene el objetivo de frenar la progresión de la artrosis y mitigar la limitación funcional que provoca, lo cual representa una transformación en el paradigma del tratamiento convencional. Tradicionalmente, el manejo de la artrosis se ha centrado en el control de los síntomas a medida que estos se presentan, recurriendo eventualmente a la resección del tejido articular dañado y su reemplazo con una prótesis biocompatible. Sin embargo, la protetización implica la pérdida irreversible de la articulación natural, lo que compromete la posibilidad de recuperar una función fisiológica plena. Aunque las prótesis suelen aliviar los síntomas y restaurar parcialmente la mecánica articular, la intervención no está exenta de complicaciones, incluyendo el riesgo de alteraciones biomecánicas que limitan el rango de movimiento, inestabilidad protésica por desgaste del tejido óseo circundante y la necesidad eventual de reemplazos adicionales. Asimismo, la posibilidad de infección protésica representa un riesgo significativo que conlleva un tratamiento complejo y prolongado.

Ante estas limitaciones, la medicina regenerativa ha emergido como un cambio de paradigma en el tratamiento de las enfermedades degenerativas articulares. Aunque aún se encuentra en etapas iniciales de desarrollo, este enfoque terapéutico biológico busca no solo el alivio de los síntomas, sino la interrupción de los mecanismos patogénicos subyacentes, ofreciendo una alternativa más conservadora y favorable para la biología del paciente.

En nuestro estudio, nos centramos en uno de los tres tejidos clave en la patogénesis de la artrosis. Aunque el tejido sinovial desempeña un rol principal en la inflamación asociada a esta patología, tanto el cartílago articular como el hueso subcondral son componentes críticos en su desarrollo. La degradación progresiva y exposición del cartílago, junto con la formación de osteofitos en el hueso subcondral, contribuyen significativamente a la pérdida de movilidad articular y al deterioro funcional. Esta

limitación en la movilidad se agrava por la rigidez generada a través de la fibrosis promovida por los fibroblastos sinoviales. Nuestro estudio del efecto del secretoma se ha centrado solamente en el tejido sinovial, pero deja una vía abierta al estudio de su efecto en el cartílago y el hueso subcondral, áreas de interés complementarias al análisis desarrollado en esta tesis.

La degradación del cartílago articular, facilitada por la acción de MMPs presentes en la articulación artrósica, constituye una diana potencial para la intervención con secretoma de hUCESC. Los hallazgos de este estudio demuestran la capacidad del secretoma para inhibir la secreción de MMPs, lo que sugiere una prometedora vía para el control de la degradación del cartílago en la artrosis.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo y considerando el potencial efecto terapéutico del secretoma de hUCESC sobre los fibroblastos, es relevante explorar otras posibles aplicaciones del secretoma en patologías del sistema musculoesquelético. En particular, dado el efecto antitumoral documentado del secretoma de hUCESC en estudios previos (Eiró et al., 2014), los sarcomas de partes blandas representan una interesante línea de investigación, ya que en ellos los Fibroblastos Asociados al Cáncer (CAF) están directamente implicados en un mal pronóstico (Umakoshi et al., 2024). Esto sugiere que el secretoma podría tener un rol potencial como tratamiento coadyuvante en este tipo de tumores.

5.7 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

A la vista de los resultados obtenidos, el uso del secretoma de células madre de cérvix uterino humano (hUCESC) presenta un gran potencial terapéutico en el tratamiento de la artrosis, así como una serie de ventajas en su aplicación frente a otros tratamientos de células madre en términos de seguridad inmunológica al tratarse de un tratamiento alogénico, pero sin exposición a la inmunidad celular.

Sin embargo, hemos detectado las siguientes limitaciones en este trabajo de tesis doctoral:

- En este estudio, se utilizaron fibroblastos sinoviales humanos provenientes de pacientes adultos, la mayoría de los cuales presentaban artrosis avanzada. Estos casos fueron más prevalentes en pacientes mayores de 60 años, lo que resultó en que muchas muestras, aunque inicialmente viables en cultivo, fueran finalmente descartadas debido a una proliferación celular muy lenta o a una disminución progresiva de la misma por senescencia. Del mismo modo, en fibroblastos sinoviales de tejido sinovial normal, obtenidos principalmente de pacientes más jóvenes, también se observó un porcentaje significativo de muestras con crecimiento celular reducido, lo cual nos llevó a su exclusión del estudio. Aunque consideramos que el uso de fibroblastos sinoviales obtenidos directamente de donantes permitiría obtener resultados más representativos y aplicables a la población general, la utilización de líneas celulares de laboratorio podría haber mitigado algunas de las dificultades técnicas encontradas.
- Para identificar a los pacientes tratados mediante artroscopia que participarían en el estudio, se utilizó la escala de Outerbridge. Reconocemos que la escala de Outerbridge presenta limitaciones, incluyendo variaciones en la interpretación entre diferentes observadores y en el mismo observador. Aunque no existe un sistema de clasificación de la artrosis que supere la precisión de un estudio histológico, este procedimiento no era ético emplearlo en los pacientes sometidos a artroscopia. Por otro lado, aunque las escalas radiológicas disponibles en la literatura son más comúnmente utilizadas, también presentan limitaciones en

cuanto a la concordancia diagnóstica, que en algunos casos podrían imponer restricciones aún mayores que las observadas con la escala empleada en nuestro estudio.

- En el análisis por qPCR, se evaluaron varios marcadores inflamatorios comúnmente reconocidos en la literatura por su relevancia en la fisiopatología de la artrosis. Sin embargo, debido a limitaciones presupuestarias, no fue posible incluir otros marcadores igualmente importantes, como IL-8, IL-18 y IFN- γ , que también han sido relacionados como relevantes en el contexto de la artrosis.
- El estudio se centró en las células más abundantes de la sinovial, los fibroblastos sinoviales, debido a su papel en la fisiopatología de la artrosis. No obstante, reconocemos la importancia de otras células menos frecuentes en la sinovial, como los macrófagos y los linfocitos T, que desempeñan un papel crucial en la progresión de la enfermedad. El estudio adicional de estas células podría proporcionar una visión más completa sobre el potencial terapéutico del secretoma evaluado en el tratamiento de la artrosis.

5. 8 FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN

- Estudiar el efecto del secretoma de hUCESC en distintos estadios de artrosis, estratificando entre una fase inicial, una intermedia y una avanzada. De esta forma conocer en qué momento de la evolución de la enfermedad el tratamiento es más efectivo y evitar aplicarlo en fases en que no responda suficientemente.
- Evaluar el efecto del secretoma de hUCESC en otros marcadores inflamatorios como IL-8, IL-18 e IFN γ , reconocidos factores implicados en la fisiopatología de la artrosis.
- Estudiar el efecto del secretoma de hUCESC sobre las células inmunitarias presentes en el tejido sinovial durante la artrosis (macrófagos y linfocitos sinoviales).
- Estudiar el efecto del secretoma de hUCESC en artrosis in vivo en un modelo animal.
- Estudiar el efecto de secretoma de hUCESC en un modelo de Artritis Reumatoide (AR). Conocida la capacidad de inhibición del secretoma observado sobre la IL-15, citocina de reconocida importancia en la fisiopatología de la AR, poder plantear una línea terapéutica complementaria al tratamiento de AR actual.
- Investigar el efecto del secretoma de hUCESC en patologías tumorales del aparato locomotor, particularmente en sarcomas de partes blandas, donde los Fibroblastos Asociados a Cáncer desempeñan un papel significativo en la patogenia.

Conclusiones

1. Los fibroblastos sinoviales de pacientes con artrosis presentan una diferencia estadísticamente significativa comparado con los fibroblastos sinoviales de pacientes sanos en la expresión de IL-1 β , siendo mayor en artrosis. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de IL-6, IL-15, de IL-17A, TNF- α , TLR-4, MMP-3 y MMP-13.
2. Tras la estimulación con IL-1 β , se observa un incremento estadísticamente significativo en la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-15, TNF- α , MMP-3 y MMP-13 en los fibroblastos sinoviales de pacientes con artrosis, un incremento en la expresión de IL-6, IL-15, TNF- α y MMP-3 en los fibroblastos sinoviales de pacientes sanos, y una reducción estadísticamente significativa en la expresión de TLR-4 tanto en pacientes sanos como en pacientes con artrosis.
3. El secretoma de hUCESC provoca una disminución estadísticamente significativa en la expresión de la citocina proinflamatoria IL-15, y de las metaloproteasas destructoras de cartílago MMP-3 y MMP-13 en los fibroblastos de pacientes con artrosis.
4. El secretoma de hUCESC inhibe de forma estadísticamente significativa la proliferación de los fibroblastos estimulados con IL-1 β , tanto en pacientes sanos como en pacientes con artrosis.
5. El secretoma de hUCESC disminuye de forma estadísticamente significativa la capacidad invasiva de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β , tanto en pacientes sanos como en pacientes con artrosis.
6. El bloqueo de los inhibidores de metaloproteasas TIMP-1 y TIMP-2 en el secretoma de hUCESC disminuye de forma estadísticamente significativa el efecto de inhibición de la capacidad invasión de los fibroblastos sinoviales estimulados con IL-1 β , tanto en pacientes sanos como en pacientes con artrosis, actuando como parte del mecanismo de acción del secretoma.

7

Anexos

ANEXO 1

DOCUMENTO INFORMADO DE TOMA DE MUESTRA SINOVIAL

NHC:

Nombre:

D.N.I.:

N.S.S.:

Este documento sirve para que usted, o quien le represente, dé su consentimiento para participar en el estudio de investigación titulado: "Efecto de las células madre mesenquimales del cérvix uterino sobre el comportamiento de los fibroblastos asociados a las artropatías en articulaciones sinoviales", englobado en el proyecto de investigación "Estudio preclínico de la potencialidad terapéutica de las células madre mesenquimales de cérvix uterino", cuyo investigador principal es el Dr. Francisco José Vizoso Piñeiro de la Fundación Hospital de Jove, y que consiste en investigar aspectos importantes sobre el comportamiento de los fibroblastos articulares en las artropatías inflamatorias y degenerativas. Usted ha sido diagnosticado/a de una patología articular, y próximamente se someterá a una intervención quirúrgica por ese motivo en el Hospital de Jove. Esa intervención consistirá en una artroscopia, o un reemplazo articular. A usted se le ha facilitado información sobre el procedimiento quirúrgico y habrá tenido que firmar un consentimiento informado. Ahora, mediante este documento nosotros le informamos acerca de la naturaleza y objetivos de la investigación que pretendemos llevar a cabo con una muestra del tejido sinovial de la articulación a intervenir si usted finalmente nos lo autoriza mediante su firma.

El proyecto está aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias y por la Comisión de Investigación de la Fundación Hospital de Jove.

De su rechazo no se derivará ninguna consecuencia adversa respecto a la calidad del resto de la atención recibida.

El hecho de firmarlo ahora no le obliga a usted a participar en el estudio de investigación anteriormente citado. Puede usted retirar este consentimiento cuando lo desee.

Antes de firmar, es importante que lea despacio la información siguiente. **Díganos si tiene alguna duda o necesita más información.** Le atenderemos con mucho gusto.

INFORMACIÓN

Destino de las muestras de tejido obtenidas en la intervención quirúrgica

Los tejidos que se extirpan (tejido sinovial) se desechan en su mayor parte y son en ocasiones analizados en el Servicio de Anatomía Patológica de cara a obtener información adicional de la artropatía que presenta que oriente hacia la conveniencia y/o tipo de tratamiento complementario a la cirugía. Para estos análisis se utiliza una parte de los tejidos obtenidos en el acto quirúrgico. La parte restante se elimina o se almacena en el mismo laboratorio.

Naturaleza de la investigación

Lo que le solicitamos es utilizar una pequeña parte de los tejidos extirpados para realizar en ella investigaciones que nos ayuden a comprender el papel que desempeñan los fibroblastos que están relacionadas con la artropatía que causa la dolencia.

INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO "EFECTO DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL CÉRVIX UTERINO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A LAS ARTROPATÍAS EN ARTICULACIONES SINOVIALES"

NHC:

Nombre:

D.N.I.:

N.S.S.:

Ahora lo que pretendemos en esta investigación es determinar las características de los fibroblastos que participan en las patologías articulares, a partir de la muestra de tejido sobrante y estudiar la respuesta de los mismos frente a células madre mesenquimales del cérvix uterino y sus derivados en terapias anti-inflamatorias y regenerativas.

Confidencialidad

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos de los pacientes incluidos en el estudio, solo tendrán acceso a los mismos el investigador y su equipo de colaboradores, así como las autoridades sanitarias y/o miembros del Comité Ético de Investigación Clínica. El tratamiento de los datos de carácter personal requeridos en este estudio se tratará de acuerdo con la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de los datos personales, y a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y su normativa de desarrollo, entre la que se encuentra el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal.

Costes / Compensación

Ninguno de estos procedimientos supondrá un coste o molestia adicional a lo ya mencionado.

**NHC:**

Nombre:

D.N.I.:

N.S.S.:

CONSENTIMIENTO INFORMADO**Datos del representante legal (si es necesario)**

Nombre y apellidos:

Carácter con el que interviene (padre, madre, tutor, etc.):

DNI:

Datos del profesional que interviene en el proceso de información y/o consentimiento

Nombre y apellidos:

Consentimiento

Manifiesto que: he sido informado/a por el médico, de la naturaleza de la investigación que se pretende realizar con una muestra de tejido sinovial de mi articulación, doy mi consentimiento para que la muestra sobrante del tejido sinovial extraído en la intervención quirúrgica y que no se utilizará para el diagnóstico anatomopatológico, en vez de ser destruido pueda ser utilizadas para la investigación que se indica en este documento, he leído y comprendido la información anterior, he podido preguntar y aclarar todas mis dudas, estoy satisfecho/a con la información recibida y sé que puedo retirar mi consentimiento cuando lo estime oportuno.

Por eso he tomado consciente y libremente la decisión de autorizarla.

En Jove a, _____ de _____ de _____

Firma del paciente / Representante Legal

Firma del Profesional

Revocación

Yo, D/Dña , _____ de forma libre y consciente he decidido retirar el consentimiento para que con mi muestra del tejido sinovial se continúe con el procedimiento del que se me ha informado, que doy en esta fecha por finalizado

En Jove a, _____ de _____ de _____

Firma del paciente / Representante Legal

Firma del Profesional

INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO "EFECTO DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DEL CÉRVIX UTERINO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LOS FIBROBLASTOS ASOCIADOS A LAS ARTROPATÍAS EN ARTICULACIONES SINOVIALES"

8

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff, B., & Caldera, F. E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 104, Issue 2, pp. 293–311). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>
- Aguado, H. J., Castellón-Bernal, P., Teixidor-Serra, J., García-Sánchez, Y., Muñoz-Vives, J. M., Camacho-Carrasco, P., Jornet-Gibert, M., Ojeda-Thies, C., García-Portabella, P., Pereda-Manso, A., Mateos-Álvarez, E., Manzano-Mozo, J., Carrillo-Gómez, R., País-Ortega, S., García-Virto, V., Noriega-González, D., Álvarez-Ramos, B. A., Ganso-Pérez, A., Cervera-Díaz, C., ... Villarreal, J. P. (2024). Optimizing periprosthetic fracture management and in-hospital outcome: insights from the PIPPAS multicentric study of 1387 cases in Spain. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s10195-024-00746-6>
- Allen, K. D., Thoma, L. M., & Golightly, Y. M. (2022). Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(2), 184–195. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.04.020>
- Aoyama, T., Goto, K., Kakinoki, R., Ikeguchi, R., Ueda, M., Kasai, Y., Maekawa, T., Tada, H., Teramukai, S., Nakamura, T., & Toguchida, J. (2014). An Exploratory Clinical Trial for Idiopathic Osteonecrosis of Femoral Head by Cultured Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Augmented with Vascularized Bone Grafts. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 00(00), 1–10. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0090>
- Ardanaz, N., Vázquez, F. J., Romero, A., Remacha, A. R., Barrachina, L., Sanz, A., Ranera, B., Vitoria, A., Albareda, J., Prades, M., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., & Rodellar, C. (2016). Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0692-x>
- Atukorala, I., Kwoh, C. K., Guermazi, A., Roemer, F. W., Boudreau, R. M., Hannon, M. J., & Hunter, D. J. (2016). Synovitis in knee osteoarthritis: A precursor of disease? *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(2), 390–395. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205894>
- Bannuru, R. R., Osani, M. C., Vaysbrot, E. E., Arden, N. K., Bennell, K., Bierma-Zeinstra, S. M. A., Kraus, V. B., Lohmander, L. S., Abbott, J. H., Bhandari, M., Blanco, F. J., Espinosa, R., Haugen, I. K., Lin, J., Mandl, L. A., Moilanen, E., Nakamura, N., Snyder-Mackler, L., Trojan, T., ... McAlindon, T. E. (2019). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(11), 1578–1589. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.06.011>
- Barrachina, L., Remacha, A. R., Romero, A., Vázquez, F. J., Albareda, J., Prades, M., Gosálvez, J., Roy, R., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., & Rodellar, C. (2017). Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation–Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential. *Stem Cells and Development*, 26(1), 15–24. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0209>

- Barrachina, L., Remacha, A. R., Romero, A., Vázquez, F. J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., & Rodellar, C. (2016). Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 171, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.007>
- Benito, M. J., Veale, D. J., Fitzgerald, O., Van Den Berg, W. B., & Bresnihan, B. (2005). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(9), 1263–1267. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.025270>
- Bermudez, M. A., Sendon-Lago, J., Eiro, N., Trevino, M., Gonzalez, F., Yebra-Pimentel, E., Giraldez, M. J., Macia, M., Lamelas, M. L., Saa, J., Vizoso, F., & Perez-Fernandez, R. (2015). Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(2), 983–992. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15859>
- Bermudez, M., Sendon-Lago, J., Seoane, S., Eiro, N., Gonzalez, F., Saa, J., Vizoso, F., & Perez-Fernandez, R. (2016). Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Exp Eye Res.*, 149, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.06.022>
- Blanco, F. J., Silva-Díaz, M., Quevedo Vila, V., Seoane-Mato, D., Pérez Ruiz, F., Juan-Mas, A., Pego-Reigosa, J. M., Narváez, J., Quilis, N., Cortés, R., Romero Pérez, A., Fábregas Canales, D., Font Gayá, T., Bordoy Ferrer, C., Sánchez-Piedra, C., Díaz-González, F., & Bustabad-Reyes, S. (2021). Prevalencia de artrosis sintomática en España: Estudio EPISER2016. *Reumatología Clínica*, 17(8), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2020.01.008>
- Cao, C., Wu, F., Niu, X., Hu, X., Cheng, J., Zhang, Y., Li, C., Duan, X., Fu, X., Zhang, J., Zhang, X., & Ao, Y. (2020). Cadherin-11 cooperates with inflammatory factors to promote the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes in pigmented villonodular synovitis. *Theranostics*, 10(23), 10573–10588. <https://doi.org/10.7150/thno.48666>
- Caseiro, A. R., Pereira, T., Ivanova, G., Luís, A. L., & Maurício, A. C. (2016). Neuromuscular Regeneration: Perspective on the Application of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretion Products. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9756973>
- Centeno, C. J., Busse, D., Kisiday, J., Keohan, C., Freeman, M., & Karli, D. (2008a). Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells, platelet lysate and dexamethasone. *Med Sci Monit Basic Res*, 9, 246–251.
- Centeno, C. J., Busse, D., Kisiday, J., Keohan, C., Freeman, M., & Karli, D. (2008b). Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells. *Medical Hypotheses*, 71(6), 900–908. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.06.042>
- Centeno, C., Schultz, J., Cheever, M., Freeman, M., Faulkner, S., Robinson, B., & Hanson, R. (2011). Safety and complications reporting update on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Curr Stem Cell Res Ther*, 6(4), 368–378.
- Cheleschi, S., Gallo, I., Barbarino, M., Giannotti, S., Mondanelli, N., Giordano, A., Tenti, S., & Fioravanti, A. (2019). Microrna mediate visfatin and resistin induction of

- oxidative stress in human osteoarthritic synovial fibroblasts via nf-kb pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205200>
- Costa, L. A., Eiro, N., Fraile, M., Gonzalez, L. O., Saá, J., Garcia-Portabella, P., Vega, B., Schneider, J., & Vizoso, F. J. (2021). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 78, Issue 2, pp. 447–467). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0>
- Costa, L. A., Eiro, N., Vaca, A., & Vizoso, F. J. (2023). Towards a New Concept of Regenerative Endodontics Based on Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretomes Products. In *Bioengineering* (Vol. 10, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10010004>
- da Silva, A. V., Serrenho, I., Araújo, B., Carvalho, A. M., & Baltazar, G. (2023). Secretome as a Tool to Treat Neurological Conditions: Are We Ready? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 22). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms242216544>
- Dallari, D., Savarino, L., Stagni, C., Cenni, E., Cenacchi, A., Fornasari, P. M., Albinini, U., Rimondi, E., Baldini, N., & Giunti, A. (2007). Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am.*, 89(11), 2413–2420. <https://doi.org/10.2106/JBJS.F.01026>
- Davatchi, F., Sadeghi Abdollahi, B., Mohyeddin, M., & Nikbin, B. (2016). Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis: 5 years follow-up of three patients. *Int J Rheum Dis.*, 19(3), 219–225. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12670>
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., & Luyten, F. P. (2001). Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. *Arthritis & Rheumatism*, 44(8), 1928–1942. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200108\)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P)
- De Bari, C., Dell'Accio, F., & Luyten, F. P. (2001). Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis and Rheumatism*, 44(1), 85–95. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200101\)44:1<85::AID-ANR12>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200101)44:1<85::AID-ANR12>3.0.CO;2-6)
- De Ugarte, D. A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., Hedrick, M. H., & Fraser, J. K. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters*, 89(2–3), 267–270. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(03\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(03)00108-1)
- De Ugarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Zhu, M., Dragoo, J. L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., & Hedrick, M. H. (2003). Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174(3), 101–109. <https://doi.org/10.1159/000071150>
- de Windt, T., Vonk, L., Slaper-Cortenbach, I., van den Broek, M., Nizak, R., van Rijen, M., de Weger, R., Dhert, W., & Saris, D. (2017). Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cartilage Regeneration and Are Safe for Single-Stage Cartilage Repair in Humans upon Mixture with Recycled Autologous Chondrons. *Stem Cells.*, 35(1), 256–264. <https://doi.org/10.1002/stem.2475>

- Deans, R. J., & Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.*, 28(8), 875–884. [https://doi.org/S0301-472X\(00\)00482-3](https://doi.org/S0301-472X(00)00482-3) [pii]
- Delorme, B., Nivet, E., Gaillard, J., Häupl, T., Ringe, J., Devèze, A., Magnan, J., Sohler, J., Khrestchatisky, M., Roman, F. S., Charbord, P., Sensebé, L., Layrolle, P., & Féron, F. (2010). The Human Nose Harbors a Niche of Olfactory Ectomesenchymal Stem Cells Displaying Neurogenic and Osteogenic Properties. *Stem Cells and Development*, 19(6), 853–866. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0267>
- Diekman, B. O., Wu, C. L., Louer, C. R., Furman, B. D., Huebner, J. L., Kraus, V. B., Olson, S. A., & Guilak, F. (2013). Intra-articular delivery of purified mesenchymal stem cells from C57Bl/6 or MRL/MpJ superhealer mice prevents posttraumatic arthritis. *Cell Transplantation*, 22(8), 1395–1408. <https://doi.org/10.3727/096368912X653264>
- Ding, X., Zhang, Y., Huang, Y., Liu, S., Lu, H., & Sun, T. (2015). Cadherin-11 involves in synovitis and increases the migratory and invasive capacity of fibroblast-like synoviocytes of osteoarthritis. *International Immunopharmacology*, 26(1), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.024>
- Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W., & Schieker, M. (2007). Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: Surface characteristics and the integrin system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(1), 21–38. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00001.x>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dragoo, J., Carlson, G., McCormick, F., Khan-Farooqi, H., Zhu, M., Zuk, P., & Benhaim, P. (2007). Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue Eng*, 13(7), 1615–1621.
- Du, S., Yuan, C., Xiao, X., Chu, J., Qiu, Y., & Qian, H. (2011). Self-management programs for chronic musculoskeletal pain conditions: A systematic review and meta-analysis. In *Patient Education and Counseling* (Vol. 85, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.pec.2011.02.021>
- Dufrane, D., Docquier, P.-L., Delloye, C., Poirel, H. A., André, W., & Aouassar, N. (2015). Scaffold-free Three-dimensional Graft From Autologous Adipose-derived Stem Cells for Large Bone Defect Reconstruction. *Medicine*, 94(50), e2220. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002220>
- Eiro, N., Fraile, M., Escudero-Cernuda, S., Sendon-Lago, J., Gonzalez, L. O., Fernandez-Sánchez, M. L., & Vizoso, F. J. (2024). Synergistic effect of human uterine cervical mesenchymal stem cell secretome and paclitaxel on triple negative breast cancer. *Stem Cell Research and Therapy*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-024-03717-0>
- Eiro, N., Fraile, M., González-Jubete, A., González, L. O., & Vizoso, F. J. (2022). Mesenchymal (Stem) Stromal Cells Based as New Therapeutic Alternative in Inflammatory Bowel Disease: Basic Mechanisms, Experimental and Clinical Evidence, and Challenges. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 16). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23168905>

- Eiró, N., Sendon-Lago, J., Seoane, S., Bermúdez, M. A., Lamelas, M. L., Garcia-Caballero, T., Schneider, J., Perez-Fernandez, R., & Vizoso, F. J. (2014). Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. In *Oncotarget* (Vol. 5, Issue 21). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Eliasberg, C. D., Dar, A., Jensen, A. R., Murray, I. R., Hardy, W. R., Kowalski, T. J., Garagozlo, C. A., Natsuhara, K. M., Khan, A. Z., McBride, O. J., Cha, P. I., Kelley, B. V., Evseenko, D., Feeley, B. T., McAllister, D. R., Péault, B., & Petrigliano, F. A. (2017). Perivascular Stem Cells Diminish Muscle Atrophy Following Massive Rotator Cuff Tears in a Small Animal Model. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 99(4), 331–341. <https://doi.org/10.2106/JBJS.16.00645>
- Emadedin, M., Aghdami, N., Taghiyar, L., Fazeli, R., Moghadasali, R., Jahangir, S., Farjad, R., & Eslaminejad, M. B. (2012). Intra-articular Injection of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Six Patients with Knee Osteoarthritis. *Archives of Iranian Medicine*, 15(7), 422–428. <https://doi.org/012157/AIM.0010>
- Estell, E. G., Silverstein, A. M., Stefani, R. M., Lee, A. J., Murphy, L. A., Shah, R. P., Ateshian, G. A., & Hung, C. T. (2019). Cartilage Wear Particles Induce an Inflammatory Response Similar to Cytokines in Human Fibroblast-Like Synoviocytes. *Journal of Orthopaedic Research*, 37(9), 1979–1987. <https://doi.org/10.1002/jor.24340>
- Faria, J., Calcat-i-Cervera, S., Skovronova, R., Broeksma, B. C., Berends, A. J., Zaal, E. A., Bussolati, B., O'Brien, T., Mihăilă, S. M., & Masereeuw, R. (2023). Mesenchymal stromal cells secretome restores bioenergetic and redox homeostasis in human proximal tubule cells after ischemic injury. *Stem Cell Research and Therapy*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03563-6>
- Faust, H. J., Zhang, H., Han, J., Wolf, M. T., Jeon, O. H., Sadtler, K., Peña, A. N., Chung, L., Maestas, D. R., Tam, A. J., Pardoll, D. M., Campisi, J., Housseau, F., Zhou, D., Bingham, C. O., & Elisseeff, J. H. (2020). IL-17 and immunologically induced senescence regulate response to injury in osteoarthritis. *Journal of Clinical Investigation*, 130(10), 5493–5507. <https://doi.org/10.1172/JCI134091>
- Fellows, C. R., Matta, C., Zakany, R., Khan, I. M., & Mobasheri, A. (2016). Adipose, bone marrow and synovial joint-derived mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Frontiers in Genetics*, 7(DEC), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00213>
- Fernández-Francos, S., Eiro, N., Costa, L. A., Escudero-Cernuda, S., Fernández-Sánchez, M. L., & Vizoso, F. J. (2021). Mesenchymal stem cells as a cornerstone in a galaxy of intercellular signals: Basis for a new era of medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073576>
- Fraile, M., Eiro, N., Costa, L. A., Martín, A., & Vizoso, F. J. (2022). Aging and Mesenchymal Stem Cells: Basic Concepts, Challenges and Strategies. In *Biology* (Vol. 11, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biology11111678>
- Freitag, J., Bates, D., Boyd, R., Shah, K., Barnard, A., Huguenin, L., & Tenen, A. (2016). Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy – a review. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1085-9>
- Friedenstein, a J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16(3), 381–390.

- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3, 393–403.
- Fuchs, S., Skwara, A., Bloch, M., & Dankbar, B. (2004). Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12(5), 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.02.005>
- Gan, Y., Dai, K., Zhang, P., Tang, T., Zhu, Z., & Lu, J. (2008). The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous beta-tricalcium phosphate in posterior spinal fusion. *Biomaterials*, 29(29), 3973–3982. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.06.026>
- Gao, F., Mao, X., & Wu, X. (2023). Mesenchymal stem cells in osteoarthritis: The need for translation into clinical therapy. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 199, pp. 199–225). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.02.006>
- García, M. F., González-Reyes, S., González, L. O., Junquera, S., Berdize, N., Del Casar, J. M., Medina, M., & Vizoso, F. J. (2010). Comparative study of the expression of metalloproteases and their inhibitors in different localizations within primary tumours and in metastatic lymph nodes of breast cancer. *International Journal of Experimental Pathology*, 91(4), 324–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00709.x>
- Giannasi, C., Niada, S., Magagnotti, C., Ragni, E., Andolfo, A., & Brini, A. T. (2020). Comparison of two ASC-derived therapeutics in an in vitro OA model: secretome versus extracellular vesicles. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02035-5>
- Giorgino, R., Albano, D., Fusco, S., Peretti, G. M., Mangiavini, L., & Messina, C. (2023). Knee Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Mesenchymal Stem Cells: What Else Is New? An Update. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24076405>
- Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H., & Carr, A. J. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), 376–387. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60802-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60802-3)
- Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., & Dzau, V. J. (2008). *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy Massimiliano*. 103 (11)(November 21), 1204–1219. <https://doi.org/10.1002/ana.22528>.Toll-like
- Gomes, J. L. E., da Silva, R. C., Silla, L. M. R., Abreu, M. R., & Pellanda, R. (2012). Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 20(2), 373–377. <https://doi.org/10.1007/s00167-011-1607-9>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Guo, W., Xu, P., Jin, T., Wang, J., Fan, D., Hao, Z., Ji, Y., Jing, S., Han, C., Du, J., Jiang, D., Wen, S., & Wang, J. (2017). Oncotarget 79491 www.impactjournals.com/oncotarget MMP-3 gene polymorphisms are associated

- with increased risk of osteoarthritis in Chinese men. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 45). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Han, D., Fang, Y., Tan, X., Jiang, H., Gong, X., Wang, X., Hong, W., Tu, J., & Wei, W. (2020). The emerging role of fibroblast-like synoviocytes-mediated synovitis in osteoarthritis: An update. In *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 24, Issue 17, pp. 9518–9532). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15669>
- Harvanova, D., Matejova, J., Slovinska, L., Lacko, M., Gulova, S., Fecskeova, L. K., Janockova, J., Spakova, T., & Rosocha, J. (2022). The Role of Synovial Membrane in the Development of a Potential In Vitro Model of Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052475>
- Hernigou, P., Flouzat Lachaniette, C., Delambre, J., Zilber, S., Duffiet, P., Chevallier, N., & Rouard, H. (2014). Biologic augmentation of rotator cuff repair with mesenchymal stem cells during arthroscopy improves healing and prevents further tears: a case-controlled study. *Int Orthop.*, 38(9), 1811–1818. <https://doi.org/10.1007/s00264-014-2391-1>
- Honorati, M. C., Cattini, L., & Facchini, A. (2007). VEGF production by osteoarthritic chondrocytes cultured in micromass and stimulated by IL-17 and TNF- α . *Connective Tissue Research*, 48(5), 239–245. <https://doi.org/10.1080/03008200701541767>
- Honorati, M. C., Neri, S., Cattini, L., & Facchini, A. (2006). Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(4), 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.10.004>
- Hua, J., Yu, H., Dong, W., Yang, C., Gao, Z., Lei, A., Sun, Y., Pan, S., Wu, Y., & Dou, Z. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: Potential differentiation of germ cells. *Tissue and Cell*, 41(6), 448–455. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.05.004>
- Huang, R., Li, W., Zhao, Y., Yang, F., Xu, M., & Bush, E. (2020). Clinical efficacy and safety of stem cell therapy for knee osteoarthritis: A meta-analysis. In *Medicine (United States)* (Vol. 99, Issue 11, p. E19434). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019434>
- Huang, S., Song, X., Li, T., Xiao, J., Chen, Y., Gong, X., Zeng, W., Yang, L., & Chen, C. (2017). Pellet coculture of osteoarthritic chondrocytes and infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells with chitosan/hyaluronic acid nanoparticles promotes chondrogenic differentiation. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0719-7>
- Hunter, D. J., & Bierma-Zeinstra, S. (2019). Osteoarthritis. *The Lancet*, 393(10182), 1745–1759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9)
- Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuri, A., Yamaguchi, S., & Takashi, T. A. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 6, 543–553.
- Isakson, M., de Blacam, C., Whelan, D., McArdle, A., & Clover, A. J. P. (2015). Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells International*, 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/831095>
- Jiang, W., Ma, A., Wang, T., Han, K., Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, X., Dong, A., Du, Y., Huang, X., Wang, J., Lei, X., & Zheng, X. (2006). Intravenous transplantation of

- mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. *Transplant International : Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 19(7), 570–580. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2006.00307.x>
- Jo, C., Lee, Y., Shin, W., Kim, H., Chai, J., Jeong, E., Kim, J., Shim, H., Shin, J., Shin, I., Ra, J., Oh, S., & Yoon, K. (2014). Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the. *Stem Cells*, 1254–1266.
- Joe, A. W., & Yeung, S. N. (2014). Concise review: identifying limbal stem cells: classical concepts and new challenges. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(3), 318–322. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0137>
- Joshi, J. M., Muttigi, M. S., Upadhy, R., & Seetharam, R. N. (2023). An overview of the current advances in the treatment of inflammatory diseases using mesenchymal stromal cell secretome. In *Immunopharmacology and Immunotoxicology* (Vol. 45, Issue 4, pp. 497–507). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/08923973.2023.2180388>
- Kalaitzoglou, E., Griffin, T. M., & Humphrey, M. B. (2017). Innate Immune Responses and Osteoarthritis. In *Current Rheumatology Reports* (Vol. 19, Issue 8). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11926-017-0672-6>
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P., & Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. In *Nature Reviews Rheumatology* (Vol. 7, Issue 1, pp. 33–42). <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>
- Kawate, K., Yajima, H., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Sugimoto, K., Ohmura, T., Kobata, Y., Shigematsu, K., Kawamura, K., Tamai, K., & Takakura, Y. (2006). Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs*, 30(12), 960–962. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2006.00333.x>
- Kemp, P. (2006). History of regenerative medicine: looking backwards to move forwards. *Regenerative Medicine*, 1(5), 653–669. <https://doi.org/10.2217/17460751.1.5.653>
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
- Kitoh, H., Kitakoji, T., Tsuchiya, H., Katoh, M., & Ishiguro, N. (2007). Distraction osteogenesis of the lower extremity in patients with achondroplasia/hypochondroplasia treated with transplantation of culture-expanded bone marrow cells and platelet-rich plasma. *J Pediatr Orthop.*, 27(6), 629–634. <https://doi.org/10.1097/BPO.0b013e318093f523>
- Kjelgaard-Petersen, C., Siebuhr, A. S., Christiansen, T., Ladel, C., Karsdal, M., & Bay-Jensen, A. C. (2015). Synovitis biomarkers: Ex vivo characterization of three biomarkers for identification of inflammatory osteoarthritis. *Biomarkers*, 20(8), 547–556. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1105497>
- Knights, A. J., Redding, S. J., & Maerz, T. (2023). Inflammation in osteoarthritis: The latest progress and ongoing challenges. In *Current Opinion in Rheumatology* (Vol.

- 35, Issue 2, pp. 128–134). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000923>
- Koenen, P., Spanholtz, T., Maegele, M., Stürmer, E., Brockamp, T., Neugebauer, E., & Thamm, O. (2015). Acute and chronic wound fluids inversely influence adipose-derived stem cell function: molecular insights into impaired wound healing. *Int Wound J.*, 12(1), 10–16. <https://doi.org/10.1111/iwj.12039>
- Kohl, S., Meier, S., Ahmad, S. S., Bonel, H., Exadaktylos, A. K., Krismer, A., & Evangelopoulos, D. S. (2015). Accuracy of cartilage-specific 3-Tesla 3D-DESS magnetic resonance imaging in the diagnosis of chondral lesions: Comparison with knee arthroscopy. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13018-015-0326-1>
- Lee, K. B. L., Hui, J. H. P., Song, I. C., Ardany, L., & Lee, E. H. (2007). Injectable Mesenchymal Stem Cell Therapy for Large Cartilage Defects-A Porcine Model. *Stem Cells*, 25(11), 2964–2971. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0311>
- Lee, R. H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, S., Suh, K., Bae, Y. C., & Jung, J. S. (2004). Cellular Physiology and Biochemistry Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. *Cellular Physiology and Biochemistry Original*, 14, 311–324. <https://doi.org/10.1159/000080341>
- Lee, S., Kim, W., Lim, C., & Chung, S. (2015). Treatment of Lateral Epicondylitis by Using Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells : A Pilot Study. *Stem Cells*, 33, 2995–3005. <https://doi.org/10.1002/stem.2110>
- Li, H., & Fu, X. (2012). Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res*, 348, 371–377.
- Liebergall, M., Schroeder, J., Mosheiff, R., Gazit, Z., Yoram, Z., Rasooly, L., Daskal, A., Khoury, A., Weil, Y., & Beyth, S. (2013). Stem Cell-based Therapy for Prevention of Delayed Fracture Union: A Randomized and Prospective Preliminary Study. *Molecular Therapy*, 21(8), 1631–1638. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.109>
- Liu, S., Cao, C., Zhang, Y., Liu, G., Ren, W., Ye, Y., & Sun, T. (2019). PI3K/Akt inhibitor partly decreases TNF- α -induced activation of fibroblast-like synoviocytes in osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1394-4>
- Liu, S., Deng, Z., Chen, K., Jian, S., Zhou, F., Yang, Y., Fu, Z., Xie, H., Xiong, J., & Zhu, W. (2022). Cartilage tissue engineering: From proinflammatory and anti-inflammatory cytokines to osteoarthritis treatments (Review). *Molecular Medicine Reports*, 25(3). <https://doi.org/10.3892/MMR.2022.12615>
- Lozito, T. P., & Tuan, R. S. (2011). Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. *Journal of Cellular Physiology*, 226(2), 385–396. <https://doi.org/10.1002/jcp.22344>
- Lubberts, E., Koenders, M., & van den Berg, W. B. (2005). The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: Lessons from animal models. In *Arthritis Research and Therapy* (Vol. 7, Issue 1, pp. 29–37). <https://doi.org/10.1186/ar1478>
- Mabey, T., Honsawek, S., Tanavalee, A., Yuktanandana, P., Wilairatana, V., & Poovorawan, Y. (2016). Plasma and synovial fluid inflammatory cytokine profiles in primary knee osteoarthritis. *Biomarkers*, 21(7), 639–644. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2016.1171907>

- Maglaviceanu, A., Wu, B., & Kapoor, M. (2021). Fibroblast-like synoviocytes: Role in synovial fibrosis associated with osteoarthritis. *Wound Repair and Regeneration*, 29(4), 642–649. <https://doi.org/10.1111/wrr.12939>
- Mao, Q., Wang, W., Xu, T., Zhang, S., Xiao, L., Chen, D., Jin, H., & Tong, P. (2015). Combination Treatment of Biomechanical Support and Targeted Intra-arterial Infusion of Peripheral Blood Stem Cells mobilized by granulocyte-colony stimulating factor for the Osteonecrosis of the Femoral Head: a randomised controlled clinical trial†. *J Bone Miner Res.*, 30(4), 647–656. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2390>
- Margiana, R., Pilehvar, Y., Amalia, F. L., Lestari, S. W., Supardi, S., & I'tishom, R. (2024). Mesenchymal stem cell secretome: A promising therapeutic strategy for erectile dysfunction? In *Asian Journal of Urology* (Vol. 11, Issue 3, pp. 391–405). Editorial Office of Asian Journal of Urology. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2024.02.003>
- Marqués-López, F., Nieto-Alvarado, S., Tey-Pons, M., León-García-Vao, A., & Molina-Cuevas, L. (2021). Fractura periprotésica acetabular intraoperatoria. *Acta Ortopédica Mexicana*, 35(3), 266–270. <https://doi.org/10.35366/102365>
- Martel-Pelletier, J., Barr, A. J., Cicuttini, F. M., Conaghan, P. G., Cooper, C., Goldring, M. B., Goldring, S. R., Jones, G., Teichtahl, A. J., & Pelletier, J. P. (2016). Osteoarthritis. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 2). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.72>
- Martel-Pelletier, J., & Pelletier, J.-P. (2010). Inflamación y osteoartrosis. In M. Quintero, J. Monfort, & D. R. Mitrovic (Eds.), *Osteoartrosis. Biología, fisiología, clínica y tratamiento* (pp. 135–139). Editorial Médica Panamericana.
- Matsiko, A., Levingstone, T., O'Brien, F., & Gleeson, J. (2012). Addition of hyaluronic acid improves cellular infiltration and promotes early-stage chondrogenesis in a collagen-based scaffold for cartilage tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater.*, 11, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.11.012>
- Meghnem, D., Maillason, M., Barbieux, I., Morisseau, S., Keita, D., Jacques, Y., Quémener, A., & Mortier, E. (2022). Selective Targeting of IL-15R α Is Sufficient to Reduce Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.886213>
- Mei, L., Shen, B., Ling, P., Liu, S., Xue, J., Liu, F., Shao, H., Chen, J., Ma, A., & Liu, X. (2017). Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176107>
- Mifune, Y., Matsumoto, T., Takayama, K., Ota, S., Li, H., Meszaros, L. B., Usas, A., Nagamune, K., Gharaibeh, B., Fu, F. H., & Huard, J. (2013). The effect of platelet-rich plasma on the regenerative therapy of muscle derived stem cells for articular cartilage repair. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(1), 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.09.018>
- Miguélez-Rivera, L., Pérez-Castrillo, S., González-Fernández, M. L., Prieto-Fernández, J. G., López-González, M. E., García-Cosamalón, J., & Villar-Suárez, V. (2017). Immunomodulation of Mesenchymal Stem Cells in discogenic pain. *The Spine Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2017.09.002>
- Milaras, C., Lepetsos, P., Dafou, D., Potoupnis, M., & Tsiridis, E. (2021). Association of Matrix Metalloproteinase (MMP) Gene Polymorphisms With Knee Osteoarthritis: A Review of the Literature. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.18607>

- Monfort-Faure, J., & Trujillo-Martin, E. (2010). Mecanismos de destrucción y reparación del cartílago. In J. Monfort-Faure (Ed.), *Artrosis* (pp. 91–100). Editorial Medica Panamericana.
- Mukherjee, A., & Das, B. (2024). The role of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs) in the progression of osteoarthritis. In *Biomaterials and Biosystems* (Vol. 13). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bbiosy.2024.100090>
- Murray, I. R., Geeslin, A. G., Goudie, E. B., Petrigliano, F. A., & Laprade, R. F. (2017). Minimum Information for Studies Evaluating Biologics in Orthopaedics (MIBO): Platelet-Rich Plasma and Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 99-A(10), 809–819. <https://doi.org/10.2106/JBJS.16.00793>
- Na, H. S., Park, J. S., Cho, K. H., Kwon, J. Y., Choi, J. W., Jhun, J., Kim, S. J., Park, S. H., & Cho, M. La. (2020). Interleukin-1-Interleukin-17 Signaling Axis Induces Cartilage Destruction and Promotes Experimental Osteoarthritis. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00730>
- Nejadnik, H., Hui, J., Feng Choong, E., Tai, B., & Lee, E. (2010). Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Versus Autologous Chondrocyte Implantation: An Observational Cohort Study. *The American Journal of Sports Medicine*, 38(6), 1110–1116. <https://doi.org/10.1177/0363546509359067>
- Nejabatkhsh Samimi, L., Farhadi, E., Tahmasebi, M. N., Jamshidi, A., Sharafat Vaziri, A., & Mahmoudi, M. (2020). NF-κB signaling in rheumatoid arthritis with focus on fibroblast-like synoviocytes. In *Autoimmunity Highlights* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13317-020-00135-z>
- Orciani, M., Mariggiò, M., Morabito, C., Di Benedetto, G., & Di Primio, R. (2010). Functional characterization of calcium-signaling pathways of human skin-derived mesenchymal stem cells. *Skin Pharmacol Physiol.*, 23(3), 124–132. <https://doi.org/10.1159/000270383>
- Orozco, L., Munar, A., Soler, R., Alberca, M., Soler, F., Huguet, M., Sentis, J., Sanchez, A., & Javier, G. (2014). Treatment of knee OA with autologous MSC two-year follow-up results. *Transplantation*, 97(11), e66–e67. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000162>
- Palamà, M. E. F., Shaw, G. M., Carluccio, S., Reverberi, D., Sercia, L., Persano, L., Pisignano, D., Cortese, K., Barry, F. P., Murphy, J. M., & Gentili, C. (2020). The secretome derived from mesenchymal stromal cells cultured in a xeno-free medium promotes human cartilage recovery in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00090>
- Pap, T., Dankbar, B., Wehmeyer, C., Korb-Pap, A., & Sherwood, J. (2020). Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: Role and mechanisms. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 101, pp. 140–145). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.12.006>
- Pap, T., Shigeyama, Y., Kuchen, S., Fernihough, J. K., Simmen, B., Gay, R. E., Billingham, M., & Gay, S. (2000). Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 43(6), 1226–1232. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200006\)43:6<1226::AID-ANR5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200006)43:6<1226::AID-ANR5>3.0.CO;2-4)
- Partan, R. U., Putra, K. M., Kusuma, N. F., Darma, S., Reagan, M., Muthia, P., Radiandina, A. S., Saleh, M. I., & Salim, E. M. (2023). Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell

- Secretome Improves Clinical Outcomes and Changes Biomarkers in Knee Osteoarthritis. *Journal of Clinical Medicine*, 12(22). <https://doi.org/10.3390/jcm12227138>
- Pascual-Garrido, C., Rolón, A., & Makino, A. (2012). Treatment of chronic patellar tendinopathy with autologous bone marrow stem cells: A 5-year-followup. *Stem Cells International*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/953510>
- Patki, S., Kadam, S., Chandra, V., & Bhonde, R. (2010). Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell*, 23, 35–40.
- Peláez, P., Damiá, E., Torres-Torrillas, M., Chicharro, D., Cuervo, B., Miguel, L., Del Romero, A., Carrillo, J. M., Sopena, J. J., & Rubio, M. (2021). Cell and cell free therapies in osteoarthritis. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111726>
- Pérez Expósito, R. E., Ortega Núñez, M. A., Buján Varela, M. J., Vega Rodríguez, R. M., Ortiz Chércoles, A. I., & De La Torre Escuredo, B. J. (2024). Efficacy of new active viscosupplements on the behavior of an experimental model of osteoarthritis. *Revista Espanola de Cirugia Ortopedica y Traumatologia*. <https://doi.org/10.1016/j.recot.2024.04.006>
- Persiani, P., De Cristo, C., Graci, J., Noia, G., Gurzi, M., & Villani, C. (2015). Stage-related results in treatment of hip osteonecrosis with core-decompression and autologous mesenchymal stem cells. *Acta Orthop Belg.*, 81(3), 406–412.
- Persson, M. S. M., Sarmanova, A., Doherty, M., & Zhang, W. (2018). Conventional and biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs for osteoarthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Rheumatology (United Kingdom)*, 57(10), 1830–1837. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/key131>
- Plaas, A., Velasco, J., Gorski, D. J., Li, J., Cole, A., Christopherson, K., & Sandy, J. D. (2011). The relationship between fibrogenic $\text{tg}\beta 1$ signaling in the joint and cartilage degradation in post-injury osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(9), 1081–1090. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.05.003>
- Plsikova Matejova, J., Spakova, T., Harvanova, D., Lacko, M., Filip, V., Sepitka, R., Mitro, I., & Rosocha, J. (2021). A Preliminary Study of Combined Detection of COMP, TIMP-1, and MMP-3 in Synovial Fluid: Potential Indicators of Osteoarthritis Progression. *Cartilage*, 13(2_suppl), 1421S-1430S. <https://doi.org/10.1177/1947603520946385>
- Qu, Z., Fang, G., Cui, Z., & Liu, Y. (2015). Cell therapy for bone nonunion: a retrospective study. *Minerva Med.*, 106(6), 315–321.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., & Marcacci, M. (2001). Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *N Engl J Med*, 344, 385–386. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10868086
- Riewruja, K., Phakham, S., Sompolpong, P., Reantragoon, R., Tanavalee, A., Ngarmukos, S., Udomsinprasert, W., Suantawee, T., Dechsupa, S., & Honsawek, S. (2022). Cytokine Profiling and Intra-Articular Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma in Knee Osteoarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020890>
- Rodriguez-Collazo, E. R., & Urso, M. L. (2015). Combined use of the Ilizarov method, concentrated bone marrow aspirate (cBMA), and platelet-rich plasma (PRP) to

- expedite healing of bimalleolar fractures. *Strategies in Trauma and Limb Reconstruction*, 10(3), 161–166. <https://doi.org/10.1007/s11751-015-0239-x>
- Rosochowicz, M. A., Lach, M. S., Richter, M., Jagiełło, I., Suchorska, W. M., & Trzeciak, T. (2024). The iPSC secretome is beneficial for in vitro propagation of primary osteoarthritic chondrocytes cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 730. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150392>
- Safiri, S., Kolahi, A. A., Smith, E., Hill, C., Bettampadi, D., Mansournia, M. A., Hoy, D., Ashrafi-Asgarabad, A., Sepidarkish, M., Almasi-Hashiani, A., Collins, G., Kaufman, J., Qorbani, M., Moradi-Lakeh, M., Woolf, A. D., Guillemin, F., March, L., & Cross, M. (2020). Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: A systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 819–828. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216515>
- Sanchez-Lopez, E., Coras, R., Torres, A., Lane, N. E., & Guma, M. (2022). Synovial inflammation in osteoarthritis progression. In *Nature Reviews Rheumatology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 258–275). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41584-022-00749-9>
- Scanzello, C. R., & Goldring, S. R. (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. In *Bone* (Vol. 51, Issue 2, pp. 249–257). <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.02.012>
- Scanzello, C. R., Umoh, E., Pessler, F., Diaz-Torne, C., Miles, T., DiCarlo, E., Potter, H. G., Mandl, L., Marx, R., Rodeo, S., Goldring, S. R., & Crow, M. K. (2009). Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(8), 1040–1048. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.02.011>
- Schneider, J., Eiro, N., Perez-Fernandez, R., Martinez-Ordoñez, A., & Vizoso, F. (2016). Human uterine cervical stromal stem cells (hUCSCs): Why and how they exert their antitumor activity. *Cancer Genomics & Proteomics*, 13, 331–338.
- Schneider, J., Mateo, E., Marcos-Arias, C., Eiró, N., Vizoso, F., Pérez-Fernández, R., Eraso, E., & Quindós, G. (2018). Antifungal activity of the human uterine cervical stem cells conditioned medium (hUCESC-CM) against candida albicans and other medically relevant species of candida. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02818>
- Sekiya, I., Muneta, T., Horie, M., & Koga, H. (2015). Arthroscopic Transplantation of Synovial Stem Cells Improves Clinical Outcomes in Knees With Cartilage Defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 473(7), 2316–2326. <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4324-8>
- Sendon-Lago, J., Garcia-Del Rio, L., Eiro, N., Diaz-Rodriguez, P., Avila, L., Gonzalez, L. O., Vizoso, F. J., Perez-Fernandez, R., & Landin, M. (2021). pharmaceuticals Tailored Hydrogels as Delivery Platforms for Conditioned Medium from Mesenchymal Stem Cells in a Model of Acute Colitis in Mice. *Pharmaceutics*, 13, 1127. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics>
- Sendon-Lago, J., Seoane, S., Martinez-Ordoñez, A., Eiro, N., Saa, J., Vizoso, F. J., Gonzalez, F., Perez-Fernandez, R., & Bermudez, M. A. (2019). Corneal regeneration by conditioned medium of human uterine cervical stem cells is mediated by TIMP-1 and TIMP-2. *Experimental Eye Research*, 180, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.12.004>

- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., & Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(November), 13726–13731.
- Shang, Z., Wanyan, P., Zhang, B., Wang, M., & Wang, X. (2023). A systematic review, umbrella review, and quality assessment on clinical translation of stem cell therapy for knee osteoarthritis: Are we there yet? In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03332-5>
- Sivakamasundri, V., & Lufkin, T. (2013). Stemming the Degeneration: IVD Stem Cells and Stem Cell Regenerative Therapy for Degenerative Disc Disease. *Adv Stem Cells*, 2013(724547). <https://doi.org/10.5171/2013.724547.Stemming>
- Slattery, C., & Kweon, C. Y. (2018). Classifications in Brief: Outerbridge Classification of Chondral Lesions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 476(10), 2101–2104. <https://doi.org/10.1007/s11999-00000000000000255>
- Snyder, T. N., Madhavan, K., Intrator, M., Dregalla, R. C., & Park, D. (2014). A fibrin/hyaluronic acid hydrogel for the delivery of mesenchymal stem cells and potential for articular cartilage repair. *Journal of Biological Engineering*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-8-10>
- Soler, R., Orozco, L., Munar, A., Huguet, M., López, R., Vives, J., Coll, R., Codinach, M., & Garcia-Lopez, J. (2016). Final results of a phase I–II trial using ex vivo expanded autologous Mesenchymal Stromal Cells for the treatment of osteoarthritis of the knee confirming safety and suggesting cartilage regeneration. *The Knee*, 23(4), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.knee.2015.08.013>
- Su, W., Zheng, X., Zhou, H., Yang, S., & Zhu, X. (2023). Fibroblast growth factor 10 delays the progression of osteoarthritis by attenuating synovial fibrosis via inhibition of IL-6/JAK2/STAT3 signaling in vivo and in vitro. *Molecular Immunology*, 159, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.04.001>
- Sun, J. M., Sun, L. Z., Liu, J., Su, B. H., & Shi, L. (2013). Serum interleukin-15 levels are associated with severity of pain in patients with knee osteoarthritis. *Disease Markers*, 35(3), 203–206. <https://doi.org/10.1155/2013/176278>
- Talbott, H. E., Mascharak, S., Griffin, M., Wan, D. C., & Longaker, M. T. (2022). Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. In *Cell Stem Cell* (Vol. 29, Issue 8, pp. 1161–1180). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.07.006>
- Tan, D., Huang, Z., Zhao, Z., Chen, X., Liu, J., Wang, D., Deng, Z., & Li, W. (2024). Single-cell sequencing, genetics, and epigenetics reveal mesenchymal stem cell senescence in osteoarthritis (Review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Vol. 53, Issue 1). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2023.5326>
- Tao, Y., Qiu, X., Xu, C., Sun, B., & Shi, C. (2015). Original Article Expression and correlation of matrix metalloproteinase-7 and interleukin-15 in human osteoarthritis. In *Int J Clin Exp Pathol* (Vol. 8, Issue 8). www.ijcep.com/
- Tawonsawatruk, T., Kelly, M., & Simpson, H. (2014). Evaluation of native mesenchymal stem cells from bone marrow and local tissue in an atrophic nonunion model. *Tissue Eng Part C Methods*, 20(6), 524–532. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2013.0465>

- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, A. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(Dec4), 1145–1147.
- Trigo, C. M., Rodrigues, J. S., Camões, S. P., Solá, S., & Miranda, J. P. (2024). Mesenchymal stem cell secretome for regenerative medicine: Where do we stand? In *Journal of Advanced Research*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.05.004>
- Ulrich, D., Muralitharan, R., & Gargett, C. E. (2013). Toward the use of endometrial and menstrual blood mesenchymal stem cells for cell-based therapies. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 13(10), 1387–1400. <https://doi.org/10.1517/14712598.2013.826187>
- Umakoshi, M., Kudo-Asabe, Y., Tsuchie, H., Li, Z., Koyama, K., Miyabe, K., Yoshida, M., Nagasawa, H., Nanjo, H., Okada, K., Maeda, D., Miyakoshi, N., Tanaka, M., & Goto, A. (2024). Prognostic value of CAF marker expression in the intratumoral and marginal areas of soft tissue sarcoma. *Pathobiology*. <https://doi.org/10.1159/000539855>
- Van Buul, G. M., Siebelt, M., Leijts, M. J. C., Bos, P. K., Waarsing, J. H., Kops, N., Weinans, H., Verhaar, J. A. N., Bernsen, M. R., & Van Osch, G. J. V. M. (2014). Mesenchymal stem cells reduce pain but not degenerative changes in a mono-iodoacetate rat model of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 32(9), 1167–1174. <https://doi.org/10.1002/jor.22650>
- van Buul, G. M., Villafuertes, E., Bos, P. K., Waarsing, J. H., Kops, N., Narcisi, R., Weinans, H., Verhaar, J. A. N., Bernsen, M. R., & van Osch, G. J. V. M. (2012). Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(10), 1186–1196. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.003>
- van den Bosch, M. H. J., Blom, A. B., & van der Kraan, P. M. (2024). Inflammation in osteoarthritis: Our view on its presence and involvement in disease development over the years. In *Osteoarthritis and Cartilage* (Vol. 32, Issue 4, pp. 355–364). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2023.12.005>
- Vangsness, C. T., Farr, J., Boyd, J., Dellaero, D. T., Mills, C. R., & LeRoux--Williams, M. (2014). Adult Human Mesenchymal Stem Cells Delivered via Intra-Articular Injection to the Knee Following Partial Medial Meniscectomy. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 96(2), 90–98.
- Varela-Egocheaga, J. R., Suárez-Suárez, M. A., Fernández-Villán, M., González-Sastre, V., Varela-Gómez, J. R., & Rodríguez-Merchán, C. (2010). Minimally invasive subvastus approach: Improving the results of total knee arthroplasty: A prospective, randomized trial. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 468(5), 1200–1208. <https://doi.org/10.1007/s11999-009-1160-8>
- Vega, A., Martín-Ferrero, M. A., Del Canto, F., Alberca, M., García, V., Munar, A., Orozco, L., Soler, R., Fuertes, J. J., Huguet, M., Sánchez, A., & García-Sancho, J. (2015). Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation*, 99(8), 1681–1690. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000678>
- Verma, S., Rajaratnam, J. H., Denton, J., Hoyland, J. A., & Byers, R. J. (2002). Adipocytic proportion of bone marrow is inversely related to bone formation in osteoporosis.

- Journal of Clinical Pathology*, 55(9), 693–698. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.9.693>
- Villaron, E. M., Almeida, J., López-Holgado, N., Alcoceba, M., Sánchez-Abarca, L. I., Sánchez-Guijo, F. M., Alberca, M., Pérez-Simon, J. A., San Miguel, J. F., & Del Cañizo, M. C. (2004). Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Trial*, 89(May), 1421–1427.
- Vincent, T. L. (2019). IL-1 in osteoarthritis: Time for a critical review of the literature. In *F1000Research* (Vol. 8). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18831.1>
- Vizoso, F., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., & Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1852. <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>
- Vizoso, F. J., Costa, L. A., & Eiro, N. (2023). New era of mesenchymal stem cell-based medicine: basis, challenges and prospects. *Revista Clínica Española (English Edition)*, 223(10), 619–628. <https://doi.org/10.1016/j.rceng.2023.11.002>
- Von Roth, P., Duda, G. N., Radojewski, P., Preininger, B., Perka, C., & Winkler, T. (2012). Mesenchymal stem cell therapy following muscle trauma leads to improved muscular regeneration in both male and female rats. *Gender Medicine*, 9(2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.genm.2012.01.007>
- Wagner, G., Lehmann, C., Bode, C., Miosge, N., & Schubert, A. (2021). High Mobility Group Box 1 Protein in Osteoarthritic Knee Tissue and Chondrogenic Progenitor Cells: An Ex Vivo and In Vitro Study. *Cartilage*, 12(4), 484–495. <https://doi.org/10.1177/1947603519835897>
- Wakitani, S., Imoto, K., Yamamoto, T., Saito, M., Murata, N., & Yoneda, M. (2002). Human autologous culture expanded bone marrow-mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10(3), 199–206. <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0504>
- Wang, H., Qi, L. L., Shema, C., Jiang, K. Y., Ren, P., Wang, H., & Wang, L. (2024). Advances in the role and mechanism of fibroblasts in fracture healing. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1350958>
- Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., Fu, Y. S., Lai, M. C., & Chen, C. C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22, 1330–1337.
- Wang, T., & He, C. (2018). Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 44, pp. 38–50). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.10.002>
- Watson, R. S., Gouze, E., Levings, P. P., Bush, M. L., Kay, J. D., Jorgensen, M. S., Dacanay, E. A., Reith, J. W., Wright, T. W., & Ghivizzani, S. C. (2010). Gene delivery of TGF- β 1 induces arthrofibrosis and chondrometaplasia of synovium in vivo. *Laboratory Investigation*, 90(11), 1615–1627. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.145>
- Wei, Q., Kong, N., Liu, X., Tian, R., Jiao, M., Li, Y., Guan, H., Wang, K., & Yang, P. (2021). Pirfenidone attenuates synovial fibrosis and postpones the progression of osteoarthritis by anti-fibrotic and anti-inflammatory properties in vivo and in vitro.

- Journal of Translational Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02823-4>
- Wei, X., Yang, X., Han, Z., Qu, F., Shao, L., & Shi, Y. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(6), 747–754. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>
- Wiegertjes, R., Van De Loo, F. A. J., & Blaney Davidson, E. N. (2020). A roadmap to target interleukin-6 in osteoarthritis. In *Rheumatology (United Kingdom)* (Vol. 59, Issue 10, pp. 2681–2694). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keaa248>
- Wilmot I1, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, C. KH. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619)(Feb 27), 810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A., & Szukiewicz, D. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/561459>
- Wong, K. L., Lee, K. B. L., Tai, B. C., Law, P., Lee, E. H., & Hui, J. H. P. (2013). Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: A prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 29(12), 2020–2028. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2013.09.074>
- Wood, M. J., Miller, R. E., & Malfait, A. M. (2022). The Genesis of Pain in Osteoarthritis: Inflammation as a Mediator of Osteoarthritis Pain. In *Clinics in Geriatric Medicine* (Vol. 38, Issue 2, pp. 221–238). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2021.11.013>
- Woodell-May, J. E., & Sommerfeld, S. D. (2020). Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. In *Journal of Orthopaedic Research* (Vol. 38, Issue 2, pp. 253–257). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jor.24457>
- Wu, M., Xu, T., Zhou, Y., Lu, H., & Gu, Z. (2013). Pressure and inflammatory stimulation induced increase of cadherin-11 is mediated by PI3K/Akt pathway in synovial fibroblasts from temporomandibular joint. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(10), 1605–1612. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.07.015>
- Wu, Y., Goh, E. L., Wang, D., & Ma, S. (2018). Novel treatments for osteoarthritis: An update. In *Open Access Rheumatology: Research and Reviews* (Vol. 10, pp. 135–140). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/OARRR.S176666>
- Xiang, X. N., Zhu, S. Y., He, H. C., Yu, X., Xu, Y., & He, C. Q. (2022). Mesenchymal stromal cell-based therapy for cartilage regeneration in knee osteoarthritis. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02689-9>
- Xiao, J., Zhang, P., Cai, F. L., Luo, C. G., Pu, T., Pan, X. L., & Tian, M. (2023). IL-17 in osteoarthritis: A narrative review. In *Open Life Sciences* (Vol. 18, Issue 1). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0747>
- Yan, D., He, B., Guo, J., Li, S., & Wang, J. (2019). Involvement of TLR4 in the protective effect of intra-articular administration of curcumin on rat experimental

- osteoarthritis. *Acta Cirurgica Brasileira*, 34(6). <https://doi.org/10.1590/s0102-8650201900600000004>
- Yang, X. K., Xu, W. D., Leng, R. X., Liang, Y., Liu, Y. Y., Fang, X. Y., Feng, C. C., Li, R., Cen, H., Pan, H. F., & Ye, D. Q. (2015). Therapeutic potential of IL-15 in rheumatoid arthritis. In *Human Immunology* (Vol. 76, Issue 11, pp. 812–818). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.09.041>
- Yu, L., Lin, Y. L., Yan, M., Li, T., Wu, E. Y., Zimmel, K., Qureshi, O., Falck, A., Sherman, K. M., Huggins, S. S., Hurtado, D. O., Suva, L. J., Gaddy, D., Cai, J., Brunauer, R., Dawson, L. A., & Muneoka, K. (2022). Hyaline cartilage differentiation of fibroblasts in regeneration and regenerative medicine. *Development (Cambridge, England)*, 149(2). <https://doi.org/10.1242/dev.200249>
- Yubo, M., Yanyan, L., Li, L., Tao, S., Bo, L., & Lin, C. (2017). Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for osteoarthritis treatment: A meta-analysis. *Plos One*, 12(4), e0175449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175449>
- Zhao, D., Cui, D., Wang, B., Tian, F., Guo, L., Yang, L., Liu, B., & Yu, X. (2012). Treatment of early stage osteonecrosis of the femoral head with autologous implantation of bone marrow-derived and cultured mesenchymal stem cells. *Bone*, 50(1), 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.11.002>
- Zheng, B., Cao, B., Crisan, M., Sun, B., Li, G., Logar, A., Yap, S., Pollet, J. B., Drowley, L., & T, C. (2007). Prospective identification of myogenic endothelial cells in human skeletal muscle. *Nat Biotechnol*, 25, 1025–1034.
- Zuk, P. A., Min, Z., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., P, B., & Hedrick, M. H. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02>