



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Doctorado en

Biomedicina y Farmacia

PAPEL MODULADOR DE LAS VESICULAS
EXTRACELULARES DEL LÍQUIDO SINOVIAL EN LA ARTROSIS
TESIS DOCTORAL

Álvaro Compañ Bertomeu

Directoras: María Luisa Ferrándiz Manglano

María Isabel Guillén Salazar

Departamento de Farmacología

Valencia, 2024



Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Dña. María Luisa Ferrándiz Manglano, Catedrática de la Universitat de València y Dña. María Isabel Guillén Salazar, Catedrática de la Universidad Cardenal Herrera CEU,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por el graduado **Álvaro Compañ Bertomeu**, titulado *"Papel modulador de las vesículas extracelulares del líquido sinovial en la artrosis"*, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento. Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia, a 12 de Julio 2024

MARIA
LUISA|
FERRANDIZ|
MANGLANO

Firmado
digitalmente por
MARIA LUISA|
FERRANDIZ|
MANGLANO
Fecha:
2024.07.12
13:17:12 +02'00'

María Luisa Ferrándiz Manglano

GUILLEN
SALAZAR
MARIA
ISABEL -
22633239C

Firmado
digitalmente por
GUILLEN SALAZAR
MARIA ISABEL -
22633239C
Fecha: 2024.07.12
13:32:10 +02'00'

María Isabel Guillén Salazar

Es difícil agradecer a todo el mundo que ha hecho posible esta tesis, pero vamos a intentarlo...

La realización de esta tesis doctoral ha sido un camino lleno de desafíos y aprendizajes, que no habría sido posible sin el apoyo y la guía de muchas personas.

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directoras de tesis, Marisa e Isa. Marisa, tu dedicación y capacidad para sacar tiempo de donde no lo hay han sido un ejemplo constante de compromiso y profesionalismo. A pesar de tu apretada agenda, siempre encontraste un momento para resolver mis dudas y guiarme en este proceso. Isa, tu sabiduría y sentido del humor hicieron que este camino fuera no solo más llevadero, sino también enriquecedor. Agradezco tus puñetas amistosas, que siempre me motivaron a superar mis límites y a mejorar continuamente. Ambas me habéis guiado y enseñado como si fuera vuestro hijo, mis madres en la ciencia, y por eso os estaré eternamente agradecido.

También quiero agradecer de manera especial a dos profesoras del departamento de Farmacología, las Carmenes. Monte, siempre teníamos tiempo para hablar. Terens, tu excepcional disposición para ayudarme, incluso en momentos de incertidumbre, y tu constante saludo y sonrisa matutinas me ayudaron a mantener una rutina diaria. No existe el "NO" en tu vocabulario, y eso es algo que siempre admiraré y agradeceré profundamente.

Asimismo, quiero expresar mi gratitud a Carlos, Mamen y Rosa, por estar siempre dispuestos a ayudarme y facilitarme toda la burocracia de la Universidad.

A mis compañeras de la Farmacia, Angi, Isa, Luci y Vero, gracias por cubrirme siempre que fue necesario y por nunca decir que no a nada. Vuestra comprensión y apoyo me permitieron dedicarme a la tesis con tranquilidad.

A mis amigos, gracias por estar ahí y por vuestro constante interés en mi progreso, aunque a veces os quejarais de que siempre estaba con la tesis, sé que era porque me echabais de menos y queríais quedar conmigo. No puedo nombraros a todos porque si no esto ocuparía más que la tesis. ¡Ahora que acabo, podremos tomarnos ese copazo a nuestra salud!

A mi familia, a mis abuelos, que, aunque ya no estén conmigo, sé que siempre me han apoyado y han estado ahí. Y a mis abuelas, que me siguen apoyando en todo lo que hago. Aunque no siempre comprendéis lo que hago, vuestro interés y vuestras preguntas constantes para que os lo explique una y otra vez me han demostrado un amor y apoyo incondicional.

Finalmente, quiero agradecer de manera especial a mis padres, Miguel y Luisa, y a mi novia, Ester. Papá y Mamá, esta tesis también es vuestra, porque sin vuestro apoyo incondicional no habría sido posible. Gracias por creer en mí, por motivarme en los momentos más difíciles y animarme a seguir con todas mis aventuras. Esteri, has cargado conmigo lo más pesado de la tesis, mi estado de ánimo, he sido una montaña rusa lo sé, mis altos y bajos, y siempre estuviste allí para motivarme a seguir adelante cuando quería rendirme. Vuestro amor y apoyo han sido esenciales en este arduo camino llamado Tesis Doctoral.

He aprendido muchísimo durante este camino: a priorizar lo importante, a dejarme llevar cuando es necesario, a organizarme y resolver problemas por mí mismo, a pedir ayuda cuando es necesario, y a ser mejor profesional y científico.

Gracias a todos por ser parte de esta experiencia y por contribuir a que hoy pueda celebrar este logro. En este camino, he conocido a mucha gente y espero que siempre contéis conmigo como yo cuento con vosotros.

Resumen: La osteoartritis es una enfermedad crónica y degenerativa que afecta las articulaciones, causando dolor y discapacidad significativa en millones de personas en todo el mundo. A pesar de su prevalencia, los mecanismos patogénicos subyacentes a la progresión de la osteoartritis aún no están completamente comprendidos, y los tratamientos actuales se centran principalmente en el manejo de los síntomas en lugar de abordar las causas subyacentes de la enfermedad.

Esta tesis se centra en explorar los mecanismos patogénicos de la osteoartritis, con especial énfasis en el papel de las vesículas extracelulares derivadas del líquido sinovial en la progresión de la enfermedad. Las vesículas extracelulares son pequeñas partículas liberadas por las células que pueden transportar diversas moléculas bioactivas, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y se ha sugerido que juegan un papel crucial en la comunicación intercelular y la modulación de las respuestas inflamatorias en diversas enfermedades.

Para investigar esto, se emplearon diversos métodos experimentales, incluyendo ensayos de cultivo celular, análisis bioquímicos y técnicas de imagen. Específicamente, se estudió la interacción entre las vesículas extracelulares del líquido sinovial y las células articulares de la rodilla artrósica, en particular los condrocitos y sinoviocitos. Se realizaron experimentos para aislar y caracterizar las vesículas extracelulares del líquido sinovial de pacientes con osteoartritis y se evaluó su impacto en la viabilidad celular, la proliferación, la producción de mediadores inflamatorios y la degradación del cartílago.

Los resultados de esta investigación indican que las vesículas extracelulares pequeñas del líquido sinovial desempeñan un papel crucial en la modulación de las respuestas inflamatorias y en la comunicación intercelular en las articulaciones afectadas por la osteoartritis. Se observó que las vesículas extracelulares pequeñas pueden influir en la degradación del cartílago al alterar la producción de mediadores inflamatorios y proteasas por parte de los condrocitos y sinoviocitos. Además, se evaluó la eficacia de tratamientos basados en vesículas extracelulares pequeñas, demostrando que estas terapias pueden ofrecer beneficios terapéuticos significativos al reducir la inflamación y promover la regeneración del cartílago.

Los hallazgos de esta investigación destacan por primera vez el posible papel inmunomodulador y condroprotector de las vesículas extracelulares pequeñas del líquido

sinovial en la osteoartritis. Estos efectos incluyen la disminución de la inflamación y la protección del cartílago articular mediante la regulación de mediadores clave. Estos resultados sugieren que las vesículas extracelulares pequeñas del líquido sinovial podrían ser la base de nuevas estrategias terapéuticas para la osteoartritis, así como servir como biomarcadores para un diagnóstico más precoz y preciso de esta patología inflamatoria crónica.

Palabras clave: Osteoartritis, Líquido Sinovial, Vesículas Extracelulares, Cultivos Celulares, Terapias Articulares

Abstract: Osteoarthritis is a chronic and degenerative disease that affects the joints, causing pain and significant disability in millions of people worldwide. Despite its prevalence, the pathogenic mechanisms underlying the progression of osteoarthritis are not yet fully understood, and current treatments mainly focus on symptom management rather than addressing the underlying causes of the disease.

This thesis focuses on exploring the pathogenic mechanisms of osteoarthritis, with special emphasis on the role of synovial fluid-derived extracellular vesicles in the progression of the disease. Extracellular vesicles are small particles released by cells that can transport various bioactive molecules, including proteins, lipids, and nucleic acids. They are thought to play a crucial role in intercellular communication and the modulation of inflammatory responses in various diseases.

To investigate this, various experimental methods were employed, including cell culture assays, biochemical analyses, and imaging techniques. Specifically, the interaction between synovial fluid extracellular vesicles and joint cells in osteoarthritic knees, particularly chondrocytes and synoviocytes, was studied. Experiments were conducted to isolate and characterize synovial fluid extracellular vesicles from patients with osteoarthritis and to evaluate their impact on cell viability, proliferation, production of inflammatory mediators, and cartilage degradation.

The results of this research indicate that synovial fluid small extracellular vesicles play a crucial role in modulating inflammatory responses and intercellular communication in joints affected by osteoarthritis. It was observed that small extracellular vesicles can influence cartilage degradation by altering the production of inflammatory mediators and proteases by chondrocytes and synoviocytes. Additionally, the efficacy of small extracellular vesicle-based treatments was evaluated, demonstrating that these therapies can offer significant therapeutic benefits by reducing inflammation and promoting cartilage regeneration.

The findings of this research highlight for the first time the potential immunomodulatory and chondroprotective role of synovial fluid small extracellular vesicles in osteoarthritis. These effects include the reduction of inflammation and the protection of articular cartilage through the regulation of key mediators. These results suggest that synovial fluid small

extracellular vesicles could form the basis of new therapeutic strategies for osteoarthritis, as well as serve as biomarkers for earlier and more accurate diagnosis of this chronic inflammatory pathology.

Keywords: Osteoarthritis, Synovial Fluid, Extracellular Vesicles, Cell Cultures, Joint Therapies

ÍNDICE

1.	Introducción	1
1.1.	Osteoartritis.....	3
1.1.1.	La osteoartritis y su impacto en la sociedad.....	3
1.1.2.	Fisiopatología.....	6
1.1.3.	Tratamiento de la osteoartritis.....	22
1.2.	Vesículas extracelulares.....	27
1.2.1.	Definición	27
1.2.2.	Vesículas extracelulares en la osteoartritis	31
2.	Objetivos	35
3.	Material y métodos.....	39
3.1.	Aislamiento, cultivo y estimulación de sinoviocitos osteoartíticos humanos	41
3.2.	Aislamiento, cultivo y estimulación de condrocitos osteoartíticos humanos	45
3.3.	Aislamiento y purificación de las vesículas extracelulares del líquido sinovial	48
3.4.	Caracterización de las vesículas extracelulares del líquido sinovial.....	54
3.4.1.	TRPS con el qNano de Izon.....	54
3.4.2.	Microscopia Electrónica de Transmisión.....	62
3.5.	Otras técnicas realizadas	65
3.5.1.	Técnica de viabilidad celular medida mediante MTT.....	65
3.5.2.	Técnica de proliferación celular medida mediante BrdU.....	65
3.5.3.	Determinación de mediadores inflamatorios mediante ELISA..	66
3.6.	Análisis estadístico	69

4.	Resultados	71
4.1.	Caracterización del líquido sinovial osteoartrítico humano:	73
4.2.	Caracterización de las vesículas extracelulares del líquido sinovial.....	81
4.2.1.	TRPS con el qNano de Izon.....	81
4.2.2.	Estudio fenotípico mediante ELISA	85
4.2.3.	Microscopia Electrónica de Transmisión.....	88
4.3.	Estudios en cultivo primario de sinoviocitos osteoartríticos humanos	90
4.3.1.	Ensayos tiempo dependientes sin vesículas extracelulares	90
4.3.2.	Ensayos con vesículas extracelulares de líquido sinovial en sinoviocitos osteoartríticos humanos	93
4.4.	Ensayos en cultivos primarios de condrocitos osteoartríticos humanos con vesículas extracelulares de líquido sinovial.....	98
5.	Discusión.....	103
6.	Conclusiones	115
7.	Bibliografía	119
8.	Anexos	137
8.1.	Caracterización de EV mediante análisis proteico (Théry et al., 2018).....	139
8.2.	Comité Ético de Investigación en Humanos	140
8.3.	Comité Ético de Investigación con Medicamentos.....	141
8.4.	Comité Ético de Investigación con Medicamentos.....	142

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Osteoartritis de rodilla (Dolor, 2023).</i>	4
<i>Figura 2. Osteoartritis temprana y Osteoartritis establecida (Fisiosesto, 2024).</i>	9
<i>Figura 3. Vías relevantes para la respuesta inmune frente a la OA (Colombini et al., 2022).</i> ...	10
<i>Figura 4. Papel de los macrófagos residentes sinoviales y los macrófagos inflamatorios en la salud de las articulaciones y la OA (Estrada et al 2021).</i>	15
<i>Figura 5. El papel de las citocinas proinflamatorias en la fisiopatología de la OA (Kapoor et al., 2011).</i>	17
<i>Figura 6. Fórmula estructural del ácido hialurónico (Tamer, 2013).</i>	20
<i>Figura 7. Algoritmo de tratamiento de la OA de rodilla. CV: Cardiovascular, IBP: Inhibidor de la bomba de protones, GI: Gastrointestinal (Adaptada de Bruyère et al., 2014).</i>	26
<i>Figura 8. Esquema de la formación de las vesículas extracelulares (Li et al., 2021).</i>	29
<i>Figura 9. Pre y post procesado de sinovio de rodilla humano con OA. (A) Sinovio articular de humano con OA. (B) Cultivo de SOA humanos alcanzada la confluencia.</i>	42
<i>Figura 10. Esquema de la congelación de los SOA humanos.</i>	43
<i>Figura 11. Pre y post procesado de cartílago de rodilla humano con OA. (A) Cartílago articular de rodilla de persona con OA. (B) Cultivo de COA humanos alcanzada la confluencia.</i>	47
<i>Figura 12. Esquema del aislamiento de COA humanos.</i>	47
<i>Figura 13. Pre y post procesado de líquido sinovial osteoartítico humano. (A) Muestra de líquido sinovial de persona con OA. (B) Líquido sinovial ya procesado y preparado para congelación a –80 °C.</i>	49
<i>Figura 14. Columnas de cromatografía de exclusión por tamaño. (A) Columna Exo-spin™ midi antes hacer pasar la muestra. (B) Columna Exo-spin™ midi con la muestra pasando a través y siendo recogida en un recipiente.</i>	51
<i>Figura 15. Proceso de SEC en columna de Izon (A) Imagen esquemática de una cuenta de resina con un aumento microscópico electrónico. (B) Dibujo esquemático de las moléculas de la muestra</i>	

<i>difundiendo en los poros de las cuentas de resina. (C) Descripción gráfica de la separación: (i) la muestra se aplica a la columna; (ii) las partículas más pequeñas (rosa) se retrasan más que las partículas más grandes (azul); (iii) las partículas más grandes se eluyen primero de la columna (Protocolo Izon).....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 16. Representación esquemática de cómo funciona el TRPS de Izon (Protocolo Izon). ..</i>	<i>55</i>
<i>Figura 17. Las mediciones de magnitud y frecuencia se convierten en tamaño y concentración de partículas mediante la calibración con partículas de tamaño y concentración conocidos. (Protocolo Izon).....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 18. Aparato qNano de IZON.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 19. Imagen del Microscopio TEM HITACHI HT7800 120kV.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 20. Protocolo general de la técnica ELISA.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 21. Número de Muestras de LS representadas por géneros (n=52).....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 22. Representación gráfica de las edades de los pacientes con OA (n=52).</i>	<i>74</i>
<i>Figura 23. Caracterización de los LS según su Grado de transparencia (n=52). (A) Estadística de cada grupo. (B) Muestra de LS Opaco. (C) Muestra de LS Transparente.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 24. Clasificación de los LS según su Color (n=52). (A) Estadística de cada grupo. (B) Muestras de LS Amarillo, Blanco, Incoloro y Rojo.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 25. Clasificación de los LS según su Viscosidad (n=52).</i>	<i>77</i>
<i>Figura 26. Niveles de CRP en el LS de pacientes con OA (n=25).</i>	<i>79</i>
<i>Figura 27. Niveles de IL-18 en el LS de pacientes con OA (n=25).</i>	<i>79</i>
<i>Figura 28. Niveles de IL-6 en el LS de pacientes con OA (n=25).</i>	<i>80</i>
<i>Figura 29. Niveles de HA en el LS y después del filtrado en pacientes con OA (n=25).</i>	<i>81</i>
<i>Figura 30. Análisis de partículas con el qNano. Diámetro de partícula vs. % de Población (por conteo) (n=25).....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 31. Tamaño Medio y Moda de EV en el LS de pacientes con OA (n=25).</i>	<i>83</i>

<i>Figura 32. Concentración de EV/mL presentes en el LS de pacientes con OA (n=25).</i>	<i>83</i>
<i>Figura 33. Cargas medidas con el qNano de IZON (n=25). (A) Cargas Medias en las muestras analizadas de LS de pacientes con OA. (B) Cargas de todas las muestras analizadas de LS de pacientes con OA.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 34. Concentración de CD9 y CD81 presente en EV aisladas y purificadas de LS de pacientes con OA (n=25).</i>	<i>86</i>
<i>Figura 35. Concentración de TSG101 y PDCD6IP presente en EV aisladas y purificadas de LS de pacientes con OA (n=25).</i>	<i>86</i>
<i>Figura 36. Concentración de CNX presente en EV aisladas y purificadas de LS de pacientes con OA (n=25).....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 37. Imagen de EV pequeña con corte transversal realizada a 25k aumentos mediante microscopía TEM (Voltaje de aceleración = 100.0kV).</i>	<i>88</i>
<i>Figura 38. Imagen de EV pequeña con corte longitudinal realizada a 40k aumentos mediante microscopía TEM (Voltaje de aceleración = 100.0kV).</i>	<i>89</i>
<i>Figura 39. Ensayo de Viabilidad Celular MTT en SOA a diferentes pases celulares Pase 0 (P0), Pase 1 (P1) y Pase 2 (P2) (n=6). B: Blanco.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 40. Ensayo de Proliferación en SOA a tiempos 24, 48 y 72 horas (n=6). B: Blanco. Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ y *** = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.</i>	<i>91</i>
<i>Figura 41. Concentración de MMP-13 en SOA en Pase 1 a 48 horas (n=6). Se compararon los dos grupos entre sí. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ y *** = $p<0,001$. Se realizó el método de t test.</i>	<i>92</i>
<i>Figura 42. Ensayo de proliferación celular en SOA a las 48 y 96 horas (n=7). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ y *** = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.</i>	<i>95</i>
<i>Figura 43. Niveles de IL-6 en los sobrenadantes de SOA a las 48 y 96 horas (n=7). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ y *** = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.</i>	<i>96</i>

Figura 44. Niveles de MMP-3 en los sobrenadantes de SOA a las 48 y 96 horas (n=7). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey. 96

Figura 45. Niveles de HA en los sobrenadantes de SOA a las 48 y 96 horas (n=7). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey. 97

Figura 46. Ensayo de proliferación celular en COA a las 48 y 96 horas (n=7). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey. 100

Figura 47. Niveles de IL-6 en los sobrenadantes de COA a las 48 y 96 horas (n=7). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey. 101

Figura 48. Niveles de MMP-13 en los sobrenadantes de COA a las 48 y 96 horas (n=7). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey. 101

Figura 49. Niveles de HA en los sobrenadantes de COA a las 48 y 96 horas (n=7). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey. 102

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Analitos cuantificados, número de catálogo y casa comercial y/o fabricante. 68

Tabla 2. Analíticas de sangre preoperatorias de pacientes con OA (n=12). 78

Tabla 3. MTT a las 48 y 96 horas (n=7). La viabilidad celular de SOA no se modificó en las células estimuladas con IL-1 β y/o EV en comparación con las células no tratadas. 94

Tabla 4. MTT a las 48 y 96 horas (n=7). La viabilidad celular de COA no se modificó en las células estimuladas con IL-1 β y/o EV en comparación con las células no tratadas. 99

ABREVIATURAS

AB	Antibiótico
ABS	Absorbancia
ADAMTS	Desintegrina con motivos de trombospondina tipo 1
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AINEs	Antiinflamatorios No Esteroideos
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BrdU	Bromodesoxiuridina
CNX	Calnexina
COA	Condrocitos Osteoartríticos
CS	Solución de Revestimiento
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM Completo	DMEM con AB y SBF
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
EV	Vesículas Extracelulares
HA	Ácido Hialurónico
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IMSKE	Instituto Musculoesquelético Europeo
LS	Líquido Sinovial
ME	Electrolito de Medición
miARN	ARN Monocatenario micro
MMP	Metaloproteinasas de Matriz
MSC	Células Madre Mesenquimales
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MV	Microvesículas
NF- κ B	Factor Nuclear Kappa B

NP	Nanoporo
OA	Osteoarthritis
PBS	Tampón Fosfato Salino (pH 7,4)
PDCD6IP	Programmed cell death 6-interacting protein
rpm	Revoluciones por minuto
SBF	Suero Bovino Fetal
SEC	Cromatografía de Exclusión por Tamaño
SOA	Sinoviocitos Osteoartríticos
SYSADOA	Fármacos Sintomáticos de Acción Lenta en la OA
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
TRPS	Tunable Resistive Pulse Sensing
TSG101	Gen de Susceptibilidad a Tumores 101
VPM	Módulo de Presión Variable
WS	Solución Humectante

1. Introducción

1.1. Osteoartritis

1.1.1. La osteoartritis y su impacto en la sociedad

La osteoartritis (OA), también conocida como artrosis, es una enfermedad crónica y degenerativa de las articulaciones que afecta principalmente al cartílago. El cartílago recubre los extremos de los huesos en una articulación, proporcionando una superficie suave y flexible que facilita el movimiento sin fricción (Arthritis Foundation, 2023; CDC, 2023; Mayo Clinic, 2023). En la OA, el cartílago se desgasta gradualmente, lo que provoca que los huesos friccionen entre sí. Con el tiempo, este proceso puede causar dolor, inflamación, rigidez y dificultad para mover la articulación afectada (NIAMS, 2017). La OA suele afectar las articulaciones que soportan peso, como las caderas, la columna vertebral y las rodillas, así como las articulaciones de las manos.

La OA de rodilla (Figura 1) es una de las formas más comunes y debilitantes de la enfermedad, que afecta, en este caso, a la articulación de la rodilla. Esta condición causa dolor, dificultades para caminar y deformidad progresiva de la rodilla, siendo más común en personas mayores por el desgaste progresivo asociado con la edad. Los pacientes con OA de rodilla suelen experimentar dolor y rigidez al intentar levantarse después de estar sentados durante periodos de tiempo prolongados. Este malestar inicial tiende a ceder con los primeros pasos, pero vuelve a manifestarse después de caminar largas distancias. Generalmente, el dolor disminuye progresivamente con el reposo (Heras, 2023).

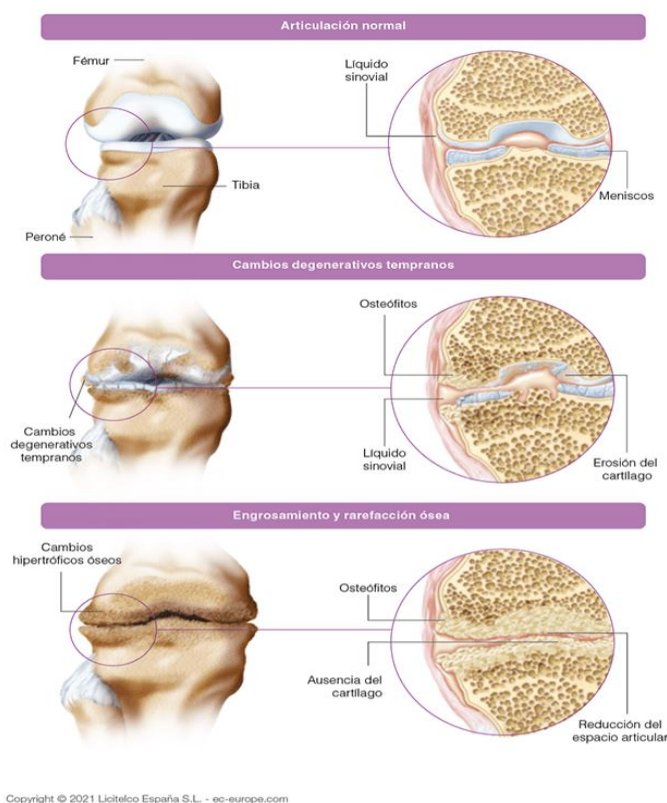


Figura 1. Osteoartritis de rodilla (Dolor, 2023).

La OA tiene un impacto significativo en la sociedad y los servicios de salud. Representa el 50% de las consultas relacionadas con el sistema musculoesquelético y más del 20% de todas las consultas médicas (Giménez Basallote et al., 2017). Además, la OA constituye el 15% de las asistencias en urgencias y es el segundo motivo de consulta más frecuente en Atención Primaria. A pesar de la inversión en su tratamiento, aproximadamente el 70% de los pacientes no observan una mejora significativa (Vitaloni et al., 2020), y la mayoría no logra controlar eficazmente el dolor asociado. La OA afecta a más de 242 millones de personas en todo el mundo, impactando considerablemente en la movilidad y calidad de vida de los pacientes, así como en la de sus cuidadores y familiares.

Esta enfermedad crónica articular está influida por múltiples factores de riesgo, siendo la edad el más significativo (Zhang & Jordan, 2010; Felson, 2014; Warner & Valdes, 2016). A medida que envejecemos, aumenta la probabilidad de desarrollar OA debido al desgaste natural del cartílago (Blanco García et al., 2020). Entre el 20% y el 45% de las personas mayores de 45 años presentan algún grado de OA (Zhang & Jordan, 2010), y la prevalencia de OA sintomática de la rodilla es más pronunciada entre los 55 y 64 años (Shane & Loeser, 2010). Las personas mayores de 65 años representan aproximadamente el 43% de los casos de OA, mientras que aquellos mayores de 45 años constituyen aproximadamente el 88% (Shane & Loeser, 2010; Arthritis Foundation, 2023). Comprender estos aspectos es fundamental para promover un diagnóstico temprano y un manejo efectivo de la enfermedad, ya que el envejecimiento, aunque es un factor de riesgo importante, no es una consecuencia inevitable de la OA (Arthritis Foundation, 2023).

Por otro lado, el género también desempeña un papel crucial en el desarrollo y progresión de la OA. Las mujeres presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de OA en comparación con los hombres, con una mayor prevalencia de OA sintomática en la rodilla y la cadera (Zhang & Jordan, 2010; Tschon et al., 2021). Además, las mujeres tienden a experimentar un dolor más severo debido a la OA que los hombres, posiblemente debido a los cambios hormonales y a una mayor sensibilidad al dolor (Peshkova et al., 2022). Estas diferencias de género sugieren que factores hormonales, como la menopausia, pueden influir en la enfermedad, agravando su prevalencia y sintomatología (Mayo Clinic, 2023).

Además, la OA muestra variaciones en su prevalencia según la localización en el cuerpo. La OA cervical afecta aproximadamente al 10,10% de la población, mientras que la OA lumbar se presenta en un 15,52% de los casos. La OA de la mano afecta alrededor del 7,73% de la población, y la OA de cadera y rodilla tiene una prevalencia del 5,13% y 13,83%, respectivamente (CDC, 2023). La obesidad y el sobrepeso también aumentan el riesgo de desarrollar OA al ejercer una carga adicional sobre las articulaciones que soportan el peso del cuerpo (Arthritis Foundation, 2023; CDC, 2023).

La actividad física intensa puede aumentar el riesgo de OA; sin embargo, el ejercicio regular y moderado puede ser beneficioso. Enfermedades concomitantes, como la artritis

reumatoide, también constituyen un factor de riesgo de sufrir OA en las articulaciones afectadas (Arthritis Foundation, 2023). Lesiones articulares previas, tanto traumáticas como las producidas por movimientos repetitivos, aumentan el riesgo de desarrollar OA. Además, hay evidencia de una predisposición genética en la OA. Aunque varios estudios han identificado genes vinculados a la OA, la influencia genética de esta enfermedad se estima entre el 35% y el 65% (Fernández-Moreno et al., 2008).

Algunos de los genes asociados con la OA incluyen:

- COL11A1 y COL11A2: Asociados con la aparición temprana de la OA (Spector & MacGregor, 2004).
- COL1A1 y COL2A1: Vinculados a la reducción de la OA en las caderas femeninas y a la aparición temprana de la OA, respectivamente (Fernández-Moreno et al., 2008).
- SUPT3H, DOT1L, GDF5, MCF2L, NCOA3, ALDH1A2, ASTN2 y VDR: Otros genes identificados como involucrados en la OA (Rodríguez-Fontenla et al., 2015) (Aubourg et al., 2022).

1.1.2. Fisiopatología

Osteoartritis Temprana (OA Preclínica)

La osteoartritis temprana, también denominada OA preclínica, representa las fases iniciales de la enfermedad antes de que los síntomas clínicos sean evidentes. En esta etapa, se pueden observar cambios estructurales en las articulaciones afectadas incluso antes de que el paciente presente síntomas perceptibles (Sánchez Martín, 2013; Manual Merck, 2022). Estos cambios incluyen la degeneración del cartílago articular y alteraciones en los tejidos periarticulares, como ligamentos, membrana sinovial, hueso subcondral, meniscos y almohadilla grasa.

Las herramientas avanzadas de imagen, como la resonancia magnética y la ecografía, desempeñan un papel crucial en la detección temprana de cambios estructurales pre-radiográficos en diversos tejidos articulares, incluyendo el hueso periarticular, el cartílago articular, los ligamentos, los meniscos, la membrana sinovial y el tejido adiposo (Favero et al., 2015; Manual Merck, 2022). Identificar precozmente la OA temprana es fundamental para implementar intervenciones terapéuticas y cambios en el estilo de vida que puedan retrasar su progresión y minimizar su impacto en la calidad de vida (Artrosis, 2017).

Es esencial establecer una nueva definición de OA temprana basada en criterios clínicos y biomarcadores específicos, o una combinación de ambos, para identificar de manera más precisa a los pacientes con alto riesgo de progresión que se beneficiarían de intervenciones tempranas y personalizadas (Favero et al., 2015). En este contexto, los modelos animales de OA permiten investigar los mecanismos y eventos de la fase preclínica, especialmente en articulaciones más pequeñas, permitiendo la reproducción controlada de factores de riesgo y el análisis detallado de cambios moleculares, estructurales y funcionales en los tejidos articulares antes de que aparezcan los síntomas clínicos (Ríos et al., 2022).

Osteoartritis Establecida

Por otro lado, la OA establecida se refiere a la etapa avanzada o crónica de la enfermedad, en la que los síntomas clínicos son evidentes. Durante esta fase, los pacientes experimentan dolor, rigidez articular, pérdida de flexibilidad y sensibilidad en las articulaciones afectadas (Artrosis, 2017; Manual Merck, 2022). El diagnóstico de la OA establecida se realiza mediante la evaluación de los síntomas reportados por el paciente, el examen físico de las articulaciones y, en ocasiones, pruebas complementarias como radiografías, resonancia magnética u otras técnicas de imagen avanzadas (Artrosis, 2017).

La OA progresa a través de distintas etapas centradas en el deterioro del cartílago, con variaciones en la clasificación según diversas fuentes, generalmente reconocidas en cuatro o cinco etapas (Group OS, 2016; Healthline, 2018; Sen & Hurley, 2023):

- Etapa 1: Desgaste mínimo del cartílago articular, con poco o ningún dolor en la zona afectada.
- Etapa 2: OA leve, caracterizada por debilitamiento del cartílago, formación de espolones óseos y rigidez después de periodos de inactividad. Puede ser necesario el uso de ortesis para mejorar la estabilidad.
- Etapa 3: OA moderada, con adelgazamiento significativo del cartílago y su desaparición en ciertas áreas, exponiendo el hueso subyacente. Esto provoca inflamación articular y malestar durante actividades cotidianas.
- Etapa 4: OA severa, donde el cartílago está casi completamente ausente, permitiendo el roce directo de los huesos articulares. Se produce dolor intenso, rigidez, pérdida de movilidad y una importante respuesta inflamatoria en la articulación, agravada por el crecimiento de espolones óseos (osteofitos).

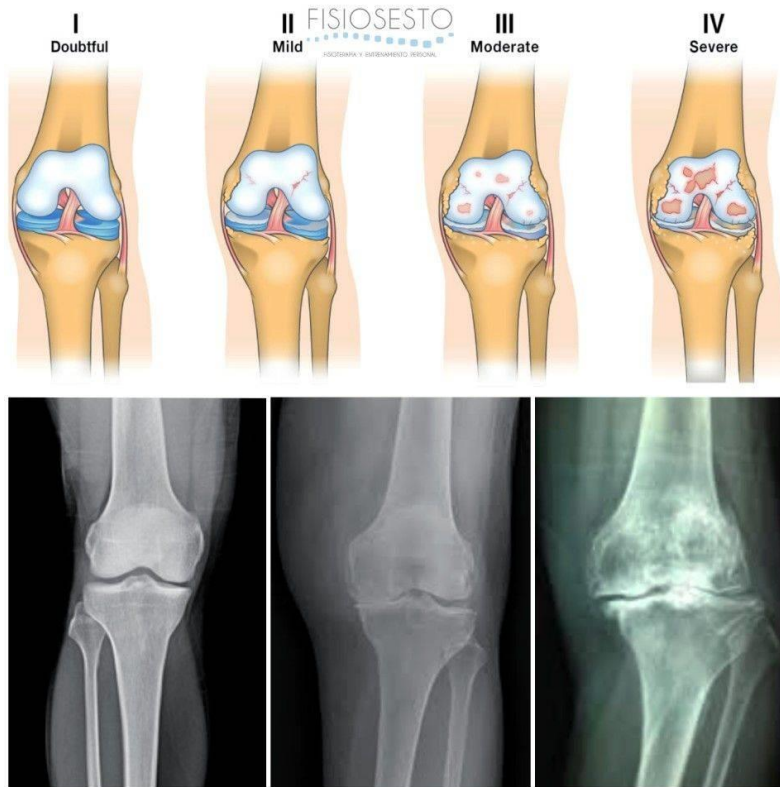


Figura 2. Osteoartritis temprana y Osteoartritis establecida (Fisiosesto, 2024).

En la Figura 2 se muestra la progresión gradual de la OA por rayos X, lo que ayuda a comprender la gravedad de la enfermedad en relación con el deterioro del cartílago y los síntomas asociados.

1.1.2.1. Respuesta celular a la OA

La respuesta celular ante la OA implica la activación del sistema inmunológico, especialmente del sistema inmunitario innato, siendo las células innatas las primeras en

responder (Figura 3). La OA ya no se considera simplemente una condición de desgaste, sino más bien una enfermedad impulsada por proteasas que involucra inflamación de bajo grado. Diversas células del sistema inmunológico, como las células T, células B y macrófagos, participan en los procesos inflamatorios y la patogénesis de la enfermedad. Estas células se infiltran en los tejidos articulares en respuesta a factores genéticos, metabólicos o mecánicos que afectan el cartílago y el sinovio (Haseeb & Haqqi, 2013; Orlowsky & Kraus, 2015; Miller et al., 2020).

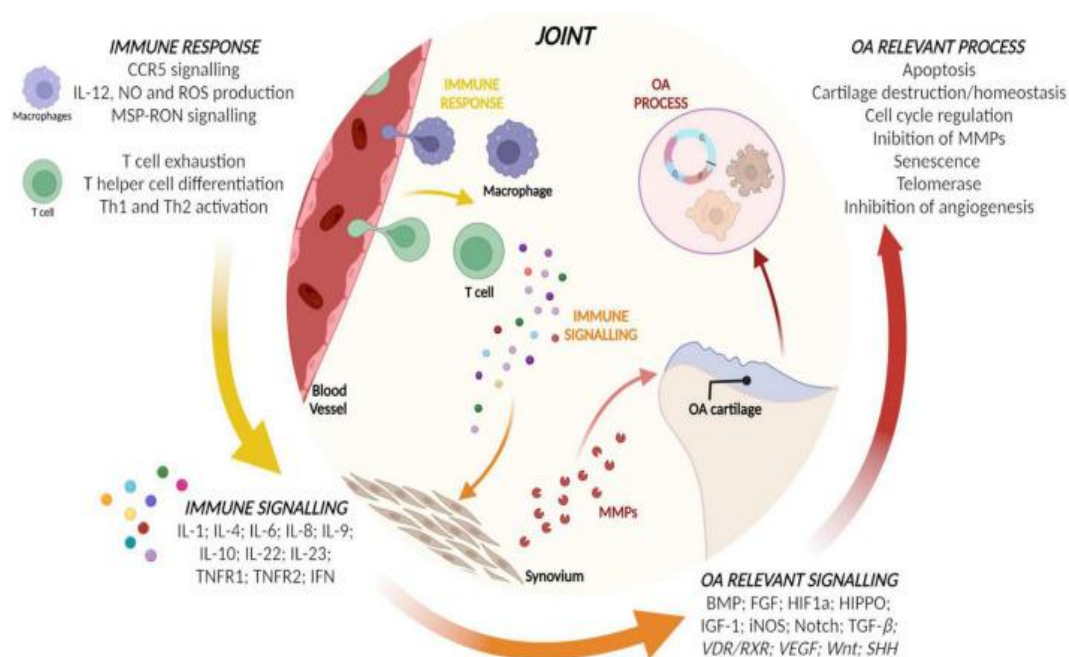


Figura 3. Vías relevantes para la respuesta inmune frente a la OA (Colombini et al., 2022).

El **cartílago** es un tejido conectivo especializado que se encuentra en varias partes del cuerpo, como las articulaciones, las orejas y la nariz. Su función principal es proporcionar estructura y soporte a las articulaciones, así como permitir un movimiento suave y sin

fricción entre los huesos. Está compuesto principalmente por **condrocitos** que se encuentran incrustados en la matriz extracelular. Por otro lado, el sinovio, compuesto mayoritariamente por **sinoviocitos**, es una membrana delgada que recubre las articulaciones y produce un líquido lubricante llamado **líquido sinovial** (LS). Este líquido ayuda a reducir la fricción entre las superficies articulares y proporciona nutrientes a las células del cartílago.

Condrocitos y su Rol en la OA

Los **condrocitos** son las células principales presentes en el cartílago sano y desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de su estructura y función (Goldring, 2012). Ante lesiones físicas, los condrocitos responden deteniendo la producción de factores anabólicos y desencadenando respuestas catabólicas, lo que conduce a un mayor daño del cartílago (Haseeb & Haqqi, 2013). En la OA, los condrocitos muestran varios patrones de reacción:

- Proliferación y muerte celular (apoptosis): Los condrocitos pueden experimentar un aumento en la proliferación como un intento de reparar el cartílago dañado. Sin embargo, una proliferación excesiva o descontrolada puede llevar a un desequilibrio en la homeostasis del cartílago (Sandell & Aigner, 2001; Li et al., 2017). Además, la apoptosis, o muerte celular programada, también juega un papel en la progresión de la OA, ya que la eliminación de condrocitos dañados puede contribuir a la degradación del cartílago.
- Cambios en la actividad sintética: En la OA, los condrocitos alteran su actividad sintética, resultando en una producción anormal de componentes de la matriz extracelular, como el colágeno II y los proteoglicanos. Estos cambios pueden contribuir a la alteración de la composición e integridad de la matriz del cartílago (Sandell & Aigner, 2001; Miller et al., 2020).
- Cambios en la degradación del cartílago: Aunque los condrocitos no son responsables directos de la degradación del cartílago, los condrocitos osteoartróticos (COA) pueden sobreexpresar metaloproteinasas de matriz (MMP), incluyendo colagenasas,

estromelisin y gelatinasas. Estas enzimas degradan la matriz del cartílago, alterando el equilibrio entre la síntesis y degradación de la matriz. Este desequilibrio conduce a una pérdida neta de cartílago y contribuye a la progresión de la enfermedad (Haseeb & Haqqi, 2013; Nurul et al., 2021).

- Pérdida de la función condrocítica: Los COA pueden sufrir cambios fenotípicos, adoptando un fenotipo similar al de los fibroblastos. Esta modulación fenotípica puede afectar su capacidad para mantener la integridad estructural del cartílago y promover la producción de mediadores inflamatorios (Semenistaja et al., 2023).
- Formación de osteofitos: Los COA también contribuyen a la formación de osteofitos, que son crecimientos óseos anormales que se desarrollan en las articulaciones afectadas por OA (Sandell & Aigner, 2001; Haseeb & Haqqi, 2013).

Sinoviocitos y su Influencia en la OA

En el contexto de la OA, los **sinoviocitos**, especialmente los sinoviocitos tipo fibroblasto, desempeñan un papel crucial, siendo significativa su participación en los procesos inflamatorios dentro de la articulación. Estas células, presentes en la membrana sinovial, son responsables de la producción del LS y juegan un papel clave en el desarrollo de la OA al contribuir a la inflamación sinovial (Blom & van den Berg, 2007). Diversos estudios han demostrado una asociación entre la inflamación sinovial, la progresión radiográfica y el avance del dolor en la OA (Mathiessen & Conaghan, 2017; Maglaviceanu et al., 2021; Sanchez-Lopez et al., 2022). La alteración sinovial en la OA conduce a la reducción en la producción de lubricina y ácido hialurónico (HA), los cuales actúan protegiendo el cartílago (Damerau et al., 2022). Este fenómeno resulta en una disminución de la producción del LS, contribuyendo así al desgaste articular y a la degradación del cartílago (Han et al., 2020), lo que los convierte en un objetivo potencial para intervenciones terapéuticas.

Además, los sinoviocitos tipo fibroblasto desempeñan un papel significativo en la sinovitis asociada a la OA a través de diversos mecanismos. La activación de los sinoviocitos y su producción de mediadores proinflamatorios son elementos fundamentales en la

patogénesis de la OA (Mathiessen & Conaghan, 2017; Han et al., 2020). La interacción entre los macrófagos sinoviales, los sinoviocitos y el LS, también contribuye a respuestas celulares catabólicas y proinflamatorias en la OA (Li et al., 2021; Semenistaja et al., 2023). Citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), producidas por los sinoviocitos osteoartíticos (SOA), pueden inducir la secreción de proteasas por los condrocitos, indicando una posible comunicación entre el sinovio y otros tejidos articulares (Thomson & Hilkens, 2021). Estudios recientes han revelado que los factores inflamatorios relacionados con la OA activan la vía de señalización Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B) en los SOA (Han et al., 2020). En particular, los SOA de tipo fibroblasto en el tejido que reviste las articulaciones experimentan alteraciones en las áreas que presentan mayor dolor en individuos con OA, contribuyendo así a la inflamación articular y al crecimiento y supervivencia de las células nerviosas. Esta inflamación sinovial se asocia directamente con la intensidad del dolor en pacientes con OA de rodilla (Nanus et al., 2021).

Por lo tanto, los condrocitos y los sinoviocitos tipo fibroblasto desempeñan un papel crucial en la inflamación sinovial y la patogénesis de la OA, constituyendo un enfoque clave para entender la enfermedad y desarrollar posibles estrategias terapéuticas (Han et al., 2020; Thomson & Hilkens, 2021; Zhang et al., 2021; Knights et al., 2023).

Papel de las Células T y B en la OA

Las **células T** desempeñan un papel significativo en la inmunopatogénesis de la OA, promoviendo la inflamación, la degeneración del cartílago y la remodelación articular. En particular, las células TH17, presentes en el sinovio y el LS, contribuyen a la progresión de la OA, mientras que las células T reguladoras se consideran inmunosupresoras y pueden reducir los efectos de las células TH17. Además, las células T activadas también pueden contribuir a la destrucción articular en la OA al inducir la producción de colagenasa en la membrana sinovial (Sakkas & Platsoucas, 2007; Saejung et al., 2017; Keller et al., 2022).

En consecuencia, las células T participan en la regulación de la homeostasis inflamatoria de la articulación y se consideran células importantes en la patogénesis de la OA.

El papel de las **células B** en la OA es un área de investigación en curso y aún no se comprende completamente. Sin embargo, la evidencia emergente sugiere que las células B podrían influir en la patogénesis de la enfermedad. Diversos estudios han descrito alteraciones en la capacidad de proliferación y diferenciación de las células B en la OA (Xie et al., 2023). Además, se ha investigado que las células B articulares podrían desempeñar un papel en la regulación del sistema inmunológico, ayudando a limitar la autoinmunidad. En el contexto de la inflamación sinovial crónica y la degradación del cartílago, las células B podrían contribuir a evitar que el sistema inmunológico ataque de manera descontrolada los tejidos propios del cuerpo. Esta capacidad de las células B para regular la respuesta inmunitaria es importante, ya que una inflamación sinovial persistente y la degradación del cartílago son características clave de la OA. Al limitar la autoinmunidad, las células B pueden ayudar a reducir el daño a las articulaciones y mitigar la progresión de la enfermedad (Burt & Scanzello, 2023).

Macrófagos y su Impacto en la OA

Los **macrófagos** desempeñan un papel crítico en la fisiopatología de la OA. Estas células están involucradas en la inducción de mediadores inflamatorios y son un componente importante del sistema fagocítico mononuclear. Esto significa que contribuyen significativamente a la inflamación sinovial, la descomposición del cartílago y la formación de osteofitos (Chen et al., 2020; Wu et al., 2020; Chen et al., 2022).

Los macrófagos poseen una capacidad intrínseca que les permite migrar a sitios de lesión o inflamación, incluyendo las articulaciones afectadas por la OA. En esta enfermedad, los macrófagos pueden polarizarse hacia dos fenotipos distintos: M1 o M2. La regulación de estos fenotipos es crucial para el tratamiento de la OA. Los macrófagos M1 son proinflamatorios, mientras que los M2 son antiinflamatorios y promueven la reparación de los tejidos dañados. Los macrófagos activados pueden secretar citocinas proinflamatorias,

que juegan un papel significativo en la pérdida ósea observada en enfermedades inflamatorias del hueso. Su capacidad para reconocer, internalizar y destruir sustancias perjudiciales en respuesta a señales inflamatorias los convierte en actores clave en la patogénesis de la OA (Chen et al., 2020; Wu et al., 2020; Chen et al., 2022).

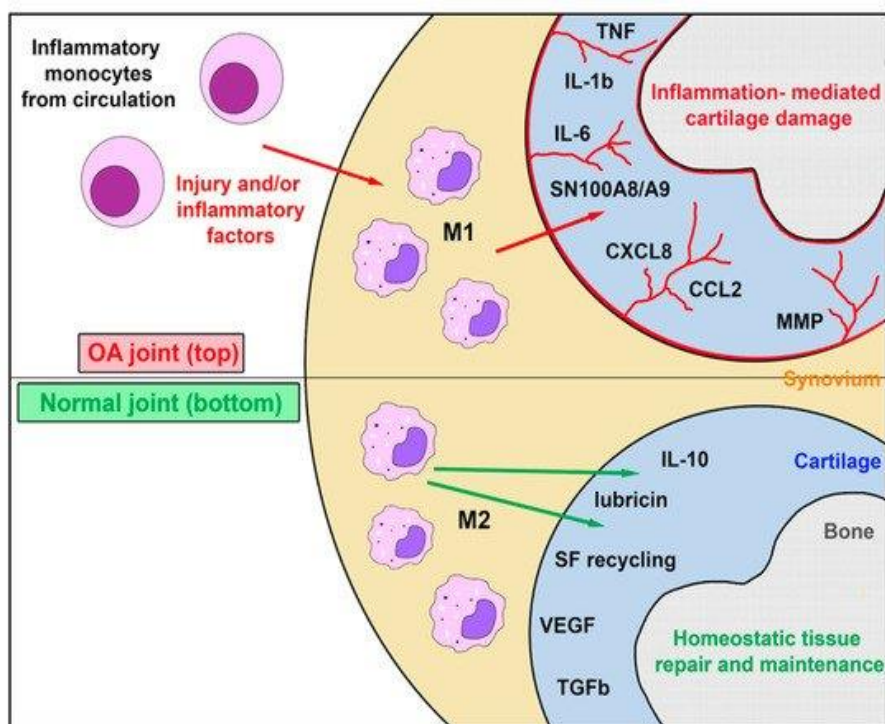


Figura 4. Papel de los macrófagos residentes sinoviales y los macrófagos inflamatorios en la salud de las articulaciones y la OA (Estrada et al 2021).

En la Figura 4 se ilustra la interacción entre los macrófagos endógenos de células sinoviales, que existen como macrófagos M2 en una articulación sana, y la población de macrófagos inflamatorios M1 reclutados a partir de monocitos inflamatorios en la sangre. Estos monocitos se reclutan en respuesta a citocinas producidas durante la inflamación articular que ocurre en la progresión de la OA. Mientras que los macrófagos M1 pueden

asumir un fenotipo M2 a medida que la inflamación disminuye, los macrófagos M2 endógenos generalmente no se convierten en macrófagos M1. Los factores secretados por las poblaciones de macrófagos sinoviales M1 y M2 en la salud y la enfermedad son complejos y en gran medida distintos, lo que resalta la diversidad funcional de estos macrófagos en la respuesta inmunológica y la patogénesis de la OA (Estrada et al., 2021).

1.1.2.2. Mediadores inflamatorios implicados en la OA

Las prostaglandinas y los leucotrienos son mediadores lipídicos producidos por células involucradas en procesos inflamatorios. Estos mediadores son fundamentales para mantener una correcta salud articular y desempeñan un papel crucial en la OA (Miller et al., 2020; Sánchez-López et al., 2022).

En cuanto a la inflamación articular, las prostaglandinas, especialmente las de la serie E, promueven la vasodilatación, la contracción de los músculos lisos y la generación de dolor (Sahap Atik, 1990). Los leucotrienos, como el leucotrieno B₄, actúan como potentes quimioatrayentes para las células del sistema inmunitario, amplificando la respuesta inflamatoria (Robinson et al., 2016).

Un aumento en la producción de prostaglandinas en el tejido inflamado puede ocasionar un daño tisular excesivo. Por lo tanto, la regulación de la expresión de la enzima COX-2 es crucial para la síntesis de prostaglandinas durante la inflamación en la OA (López-Armada et al., 2007; Miller et al., 2020). Se ha observado un aumento en la actividad del leucotrieno B₄ en pacientes con OA, sugiriendo su implicación en la regulación de las proteínas de la matriz extracelular del cartílago. Junto con otras citocinas proinflamatorias, los leucotrienos pueden inducir la síntesis de óxido nítrico, agravando el daño en las células del cartílago articular (Sahap Atik, 1990; López-Armada et al., 2007; Robinson et al., 2016).

La respuesta inmunitaria innata, en la que participan tanto las prostaglandinas como los leucotrienos, desempeña un papel significativo en la OA. Durante esta enfermedad, se

produce una respuesta inflamatoria crónica en las articulaciones afectadas, que involucra la liberación de diversas citocinas proinflamatorias (Figura 5), tales como la IL-1 β , el TNF- α y la interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas son producidas principalmente por células del sistema inmunitario innato, como macrófagos y células sinoviales (Kapoor et al., 2011; Nurul et al., 2021).

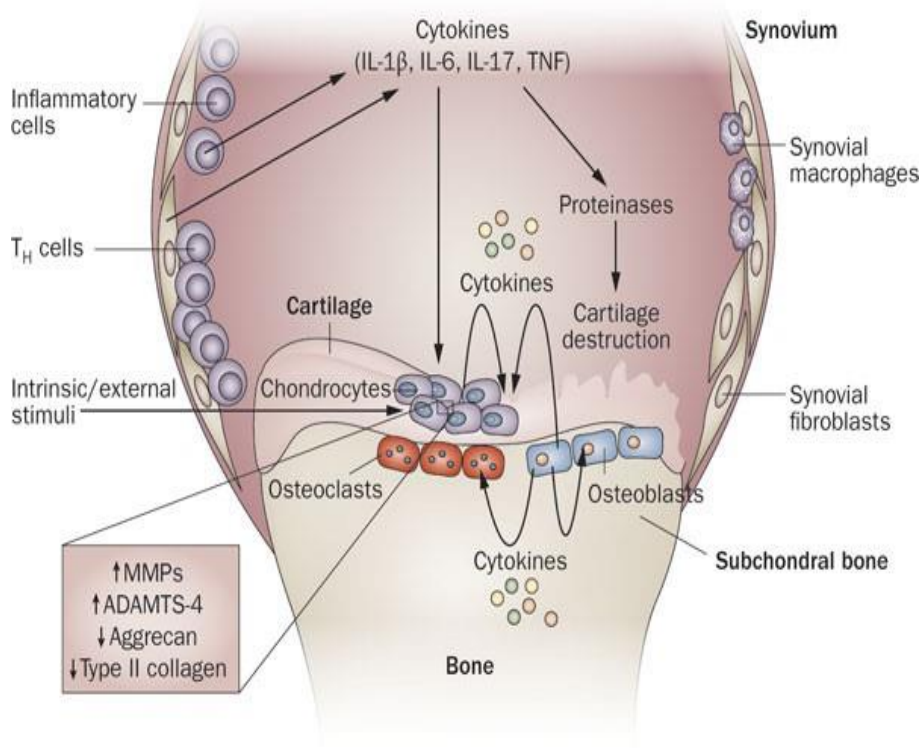


Figura 5. El papel de las citocinas proinflamatorias en la fisiopatología de la OA (Kapoor et al., 2011).

Las citocinas derivadas de los macrófagos, como la IL-1 β y el TNF- α , son factores clave en la descomposición del cartílago en la OA. La activación de los macrófagos sinoviales es crucial para la producción de MMP y el daño del cartílago en modelos animales de OA.

Diversos estudios demuestran que la eliminación específica de los macrófagos sinoviales en cultivos celulares resulta en una disminución significativa de la producción de citocinas proinflamatorias, como la IL-1 β , el TNF- α , la IL-6 y la IL-8, indicando que estos macrófagos son una fuente importante de estas moléculas (Wu et al., 2020; Chen et al., 2022; Sánchez-López et al., 2022).

Las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α están sobreexpresadas tanto en el cartílago como en el tejido sinovial durante la OA y actúan sinérgicamente en la degradación del cartílago articular. Estas citocinas estimulan la sobreexpresión de enzimas catabólicas, tales como las MMP-1, MMP-3 y MMP-13, y promueven la producción de ADAMTS-4 y ADAMTS-5, enzimas implicadas en la degradación de proteoglicanos, componentes esenciales de la matriz extracelular del cartílago. Además, la IL-1 β suprime el mecanismo anabólico al inhibir la expresión de colágeno tipo II y proteoglicanos, componentes cruciales para mantener la integridad estructural del cartílago. La IL-1 β también induce apoptosis en condrocitos, contribuyendo a la disminución del número de estas células durante la OA (Kapoor et al., 2011; Haraden et al., 2019; Nurul et al., 2021).

La IL-6, producida por condrocitos y sinoviocitos y presente en el LS, es liberada en respuesta a diversas citocinas, incluyendo IL-1 β y TNF- α , contribuyendo al proceso catabólico al aumentar la expresión de MMP-1 y MMP-13, amplificando la degradación del cartílago (Li et al., 2021; Knights et al., 2023). Además, la prostaglandina E2, que se ve aumentada durante la OA, ha demostrado estimular la síntesis de IL-6 en sinoviocitos y condrocitos humanos (Semenistaja et al., 2023).

Otros factores inflamatorios y citocinas, como Oncostatina M, IL-7, IL-8, factor inhibidor de la leucemia, IL-11, IL-17 e IL-18, así como citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13, también desempeñan un papel en el metabolismo de los condrocitos y el desarrollo de la OA (Sakkas & Platsoucas, 2007; Saejung et al., 2017; Keller et al., 2022).

Estas vías catabólicas estimuladas por las citocinas proinflamatorias conducen a la producción de MMP, incluyendo las colagenasas (MMP-13) y las estromelisinases (MMP-3), que participan en la degradación del cartílago y otros componentes de la matriz extracelular.

La MMP-13 se produce en los COA y puede degradar el colágeno tipo II y el agregano, componentes clave del cartílago. La MMP-3 está involucrada en la escisión de varios componentes de la matriz extracelular, como proteoglicanos y colágenos (Han et al., 2020; Thomson & Hilken, 2021; Knights et al., 2023).

1.1.2.3. Importancia del líquido sinovial en la articulación

El LS, también conocido como líquido articular, es un fluido viscoso y no newtoniano, que se encuentra presente en las cavidades de las articulaciones sinoviales. Este líquido, tiene una consistencia similar a la clara de huevo y sirve para reducir la fricción entre los cartílagos articulares, siendo indispensable para el correcto funcionamiento de las articulaciones (McCarty et al., 2011; Seidman & Limaïem, 2023). Este líquido es producido en la membrana sinovial que recubre las superficies articulares y actúa como lubricante biológico, permitiendo un movimiento suave, especialmente en las articulaciones de carga como rodillas y caderas (Tamer, 2013; Petty, 2016; Seidman & Limaïem, 2023).

En cuanto a su composición, el LS se caracteriza por su alto contenido de agua, representando aproximadamente el 90% de su volumen total. Esta base acuosa le confiere las propiedades de fluidez y viscosidad necesarias para una lubricación adecuada y movilidad de las superficies articulares (Petty, 2016). Un componente esencial en el LS es el HA (Figura 6), un polisacárido de alto peso molecular producido por los sinoviocitos tipo fibroblasto en la membrana sinovial. El HA forma una estructura gelatinosa que recubre las superficies articulares, proporcionando una lubricación viscoelástica esencial para reducir la fricción y el desgaste durante los movimientos articulares (Tamer, 2013; Petty, 2016).

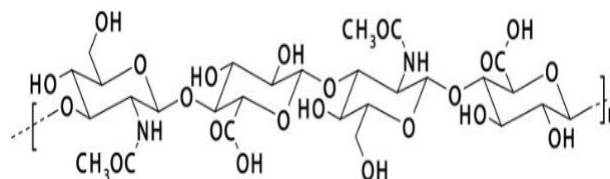


Figura 6. Fórmula estructural del ácido hialurónico (Tamer, 2013).

Otro componente clave es la lubricina, producida por los condrocitos del cartílago articular y contenida en el fluido intersticial. Al igual que el HA, esta proteína también contribuye significativamente a la lubricación del LS. Además, el LS contiene otras proteínas como la albúmina, globulinas y enzimas específicas que regulan el equilibrio osmótico, el transporte de nutrientes y la modulación de la respuesta inmunitaria local (McCarty et al., 2011). Los electrolitos presentes en el LS, como el sodio, potasio y calcio, mantienen el equilibrio osmótico y participan en funciones celulares fundamentales, como la transmisión de señales y el transporte de moléculas (Bay-Jensen et al., 2016). Aunque en menor cantidad, el LS también contiene lípidos, como ácidos grasos y fosfolípidos, esenciales para preservar la integridad de las membranas celulares y contribuir a la lubricación y firmeza de las superficies articulares (Bay-Jensen et al., 2016).

Componentes como proteasas, collagenasas y prostaglandinas son cruciales en la homeostasis del cartílago y el hueso, participando en la síntesis de colágeno, funciones inmunológicas, desarrollo y apoptosis. Las proteasas, aunque esenciales, requieren un control estricto de su actividad proteolítica para prevenir efectos no deseados. Las collagenasas descomponen el colágeno en la matriz extracelular, y niveles elevados se asocian comúnmente con enfermedades inflamatorias como la OA. (Al-Haik et al., 1984; Seidman & Limaïem, 2023). Además de estos componentes, el LS contiene factores de crecimiento y citocinas que regulan procesos fisiológicos y patológicos en las articulaciones, como la respuesta inflamatoria, la reparación y la regeneración de tejidos (Petty, 2016).

El LS facilita el suministro de nutrientes a las células articulares y contribuye a la eliminación eficiente de desechos metabólicos, como el dióxido de carbono, manteniendo

un equilibrio metabólico en las articulaciones (Bay-Jensen et al., 2016; Petty, 2016). El equilibrio osmótico en las articulaciones también lo regula el LS gracias a los electrolitos que contiene y son esenciales para la estabilidad celular y el funcionamiento óptimo de procesos metabólicos (Bay-Jensen et al., 2016). También juega un papel en la respuesta inmunológica local, ya que contiene células inmunitarias como leucocitos que defienden contra microorganismos invasores y modulan la respuesta inflamatoria en caso de lesiones o infecciones. Adicionalmente, el LS participa en la reparación y regeneración de tejidos articulares gracias a factores de crecimiento y citocinas que estimulan la proliferación celular (Petty, 2016).

En el contexto de la OA, el LS desempeña un rol crucial en la fisiopatología de la enfermedad, donde se observan cambios significativos en su composición y propiedades, contribuyendo al desarrollo y progresión de la OA (Hoff et al., 2013; Sánchez-López et al., 2022). En la OA, se evidencia una disminución en la viscosidad y lubricación del LS, asociada a la reducción de componentes como el HA, lo que incrementa la fricción y el desgaste, favoreciendo la degeneración y daño del cartílago articular (Haraden et al., 2019).

La presencia elevada de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α y de prostaglandinas en el LS de pacientes con OA, no solo contribuye a la inflamación crónica, sino que también juega un papel crucial en el daño articular (Sánchez-López et al., 2022). Esta presencia elevada de citocinas proinflamatorias también conlleva un aumento en la concentración de enzimas degradantes como las MMP, en el LS de pacientes con OA, favoreciendo la degradación del cartílago (Haraden et al., 2019). En este contexto, las alteraciones identificadas en la respuesta inmunológica del LS de pacientes con OA, incluyendo un aumento en la concentración de células inflamatorias y disfunción de las células inmunitarias, sugieren un área prometedora de investigación para entender mejor la enfermedad y desarrollar nuevos enfoques terapéuticos (Mathiessen & Conaghan, 2017).

1.1.3. Tratamiento de la osteoartritis

El tratamiento de la OA tiene como objetivo principal mejorar la calidad de vida del paciente mediante la reducción del dolor, la inflamación y la discapacidad. Para lograr esto, se utilizan diversas alternativas, que van desde medidas preventivas hasta opciones farmacológicas y, en ciertos casos, intervenciones quirúrgicas, como las realizadas en caderas y rodillas. Además, la implementación de programas de rehabilitación es fundamental para frenar el deterioro del cartílago y la progresión de la enfermedad, contribuyendo así a una gestión integral y efectiva de la OA.

Medidas preventivas higiénico-dietéticas:

1. Alimentación saludable y equilibrada: La obesidad y la OA están relacionadas, ya que el exceso de peso aumenta la carga sobre las articulaciones, acelerando el desarrollo de la enfermedad. Perder peso puede aliviar esta sobrecarga y ayudar a frenar su progresión. Es fundamental mantener un índice de masa corporal saludable y seguir una dieta equilibrada para preservar la salud articular.
2. Ejercicio físico aeróbico habitual: El ejercicio suave o moderado es beneficioso para las articulaciones, siempre adaptado a la condición física y supervisado por especialistas. Actividades como caminar, montar en bicicleta o nadar son preferibles a deportes de impacto. Mantener una rutina de ejercicio regular es clave para la salud articular.
3. Dispositivos de apoyo y cuidado postural: La aplicación de férulas, bastones o plantillas puede ser beneficiosa para el manejo de la OA al mantener en reposo las articulaciones doloridas y reducir la carga sobre ellas. Además, el uso de bastones o muletas en casos de OA en rodilla o cadera proporciona apoyo adicional. Elegir calzado con suela blanda y gruesa, mantener una postura correcta, descansar adecuadamente y evitar cargas pesadas, movimientos repetitivos y posturas prolongadas son medidas fundamentales para controlar el dolor articular y prevenir lesiones.
4. Otras medidas complementarias: Para aliviar los síntomas de la OA, se pueden considerar terapias como masajes con hielo, baños de agua caliente o parafina, y la

hidroterapia en balnearios con aguas termales. Estas medidas complementarias pueden proporcionar alivio y bienestar físico y emocional en pacientes con OA.

Tratamiento farmacológico:

El tratamiento farmacológico de la OA se basa en una combinación de medicamentos destinados a aliviar los síntomas, mejorar la función articular y frenar la progresión de la enfermedad. Esta estrategia terapéutica se clasifica en dos categorías principales: los medicamentos de acción rápida, que alivian la sintomatología y medicamentos de acción lenta, que buscan modificar el curso de la enfermedad. Esta clasificación se muestra en la Figura 7.

En cuanto a los fármacos de acción rápida tendríamos:

- Analgésicos: El paracetamol se recomienda para la OA leve y de inicio sin presencia de sinovitis. Puede tomarse a largo plazo, pero está contraindicado en personas con enfermedad hepática crónica y alcoholismo. Se debe tener precaución en pacientes asmáticos, con problemas renales, daño hepático no crónico y aquellos con riesgo gastrointestinal o cardiovascular.
- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): Ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco y celecoxib se utilizan en pacientes con OA y sinovitis que no han respondido a analgesia simple. Estos medicamentos reducen el dolor y la inflamación en las articulaciones afectadas. Se recomienda usar la dosis mínima efectiva durante el menor tiempo posible para reducir el riesgo de efectos secundarios.
- Tratamientos intraarticulares: Los corticosteroides intraarticulares proporcionan un alivio rápido y temporal al reducir la inflamación y el dolor. El HA intraarticular se utiliza para aliviar el dolor artrósico en pacientes que no responden a los AINEs.
- Opioides: La codeína, tramadol y dextropropoxifeno son opioides menores, mientras que el fentanilo, la oxycodona, el tapentadol y la morfina son opioides fuertes. Se utilizan en casos de dolor articular severo y refractario cuando otros tratamientos no han sido

efectivos. Estos medicamentos son altamente potentes y deben utilizarse con extrema precaución debido a su potencial adictivo y a los efectos secundarios asociados.

- Tratamientos tópicos: Además de la administración oral de AINEs, se puede recurrir a su aplicación tópica, así como a cremas, geles o parches que contienen ingredientes como capsaicina, mentol o salicilatos. Estos productos proporcionan un alivio localizado, siendo una opción para disminuir el dolor y mejorar la función articular (Bruyère et al., 2014; Giménez Basallote et al., 2017; Fisiosesto, 2024; Basallote, 2024; OAFI, 2024).

Por otro lado, tendríamos los fármacos condroprotectores, como el condroitín sulfato, el sulfato de glucosamina y la diacereína, que pertenecen al grupo de los Fármacos Sintomáticos de Acción Lenta en la Osteoartritis (SYSADOA). Estos medicamentos no solo alivian el dolor, sino que también contribuyen a preservar el cartílago y frenar la progresión de la enfermedad. Aunque su eficacia ha generado resultados mixtos en estudios científicos, se recomienda su uso como parte de un enfoque integral de tratamiento bajo supervisión médica.

Aunque la eficacia de estos fármacos ha generado resultados mixtos en estudios científicos, se recomienda su uso como parte de un enfoque integral de tratamiento bajo supervisión médica. El condroitín sulfato, el sulfato de glucosamina y el HA intraarticular son fármacos de origen biológico que han demostrado ser seguros y eficaces en el tratamiento sintomático de la OA. Algunas guías como la del *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE) y la del *American College of Rheumatology* (ACR) no los recomiendan, pero organismos como la *European League Against Rheumatism* (EULAR), *European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases* (ESCEO), *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) y diversas sociedades científicas españolas respaldan su uso, especialmente en pacientes con alta comorbilidad que requieren tratamiento a largo plazo. Estos fármacos biológicos pueden ayudar a ralentizar el deterioro articular y retardar la pérdida de cartílago, permitiendo periodos de descanso para maximizar su efecto. Además, se ha observado un potencial efecto cardioprotector, lo que los hace aún más atractivos para pacientes que

buscan reducir la necesidad de tratamientos más agresivos y arriesgados. La seguridad, eficacia y capacidad para influir en la progresión de la enfermedad convierten a estos fármacos biológicos en una alternativa importante, respaldada por estudios clínicos y aprobada por agencias reguladoras como la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en España.

Finalmente, tenemos la medicina regenerativa que avanza significativamente en el tratamiento de la OA mediante terapias avanzadas que emplean terapia génica, terapia celular e ingeniería tisular. Estas terapias innovadoras buscan prevenir y tratar diversas enfermedades, incluyendo aquellas relacionadas con la reparación del cartílago articular. Las vesículas extracelulares (EV) son capaces de estimular la regeneración al activar las células y tejidos dañados, gracias a sus contenidos bioactivos y moléculas funcionales. Por otro lado, el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) ha demostrado eficacia en la regeneración de tejidos lesionados, mejorando significativamente la recuperación y la satisfacción de los pacientes. A pesar de los prometedores resultados obtenidos, aún se requiere continuar investigando en este campo. Es evidente que las células representan tanto un tratamiento como una oportunidad terapéutica fundamental para los pacientes que sufren de OA.

Principio básico y conjunto básico

Combinación de diversas modalidades de tratamiento farmacológicas y no farmacológicas.

Conjunto básico:

- Información / educación.
- Pérdida de peso en caso de sobrepeso.
- Programa de ejercicios (aeróbicos y fuerza).

PASO 1. Tratamiento de fondo

Si es sintomático

- Paracetamol de forma regular.
- SYSADOA crónico: sulfato de glucosamina y/o condroitin sulfato +/- paracetamol a demanda



Si sigue siendo sintomático, añadir:

- AINE tópicos
- Capsaicina tópica

Derivación al fisioterapeuta para:

A. Para controlar la desalineación: uso de rodilleras/plantillas.

B. En caso de presentar más síntomas:



- Ayudas para caminar
- Agentes térmicos
- Terapia manual
- Vendaje rotuliano
- Acupuntura
- TENS

PASO 2. Manejo farmacológico avanzado en el paciente sintomático persistente

Si sigue siendo sintomático o gravemente sintomático: AINEs orales agudos o crónicos.

Sin riesgo GI: • AINE no selectivo + IBP • AINE selectivo (COX-2) considerar IBP	Con riesgo GI: • AINE selectivo (COX-2) + IBP • Evitar AINE no selectivo	Con riesgo CV: • Naproxeno • Evitar dosis altas de diclofenaco / ibuprofeno • Precaución con AINE no selectivo • Evitar AINE selectivo (COX-2)	Con riesgo renal: • Evitar AINE
--	--	--	--

Si sigue siendo sintomático: hialuronato intraarticular o corticosteroides intraarticulares.

PASO 3. Últimos intentos farmacológicos

- Opioides débiles a corto plazo.
- Corticoides intraarticulares.

PASO 4. Manejo y cirugía de la enfermedad en etapa terminal



Sin presenta síntomas graves y mala calidad de vida:

- Reemplazo total de articulaciones.
- Corticoides intraarticulares.



Si está contraindicado: analgésicos opioides

Figura 7. Algoritmo de tratamiento de la OA de rodilla. CV: Cardiovascular, IBP: Inhibidor de la bomba de protones, GI: Gastrointestinal (Adaptada de Bruyère et al., 2014).

En última instancia, la cirugía ofrece diversas técnicas que se seleccionan según la zona y la naturaleza de la lesión a tratar. Para abordar enfermedades degenerativas, se emplean técnicas como:

- Artroscopia: Utilizada en lesiones de cartílago de menor tamaño.
- Osteotomía: Generalmente realizada en pacientes jóvenes con patología artrítica localizada en una parte específica de la articulación.
- Implante de prótesis (total o parcial): La elección entre una prótesis total o parcial se basa en la extensión y gravedad del daño articular.

Es fundamental resaltar que el enfoque farmacológico debe ser personalizado y adaptado a las necesidades y características individuales de cada paciente. La elección de medicamentos se basará en la gravedad de los síntomas, la ubicación y extensión de la OA, así como en los factores de riesgo específicos de cada individuo. Una gestión integral y efectiva de la OA puede mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes.

1.2. Vesículas extracelulares

1.2.1. Definición

Las EV son componentes importantes del sistema de comunicación intercelular. Se dividen principalmente en tres categorías: exosomas, microvesículas (MV) y cuerpos apoptóticos. Estas vesículas han despertado una creciente atención en la comunidad científica en el campo de la medicina regenerativa debido a su amplia gama de funciones y su potencial en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades, por ejemplo, aliviar la inflamación y promover la reparación y regeneración de tejidos (Lötvall et al., 2014; Bjørge et al., 2017; Théry et al., 2018).

Las EV son pequeñas vesículas de doble membrana lipídica con un diámetro de aproximadamente 30-2000 nm y pueden transportar diversas moléculas biológicamente activas, como subtipos de ácido ribonucleico (ARN): ARNm, miARN y lncARN, fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN), lípidos, proteínas y metabolitos (Lamichhane et al., 2015). Se producen y secretan en varios fluidos biológicos, como la sangre y el LS (Rani et al., 2015). Una vez liberadas, las EV pueden tener un efecto inmediato o transportarse a un lugar distante, comunicándose con las células receptoras y produciendo el mismo efecto que la célula donante.

Los exosomas, MV y cuerpos apoptóticos representan los diferentes tipos de EV con características distintivas. Los exosomas, con un diámetro de aproximadamente 30-250 nm, se forman mediante la invaginación de la membrana plasmática en el interior de los endosomas, donde se forman los cuerpos multivesiculares que posteriormente se fusionan con la membrana plasmática para liberar los exosomas al medio extracelular (Midekessa et al., 2020; Teng & Fussenegger, 2020; Chen et al., 2021). Las MV son ligeramente más grandes, con un diámetro que varía entre 50 y 1000 nm, y se generan a través de la gemación, que consiste en la formación de protrusiones en la membrana plasmática que se desprenden y se liberan como vesículas independientes (De Jong et al., 2014; Abels & Breakefield, 2016; Théry et al., 2018). Los cuerpos apoptóticos son las EV más grandes, con un diámetro de ≥ 1000 nm, y se forman en las etapas tardías de la apoptosis (De Jong et al., 2014; Zhang et al., 2021). Aunque existe la posibilidad de que los cuerpos apoptóticos desempeñen un papel importante como biomarcadores, actualmente la relación entre la medicina regenerativa y estas células no está completamente esclarecida. En la Figura 8 se pueden apreciar los distintos procesos de formación de las EV.

Actualmente, la *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) establece las directrices para la clasificación de las EV en su nueva guía MISEV 2023 (Welsh et al., 2024). Para que una vesícula pueda denominarse exosoma, debe tener un tamaño inferior a 250 nm, cumplir con los marcadores fenotípicos medidos mediante ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (véase ANEXO I), confirmar su morfología a través del

Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) y demostrar su biogénesis. De no cumplir con la demostración de su biogénesis, deben clasificarse como EV pequeñas.

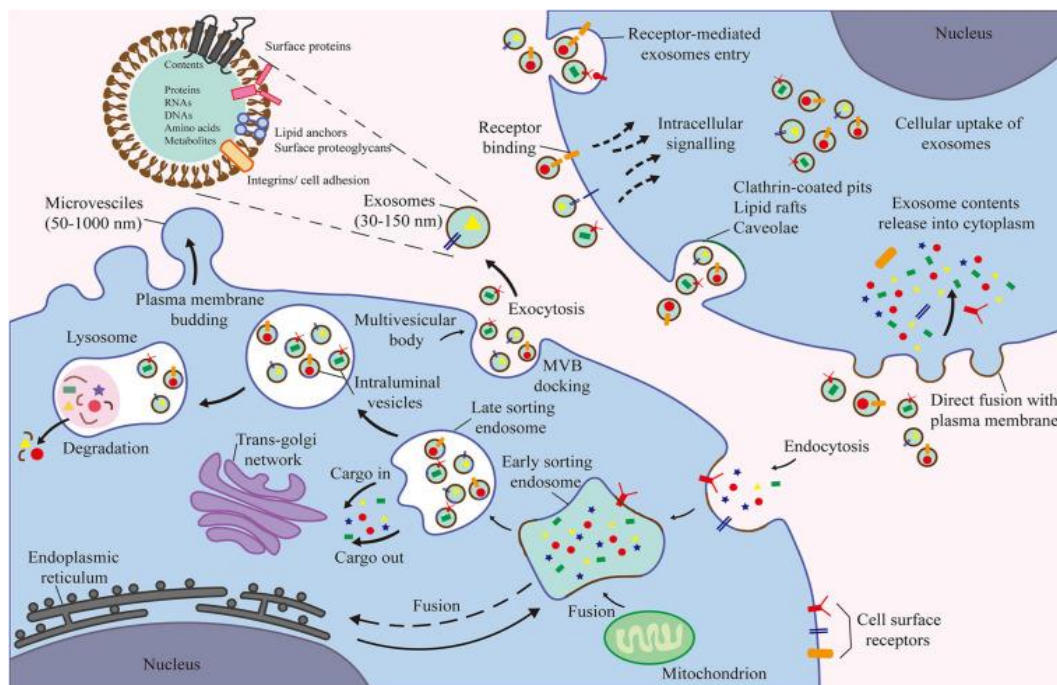


Figura 8. Esquema de la formación de las vesículas extracelulares (Li et al., 2021).

La biogénesis de las EV es un proceso complejo que aún no se comprende completamente; sin embargo, comprender cómo se forman las EV puede ser útil para desarrollar nuevos métodos en la ingeniería de EV con el fin de entregar cargas terapéuticas (Rädler et al., 2023).

Las EV desempeñan un papel esencial en la comunicación intercelular al interactuar con receptores de células receptoras, activando vías de señalización intracelular o siendo endocitadas para liberar su contenido (De Jong et al., 2014; Murphy et al., 2019). Su función y contenido pueden variar según el tipo de células donantes y el entorno. En medicina regenerativa, se enfoca en la producción de EV protectoras y pro-regenerativas,

especialmente para la reparación del cartílago. Además, las EV facilitan la comunicación celular a larga distancia al ser transportadas por fluidos corporales, llegando a células distantes y permitiendo la transferencia de información molecular para modular diversos procesos biológicos (Théry et al., 2018).

Además de su función en la comunicación celular, se ha descubierto que las EV están involucradas en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Un ejemplo de esto es su participación en la regulación del sistema inmunitario, tanto en la respuesta inflamatoria como en la respuesta inmune adaptativa. Además, se ha sugerido que las EV desempeñan un papel crucial en la progresión tumoral, ya que pueden facilitar la metástasis y estimular la angiogénesis (Lötvall et al., 2014). Estas vesículas también cumplen funciones reguladoras y mediadoras en las células receptoras, pudiendo afectar la expresión génica, activar vías de señalización intracelular y modificar la respuesta celular ante estímulos ambientales o patológicos, según las investigaciones mencionadas anteriormente (Lötvall et al., 2014).

La carga superficial de las EV, representada por el *Potencial Zeta*, juega un papel esencial en la estabilidad coloidal de estas vesículas, impactando directamente en su comportamiento y sus interacciones con otras células y moléculas, como señalan Midekessa et al., 2020 y Chen et al., 2021. Esta carga también influye en los procesos de aislamiento y purificación de las EV, mediante técnicas como la precipitación por carga, subrayando su relevancia en las metodologías de estudio (Deregibus et al., 2016). Asimismo, la carga superficial de los EV repercute en sus interacciones con las células receptoras, lo que conlleva implicaciones significativas en su potencial terapéutico, como en el caso de la liberación de fármacos (Murphy et al., 2019; Rädler et al., 2023).

En términos generales, se observa que el *Potencial Zeta* de las EV suele oscilar entre -10 y -70 mV, variación que está vinculada a la composición del medio de cultivo y al pH. La relación entre el *Potencial Zeta* y el tamaño de las EV adquiere una importancia central en diversas aplicaciones. Por ejemplo, el *Potencial Zeta* incide en la estabilidad de las EV en distintas formulaciones y en sus interacciones con otras partículas o células. De manera simultánea, el tamaño de las EV impacta en su distribución, tasa de eliminación y posición

dentro del organismo humano. Por ende, tanto el *Potencial Zeta* como el tamaño de las EV se erigen como parámetros esenciales que demandan una precisa medición y comprensión para su aplicación en áreas como el diagnóstico, tratamiento y biotecnología (Chen et al., 2021).

1.2.2. Vesículas extracelulares en la osteoartritis

En el ámbito de la OA, las investigaciones han demostrado que las EV desempeñan un rol crucial en la patogénesis, inflamación y regeneración del cartílago. Según Zhang et al. (2018), las EV derivadas de distintos tipos de células articulares son clave en el mantenimiento de la homeostasis articular y pueden tanto iniciar como promover la progresión de la OA. Estas vesículas contribuyen a la degradación de la matriz extracelular y generan cambios en el hueso subcondral, mientras que en modelos in vitro de OA, han demostrado mejorar el anabolismo del cartílago y reducir la inflamación, retrasando así la degradación cartilaginosa y la evolución de la enfermedad (Wang et al., 2017).

Recientemente, se ha centrado la atención en las EV derivadas de células madre mesenquimales (MSC) como una alternativa para tratar lesiones articulares y la OA. Estas EV se obtienen de diversas fuentes como la médula ósea, tejido adiposo, sinovio y células pluripotentes, incluyendo células madre embrionarias y pluripotentes inducidas (Zhu et al., 2017). Los exosomas son el principal objeto de estudio en las EV, investigándose las diferencias entre estas y las MV derivadas de la misma célula (Cosenza et al., 2017; Cosenza et al., 2018). Además, se han analizado EV que contienen tanto EV pequeñas como MV (Headland et al., 2015; Lo Sicco et al., 2017). Las EV derivadas de MSC presentan ventajas significativas debido a su tamaño reducido, baja inmunogenicidad y capacidad para evitar problemas asociados con la inyección directa de células. Estudios han observado efectos antiinflamatorios y promotores de la regeneración en modelos animales de OA tratados con EV pequeñas derivadas de MSC (Zhu et al., 2017).

Las EV se han convertido en un área de interés en la investigación de la OA debido a su potencial terapéutico (Alcaraz et al., 2019). Tanto los exosomas como las MV desempeñan un papel crucial en la comunicación intercelular y la regulación de procesos fisiológicos y patológicos. Las EV derivadas de MSC han demostrado beneficios en el tratamiento de la OA al controlar la inflamación en las articulaciones afectadas mediante la reducción de la producción de citocinas inflamatorias (Tofiño-Vian et al., 2018; Guillén et al., 2021). Además, las MSC EV pueden inhibir la degradación de la matriz del cartílago y promover su reparación al estimular la síntesis de componentes clave, como SOX9, agregano y colágeno tipo II, y reducir la actividad de enzimas responsables de la degradación de la matriz, como MMP-3, MMP-13 y ADAMTS-5 (Nguyen et al., 2021). Estos efectos combinados contribuyen a preservar la integridad del cartílago y promover su regeneración.

Otra fuente de EV con potencial terapéutico en la OA son las EV secretadas por el sinovio o el cartílago articular, que pueden utilizarse tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de la enfermedad (Alcaraz et al., 2019). Estas EV poseen propiedades inmunosupresoras y regenerativas, haciéndolas idóneas para futuras aplicaciones terapéuticas (Zhuang et al., 2022). Estas propiedades permiten modular la respuesta inmunológica en las articulaciones afectadas, reduciendo la inflamación y creando un entorno propicio para la regeneración del tejido. Además, las EV desempeñan un papel crucial en la comunicación intercelular y en la regulación de los procesos inmunológicos en las articulaciones, actuando como vehículos de transporte para regular los procesos inmunológicos y mantener la homeostasis articular (Guillén et al., 2021).

En la actualidad, la investigación sobre la relación entre las EV presentes en el LS y la OA es limitada tanto en humanos como en animales, a pesar de la significativa relevancia que el LS tiene en la patología de la OA (Rios et al., 2022). Esta escasez de estudios puede atribuirse a varios motivos.

El primer motivo puede ser debido al procedimiento invasivo para aislar el LS, lo cual dificulta la obtención de muestras, ya que requiere una punción intraarticular, un proceso

que puede resultar altamente doloroso (Esa et al., 2019). Al ser un campo de estudio emergente las EV, aún hay mucho por descubrir sobre su papel en la patogénesis y el tratamiento de diversas enfermedades, incluida la OA (Mustonen & Nieminen, 2021). Además, existen restricciones bioéticas relacionadas con la recolección de LS de pacientes sanos con fines de comparación, ya que la extracción de muestras puede causar perjuicios al paciente sano, limitando así la cantidad de estudios viables (O'Brien et al., 2023). Finalmente, la falta de un modelo animal que reproduzca fielmente el modelo humano de OA también contribuye a la escasez de investigaciones. Hasta el momento, se han realizado estudios en caballos, posiblemente debido al amplio volumen de LS que puede contener la articulación equina (Boere et al., 2019; Anderson et al., 2022; Mustonen et al., 2023).

Pese a los pocos estudios que hay sobre ello, se está investigando el papel de estos EV en la fisiopatología de la OA y su potencial como biomarcadores y tratamientos. Estos estudios han demostrado que las EV derivadas del LS, especialmente de las MSC, pueden servir como tratamientos potenciales para la OA al ejercer efectos antiinflamatorios y condroprotectores (Miyaki & Lotz, 2018; Mohd Noor et al., 2021; Liang et al., 2023). Además, se ha encontrado que las EV producidas por sinoviocitos y condrocitos bajo condiciones similares a la OA aumentan la liberación de citocinas proinflamatorias, sugiriendo su participación en la progresión de la OA (Esa et al., 2019). Además, hay evidencia que indica que las EV derivadas del LS y del sinovio pueden ser biomarcadores para la OA, y las EV derivadas de MSC muestran un efecto terapéutico sobre la OA (Yang, et al., 2023). Aunque el aislamiento y la caracterización de las EV del LS aún se están explorando, estos estudios proporcionan valiosos conocimientos sobre el papel potencial de las EV en la fisiopatología de la OA y su uso como biomarcadores y agentes terapéuticos (Chen et al., 2022).

Por lo tanto, el estudio de las propiedades de las EV del LS emerge como un pilar fundamental en la investigación y diagnóstico de la OA en seres humanos. A través de estos estudios, los profesionales de la salud podremos desentrañar información crítica sobre el estado de las articulaciones y la progresión de la enfermedad, así como la implementación de tratamientos más precisos y la mejora en la calidad de vida de quienes la padecen. En un

mundo donde la OA es una preocupación de salud creciente, las evaluaciones del LS se erigen como una herramienta indispensable para enfrentar esta enfermedad debilitante y continuar avanzando en la búsqueda de terapias más efectivas y personalizadas.

2. Objetivos

Nuestro grupo de investigación ha demostrado en trabajos anteriores los efectos antiinflamatorios y condroprotectores de las vesículas extracelulares pequeñas procedentes de células madre mesenquimales de tejido adiposo en células de la articulación osteoartítica. Sin embargo, no se han estudiado ni caracterizado las vesículas extracelulares que se encuentran en el líquido sinovial, componente fundamental de toda articulación que sufre importantes modificaciones en cuanto a su composición y aspecto en los pacientes con osteoartritis.

En consecuencia, los **objetivos principales** de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- Estudiar las vesículas extracelulares presentes en el líquido sinovial de la articulación de la rodilla procedente de pacientes con osteoartritis, purificándolas y caracterizándolas.
- Determinar los efectos de dichas vesículas extracelulares aisladas del líquido sinovial en dos células fundamentales de la articulación, condrocitos y sinoviocitos, mediante cultivos primarios procedentes de pacientes con osteoartritis.
- Analizar comparativamente los resultados obtenidos en los condrocitos y los sinoviocitos y evaluar su posible utilización tanto para un diagnóstico más temprano de la osteoartritis como para su tratamiento.

3. Material y métodos

3.1. Aislamiento, cultivo y estimulación de sinoviocitos osteoartríticos humanos

Antes de llevar a cabo el aislamiento, cultivo y estimulación de los SOA, se preparan los medios y la colagenasa (Collagenase C9891 SIGMA from *Clostridium histolyticum*) que se van a utilizar.

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham SIGMA D8062 (DMEM) con antibiótico (AB) (Pen Strep. Penicillin Streptomycin, GIBCO, 15140-122) al 1% (DMEM + AB): Se parte de una botella de DMEM, se extraen 50 mL y se transfieren a un Falcon de 50 mL y se le añaden 5 mL de AB a la botella con DMEM.
- DMEM con AB al 1% y Suero Bovino Fetal (SBF), (BIOWEST LABCLINIC S181B-500) al 10% (DMEM Completo): Se parte de una botella de DMEM, se quitan 50 mL que se dejan en un Falcon de 50 mL y se le añaden 5 mL de AB y 50 mL de SBF a la botella con DMEM.

Se recogen las muestras del Hospital Instituto Musculoesquelético Europeo (IMSKE) y se dejan en DMEM + AB durante un día. Al día siguiente, se seleccionan las muestras (Figura 9.A) que cumplen con las características idóneas, priorizando aquellas con menos grasa y más tejido sinovial para facilitar la extracción de los SOA.

Se retira la grasa con pinzas y tijeras y se corta el sinovio en partes más pequeñas para facilitar la digestión enzimática. El sinovio cortado se transfiere a un Falcon de 50 mL con 9 mL de DMEM + AB y 1 mL de colagenasa. La mezcla se incuba a 37 °C con agitación a 100 revoluciones por minuto (rpm) durante 2 a 3 horas, hasta que se observe una adecuada digestión.

Se filtra la muestra con un filtro de 100 µm (Corning cell stainer 100 µm, CORNING CLS 431752) en un Falcon de 50 mL y luego con un filtro de 70 µm (Corning cell stainer 70 µm, CORNING CLS 431751) en otro Falcon de 50 mL. Se recoge el sobrenadante y se

añaden 10 mL de DMEM Completo al tubo inicial para recoger cualquier resto remanente en los filtros.

Una vez recogido todo se procede a la centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante, se retira la grasa y se resuspende el pellet en 20 mL de DMEM Completo. Este paso se repite dos veces adicionales.

Tras esto, se resuspende el pellet en 7,5 mL de DMEM Completo que se colocan en un frasco de cultivo de 25 mL (SARSTEDT 83.3910.300) y se guardan en una estufa a 37 °C durante 24 horas. Después de las 24 horas, se cambia el medio con 7,5 mL de DMEM Completo y se realiza un seguimiento del crecimiento de los SOA (Figura 9.B). Se cambia el medio en días alternos. Si la muestra contiene muchos eritrocitos, se puede realizar un lavado con 3 mL de Tampón Fosfato Salino (PBS; pH 7,4 1X GIBCO 10010-015), se descarta el PBS y se añaden los 7,5 mL de DMEM Completo.

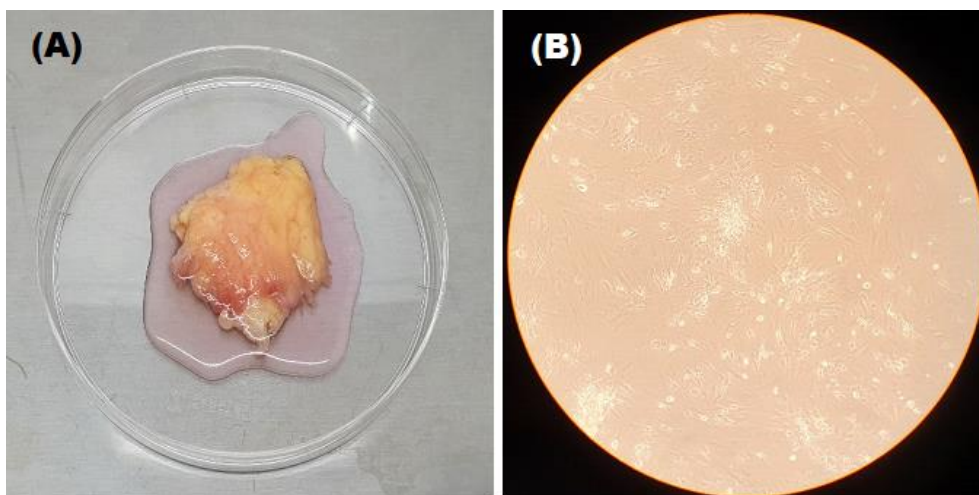


Figura 9. Pre y post procesado de sinovio de rodilla humano con OA. (A) Sinovio articular de humano con OA. (B) Cultivo de SOA humanos alcanzada la confluencia.

Una vez que los SOA han alcanzado su confluencia y se procede a la congelación (Figura 10), se lleva a cabo el siguiente proceso: Se elimina todo el medio del frasco con la ayuda de una pipeta Pasteur.

Se realizan dos lavados con 3 mL de PBS, asegurándose de retirar completamente todo el líquido. Se agrega 1 mL de tripsina (0,25% Trypsin-EDTA 1X), cubriendo toda la superficie del frasco, y se incuba durante 30 segundos. Posteriormente, se añaden 2 mL de DMEM Completo, y se raspa el frasco con la ayuda de un rascador (SARSTEDT 83.3951).

Los SOA se transfieren con una pipeta Pasteur a un Falcon de 50 mL y se completa con DMEM Completo hasta alcanzar un volumen total de 20 mL. Se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos a 17 °C. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 20 mL de DMEM Completo. Se centrifuga nuevamente a 1200 rpm durante 5 minutos a 17 °C. Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 900 µL de SBF. Los 900 µL se transfieren a un criovial (SARSTEDT 72.380.992) de 1 mL, y se añaden 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril.

El criovial se coloca en un recipiente de congelación Mr. Frosty (Thermo Fischer Scientific), que contiene isopropanol para lograr una congelación gradual a una tasa de -1°C / min. El criovial se almacena en el congelador a -80 °C durante 48 horas. Posteriormente, los crioviales se pueden retirar del Mr. Frosty y se almacenan en el congelador a -80 °C hasta su uso futuro.

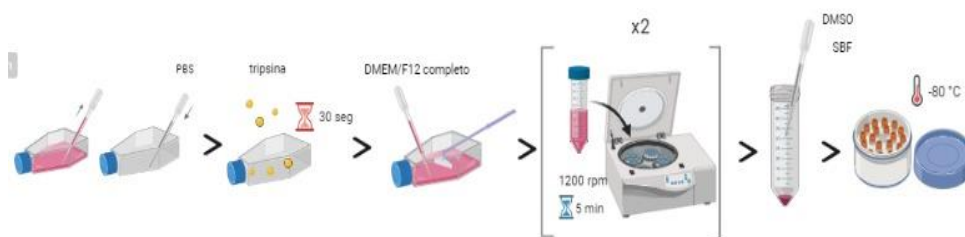


Figura 10. Esquema de la congelación de los SOA humanos.

Se retira el criovial del congelador a -80°C y se descongela mediante el calor corporal de las manos. La muestra se transfiere con una pipeta Pasteur a un Falcon de 50 mL y se completa con DMEM Completo hasta alcanzar los 20 mL. Se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 20 mL de DMEM Completo. Se centrifuga nuevamente a 1200 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y se resuspende en 1 mL de DMEM Completo.

Se toman 10 μL de la muestra y se colocan en un tubo Eppendorf (BECKMAN COULTER 357448) al cual se le añaden 10 μL de azul de tripano, asegurándose de lograr una mezcla homogénea con movimientos de pipeteo. Se toman 10 μL de esta mezcla y se introducen en la Cámara de conteo de Neubauer. Se cuentan el número de SOA presentes en cada cuadrado y se calcula la cantidad total en la muestra de 1 mL. Se cuentan 16 cuadrados, y utilizando la fórmula $X \times 2 \times 10^4$, donde X es el número de SOA contados, se determina la concentración celular por mL. Este valor se multiplica por los mL de muestra para obtener el número total de células.

Finalmente, se procede a sembrar la cantidad necesaria de SOA de acuerdo con el diseño del experimento a realizar:

- 30000 células / mL para placa de 96 pocillos (SARSTEDT 83.3924.300).
- 100000 células / mL para placa de 12 pocillos (SARSTEDT 83.3921.005).
- 200000 células / mL para placa de 6 pocillos (SARSTEDT 83.3920).
- 500000 células / mL para frasco de cultivo de 25 mL.

Para llevar a cabo la estimulación, se procede de la siguiente manera: se retira el medio de los pocillos, asegurándose de eliminar cualquier residuo con la ayuda de una micropipeta. Luego, se añade 1 mL de DMEM Completo y los diferentes mediadores según las condiciones del experimento (5 μL de IL- 1β [10 ng/mL] y/o 10 μL de EV de LS a diferentes concentraciones [7,20E+08, 7,20E+07, 3,60E+07, 1,80E+07 EV/mL]) a cada pocillo y se deja incubando durante 48 o 96 horas a 37°C .

Después de transcurridas las 48 o 96 horas, se recoge el sobrenadante (1 mL). Se centrifuga a 1400 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se recoge el sobrenadante en un criovial. Posteriormente, se congela a -80 °C durante 48 horas y luego se traslada a un congelador a -20 °C para su posterior análisis.

3.2. Aislamiento, cultivo y estimulación de condrocitos osteoartríticos humanos

Se recolectan las muestras del Hospital IMSKE y se dejan reposar en DMEM + AB durante un día para su procesamiento al día siguiente. Al día siguiente, se seleccionan las muestras (Figura 11.A) para su procesamiento, basándose en la observación visual del investigador, asegurándose de que no presenten calcificaciones ni contaminaciones. A continuación, se inicia el proceso de aislamiento de COA humanos (Figura 12).

Inicialmente, se separa el cartílago del resto de la muestra con la ayuda de un bisturí y unas pinzas. Posteriormente, se tritura el cartílago en partes más pequeñas para facilitar su posterior digestión enzimática. Se traslada todo el cartílago triturado a un Falcon de 50 mL, y luego se añaden al Falcon 9 mL de DMEM + AB y 1 mL de colagenasa, previamente preparada. La mezcla se incuba a 37 °C con agitación a 100 rpm durante 2 a 3 horas, hasta que se observe una digestión completa.

Después, la muestra se filtra con un filtro de 70 µm en otro Falcon de 50 mL. En el tubo inicial, se añaden 10 mL de DMEM Completo para recoger los restos que puedan haber quedado en el primer Falcon, y se pasa por el mismo filtro hasta tenerlo todo en el segundo Falcon de 50 mL. Una vez recogido todo, se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente; en este punto, se descarta el sobrenadante, se decanta y se resuspende el pellet en 20 mL de DMEM Completo. Este proceso de centrifugación y resuspensión se repite dos veces más.

Luego, el pellet se resuspende en 1 mL de DMEM Completo. Se toman 10 μ L de la muestra y se mezclan con 10 μ L de azul de tripano en un Eppendorf para asegurar una mezcla homogénea. A continuación, se toman 10 μ L de esta mezcla y se introducen en la Cámara de conteo de Neubauer. Se cuentan el número de COA en cada cuadrado y se calcula la cantidad total en la muestra de 1 mL. Se cuentan cuantos COA hay en 16 cuadrados, y utilizando la fórmula $X \times 2 \times 10^4$, donde X es el número de COA contados, se determina la concentración celular por mL. Este valor se multiplica por los mL de muestra para obtener el número total de células.

Finalmente, se siembra la cantidad necesaria de COA según el experimento que se vaya a realizar:

- 30000 células / mL para placa de 96 pocillos.
- 100000 células / mL para placa de 12 pocillos.
- 200000 células / mL para placa de 6 pocillos.

Se colocan 100 μ L de la muestra en una placa de 96 pocillos, mientras que en la placa de 6 pocillos se siembran 1 mL y en la de 12 pocillos se siembran 0,5 mL. Las muestras se guardan en la estufa a 37 °C durante 72 horas. Posteriormente, se realiza el cambio de medio con 1 mL de DMEM Completo. Se lleva a cabo un seguimiento del crecimiento de los COA y se procede al cambio de medio en días alternos hasta alcanzar la confluencia (Figura 11.B) antes de realizar el experimento planificado.

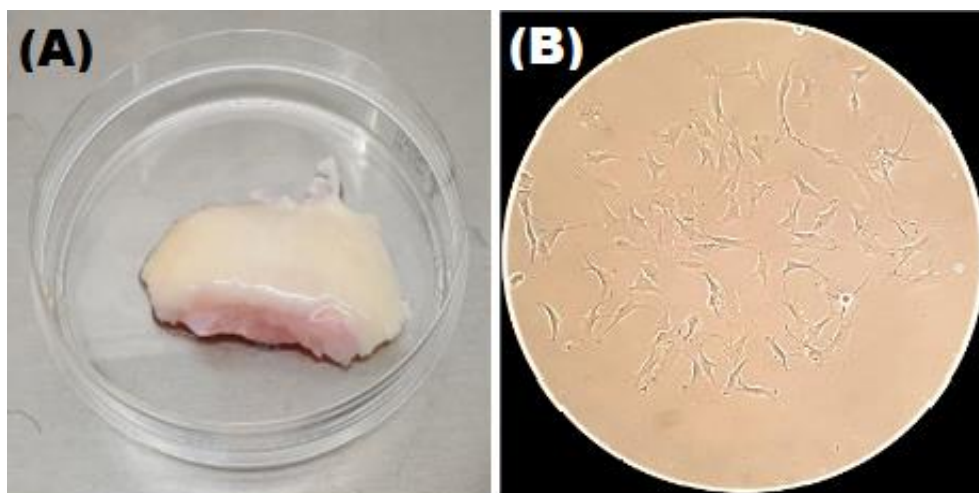


Figura 11. Pre y post procesado de cartílago de rodilla humano con OA. (A) Cartílago articular de rodilla de persona con OA. (B) Cultivo de COA humanos alcanzada la confluencia.

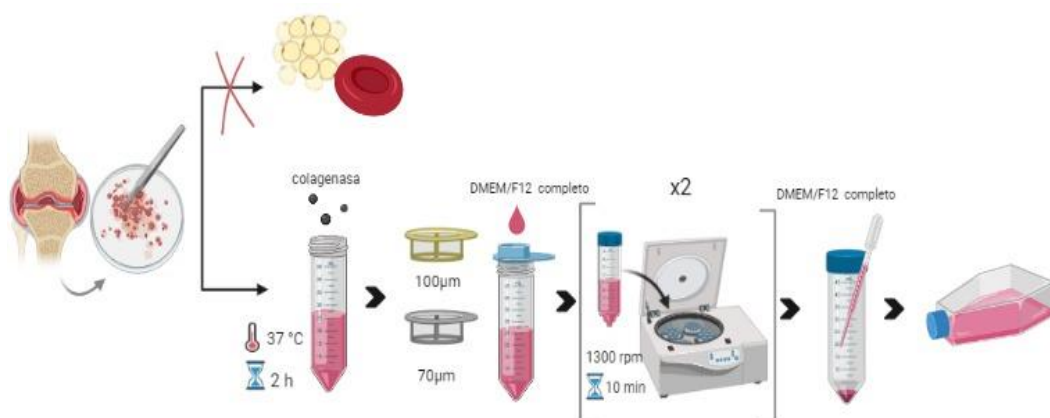


Figura 12. Esquema del aislamiento de COA humanos.

Para realizar la estimulación, se retira el medio de los pocillos con una micropipeta, asegurándose de que no quede ningún residuo. Se añade 1 mL de DMEM Completo y los diferentes mediadores según las condiciones experimentales (5 μ L de IL-1 β [10 ng/mL] y/o 10 μ L de EV de LS a diferentes concentraciones [7,20E+08, 7,20E+07, 3,60E+07, 1,80E+07 EV/mL]) a cada pocillo, y se deja incubando durante 48 o 96 horas a 37 °C.

Después de este período, se recoge el sobrenadante (1 mL) y se centrifuga a 1400 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfiere a un criovial, se congela a -80 °C durante 48 horas y luego se traslada a un congelador a -20 °C para su posterior análisis.

3.3. Aislamiento y purificación de las vesículas extracelulares del líquido sinovial

Se procede a recolectar las muestras de LS provenientes de pacientes con OA que se han sometido a una artroplastia de rodilla en el Hospital IMSKE. Estas muestras se obtienen mediante jeringuillas, como se ilustra en la Figura 13.A, y se transfieren a tubos Eppendorf de 1,5 mL. Posteriormente, se lleva a cabo una centrifugación a 10000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante resultante se pipetea y se almacena en crioviales, como se indica en la Figura 13.B, mientras que el pellet se descarta.

Con el objetivo de mantener un seguimiento preciso de cada muestra, se etiqueta el tubo con el ID correspondiente de la muestra, las siglas "LS" y la fecha de procesamiento. Este procedimiento asegura que las muestras estén debidamente identificadas y listas para su utilización posterior en la caracterización de las EV presentes en el LS.

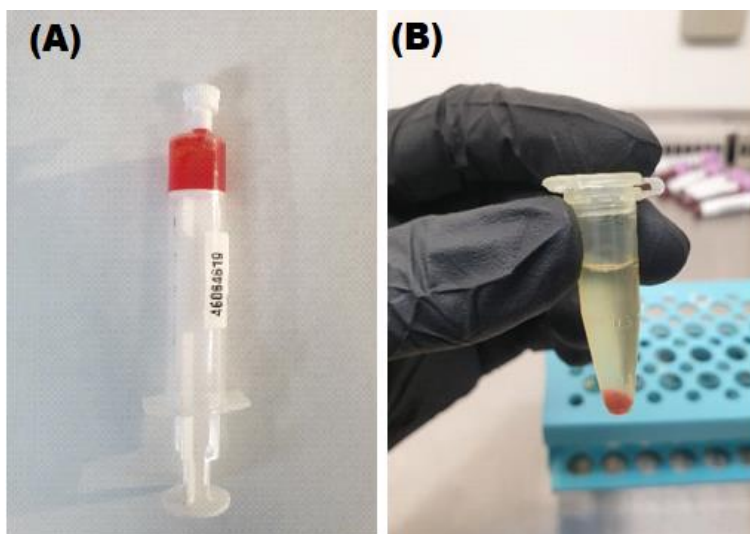


Figura 13. Pre y post procesado de líquido sinovial osteoartrítico humano. (A) Muestra de líquido sinovial de persona con OA. (B) Líquido sinovial ya procesado y preparado para congelación a -80°C .

Después de completar la fase inicial de purificación, se han empleado dos protocolos adicionales para aislar las EV presentes en el LS: el método de columnas Cell (Exo-spin™ midi columns Exosome Purification Kit Cat EX04) y el método de columnas Izon (qEV 2 Columns IC2-35). Estos procedimientos específicos permiten una extracción más precisa y eficiente de las EV, asegurando así la obtención de muestras de alta calidad para su posterior análisis. Cada protocolo se ha seleccionado estratégicamente con el fin de optimizar el aislamiento de las EV de manera efectiva, proporcionando así una base sólida para las fases posteriores de caracterización y estudio de estas estructuras.

La tecnología Exo-spin™ (columnas Cell) se destaca por incorporar columnas de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), lo que la posiciona como una opción superior en comparación con técnicas que se basan únicamente en la precipitación. Estas últimas tienden a conllevar la co-purificación de cantidades significativas de proteínas no

exosomales y otros materiales, así como el arrastre del precipitante. La ventaja clave de las columnas SEC de Exo-spin™ radica en su capacidad para aislar específicamente los exosomas, evitando la contaminación no deseada. Este enfoque proporciona muestras de exosomas más puras y libres de interferencias, lo que resulta fundamental para aplicaciones aguas abajo. Estas aplicaciones incluyen estudios de ADN y ARN, así como ensayos funcionales de exosomas tanto in vitro como in vivo. En resumen, la tecnología Exo-spin™ ofrece una herramienta avanzada y versátil para la investigación de exosomas en diversas áreas.

El siguiente protocolo detalla los pasos esenciales para preparar la muestra inicial antes de emplear el kit Exo-spin™, diseñado para aislar exosomas de diversas muestras biológicas, como en nuestro caso, el LS.

Se transfiere 1 mL de la muestra inicial a un tubo Eppendorf y se somete a una centrifugación a 300 g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar las células. El sobrenadante se transfiere a otro tubo Eppendorf y se centrifuga a 16000 g durante 30 minutos a 4 °C para eliminar posibles restos de células o detritos celulares.

Se transfiere nuevamente el sobrenadante a otro tubo Eppendorf, y se agrega el Buffer Exo-spin™ en una proporción de 2:1 (400 µL de Buffer Exo-spin™ a 800 µL de sobrenadante). La mezcla se incuba a 4 °C durante la noche con movimiento constante, para optimizar el rendimiento de exosomas aislados. Luego, se centrifuga a 16000 g durante 1 hora a 4 °C, se aspira y se descarta el sobrenadante con cuidado de que no se seque, ya que esto podría dañar los exosomas, y se resuspende el pellet (conteniendo los exosomas) en 1 mL de PBS. Si el pellet no se resuspende fácilmente, se recomienda reducir la cantidad de muestra de partida.

Se procede a preparar la columna Exo-spin™ midi (Figura 14.A) retirando la tapa de rosca y desechando el tampón conservante de la parte superior de la columna. Luego, se retira el tapón de salida y se coloca la columna Exo-spin™ midi en el tubo de recolección de residuos suministrado. Para evitar la sequedad del lecho de la columna, se continúa

inmediatamente con el siguiente paso. La columna se equilibra agregando secuencialmente 2 veces 10 ml de PBS, permitiendo que la columna drene por gravedad. No es necesario centrifugar. Una vez equilibrada, se coloca en un soporte con agarraderos, con un tubo Eppendorf de 1,5 mL debajo de la columna para la recolección de fracciones de alta resolución (Figura 14.B).

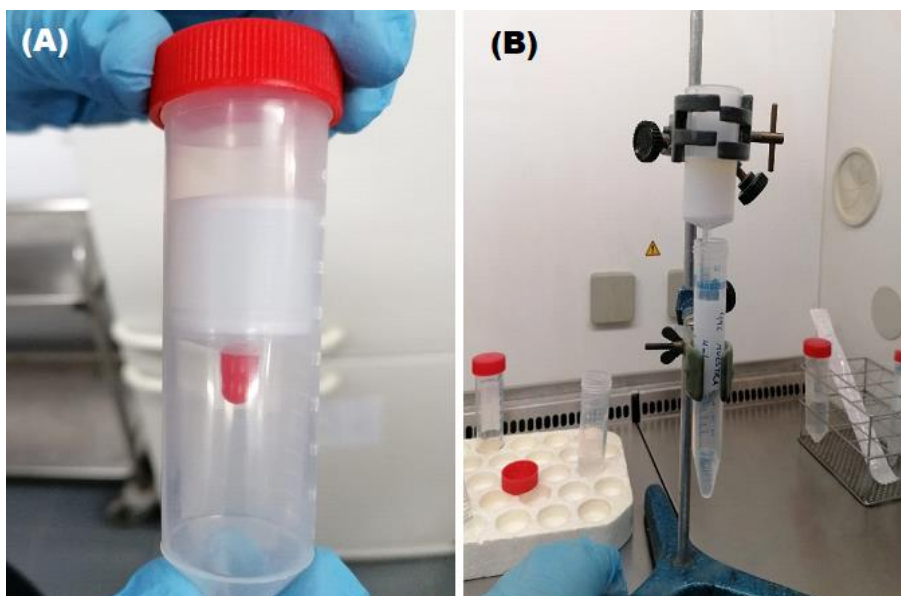


Figura 14. Columnas de cromatografía de exclusión por tamaño. (A) Columna Exo-spinTM midi antes hacer pasar la muestra. (B) Columna Exo-spinTM midi con la muestra pasando a través y siendo recogida en un recipiente.

Se añaden con cuidado 500 μ L de la muestra que contiene exosomas en la parte superior de la columna (pellet de exosomas resuspendido en PBS de los pasos anteriores). La fracción resultante se recoge en el tubo Eppendorf de 1,5 mL por gravedad y se etiqueta como Fracción 1. Se repite este proceso para obtener las fracciones 2 y 3, utilizando un nuevo tubo Eppendorf para cada fracción. Se continúa añadiendo 500 μ L de PBS a la columna y recogiendo la fracción por gravedad. Este proceso se repite 21 veces más hasta obtener un

total de 24 fracciones de 500 μL cada una. Posteriormente, se congelan las muestras a -80°C para análisis posterior y/o uso.

La mayoría de los exosomas se eluirán entre las fracciones 7 y 12. Para obtener una fracción altamente purificada de 3 mL, estas fracciones se pueden combinar. Si se busca un mayor rendimiento, se pueden combinar otras 4 fracciones para obtener una fracción de 5 mL (que contiene las fracciones 7-16). Se recomienda utilizar 3 mL para maximizar la pureza de los exosomas o 5 mL para maximizar el rendimiento.

La SEC utilizando columnas qEV (columnas Izon) funciona mediante la separación de partículas según su tamaño mientras atraviesan una columna empaquetada con una resina porosa de polisacárido. En este proceso, las partículas más pequeñas entran en los poros de la resina durante su descenso a través de la columna, lo que retrasa su salida (Figura 15). Con la gravedad como fuerza impulsora, la muestra se desplaza a través de la columna y, a medida que sale, se recogen volúmenes secuenciales.

La distribución de las partículas en estos volúmenes se realiza en función de su tamaño. De esta manera, las partículas más grandes tienden a salir primero de la columna, mientras que las partículas más pequeñas salen al final del proceso. Este método permite una fracción precisa de las partículas según su tamaño, lo que resulta fundamental para la caracterización y el aislamiento específico de exosomas u otras EV de interés en muestras biológicas. La Figura 15 proporciona una representación visual de este proceso de separación basado en el tamaño de las partículas a lo largo de la columna de cromatografía.

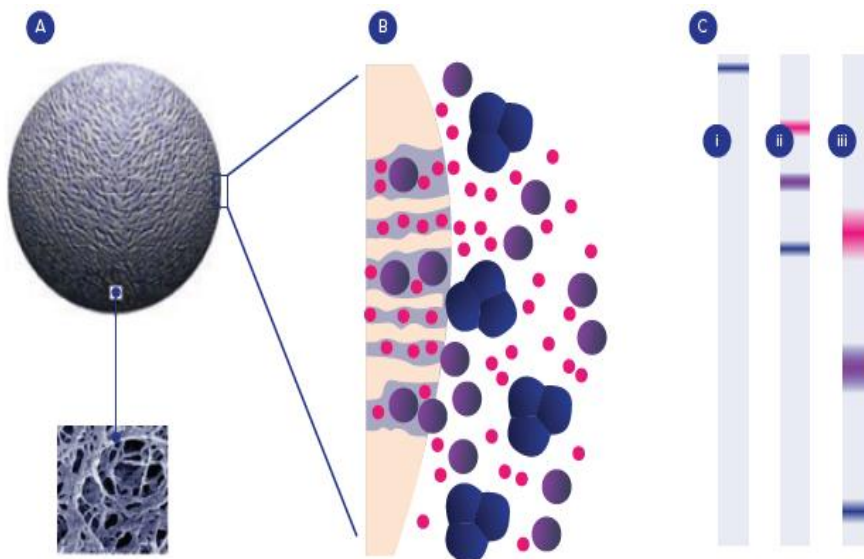


Figura 15. Proceso de SEC en columna de Izon (A) Imagen esquemática de una cuenta de resina con un aumento microscópico electrónico. (B) Dibujo esquemático de las moléculas de la muestra difundiendo en los poros de las cuentas de resina. (C) Descripción gráfica de la separación: (i) la muestra se aplica a la columna; (ii) las partículas más pequeñas (rosa) se retrasan más que las partículas más grandes (azul); (iii) las partículas más grandes se eluyen primero de la columna (Protocolo Izon).

El proceso de equilibrio de la columna empaquetada implica llenarla con un tampón que ocupa el volumen total de la columna, incluyendo la resina sólida (fase estacionaria) y el tampón líquido (fase móvil). Dado que las partículas no se adhieren a la resina, la composición del tampón no afecta significativamente la resolución, es decir, el grado de separación entre los picos.

Para llevar a cabo la preparación de la columna, esta se equilibra junto con el tampón de muestra dentro del rango de temperatura operativa de 18-24 °C. Se retira cuidadosamente la tapa superior y se coloca la columna en posición vertical en un soporte listo para su uso. Posteriormente, se retira la tapa inferior, y el tampón comienza a pasar a través de la

columna. Se conecta el depósito de tampón a la parte superior de la columna, y se realiza un enjuague de la columna con al menos dos volúmenes de columna de tampón PBS filtrado con un filtro de 0,22 μm (SARSTEDT 83.1826.001) para prevenir contaminaciones con otras partículas.

Para evitar bloqueos en los filtros de la columna, se realizan los siguientes pasos antes de cargar las muestras. Las muestras se centrifugan a 1500 g durante 10 minutos para eliminar células y partículas grandes. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se centrifuga nuevamente a 10000 g durante 10 minutos. El tampón continúa atravesando la columna. La carga del volumen de muestra centrifugada preparada en el filtro de carga se realiza para evitar la interrupción del flujo durante períodos prolongados. Simultáneamente, se comienza a recolectar el volumen del tampón, incluido el volumen desplazado al cargar la muestra. Una vez que se ha recolectado todo el volumen del tampón, se continúa recolectando el volumen de la fracción purificada.

Después de recolectar las fracciones deseadas, se procede a la limpieza y desinfección de la columna, esta se enjuaga con 8,5 mL de NaOH 0,5 M inmediatamente después de finalizar la recolección de fracciones. Luego, se enjuaga con 17 mL de tampón para devolver el pH de la columna a la normalidad antes de cargar otra muestra. Si la columna se almacenará para uso futuro, se debe guardar con un agente bacteriostático, como PBS que contenga un 20% de etanol. Las columnas limpias pueden almacenarse a 4-8 °C después de su uso.

3.4. Caracterización de las vesículas extracelulares del líquido sinovial

3.4.1. TRPS con el qNano de Izon

Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) permite la caracterización de nanopartículas suspendidas en electrolitos. TRPS es la única tecnología que puede proporcionar:

- La concentración de partículas en el fluido como número de partículas por unidad de volumen de fluido, en un rango de tamaño de partícula detectable especificado.
- Una distribución precisa del tamaño de estas partículas, idealmente representada como un histograma de concentración frente al diámetro (o volumen) de la partícula.
- La carga superficial efectiva de las nanopartículas individuales (de hasta 800 nm en electrolitos basados en PBS).

TRPS utiliza el principio de conteo de partículas de Coulter a escala nanométrica. Se basa en la medición del cambio en la resistencia eléctrica que ocurre cuando una partícula pasa a través de un nanoporo (NP) en una membrana delgada que separa dos compartimentos de fluido (Figura 16). Este cambio en la resistencia es proporcional al volumen de la partícula, lo que permite determinar el tamaño de la partícula. La tecnología es "ajustable" porque el tamaño del NP puede ajustarse para detectar partículas de diferentes tamaños. TRPS es una técnica altamente sensible que puede detectar y medir nanopartículas con alta precisión y resolución.

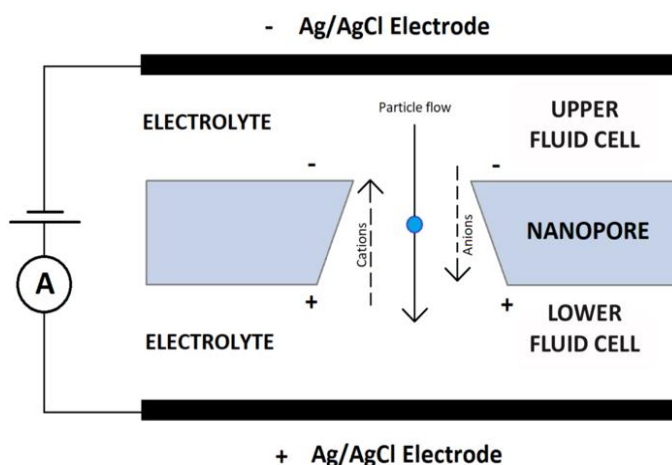


Figura 16. Representación esquemática de cómo funciona el TRPS de Izon (Protocolo Izon).

Se aplica voltaje a través de la celda de fluido a través de los electrodos de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl). Cuando los iones del electrolito se mueven entre los electrodos a través del NP, se crea una corriente de línea base. Se detecta una disminución temporal en la corriente a medida que las partículas pasan a través del NP, lo que permite la medición del tamaño y el recuento de las partículas en suspensión.

Las partículas de la muestra pasan a través del NP aplicando una combinación de voltaje y presión, del módulo de presión variable (VPM), y cada evento de translocación de partículas provoca una señal de bloqueo o "bloqueo resistivo" que es detectada y medida por el software de la aplicación (Figura 17).

- La magnitud del bloqueo es directamente proporcional al diámetro de la partícula.
- La frecuencia de bloqueo se utiliza para determinar la concentración de partículas.

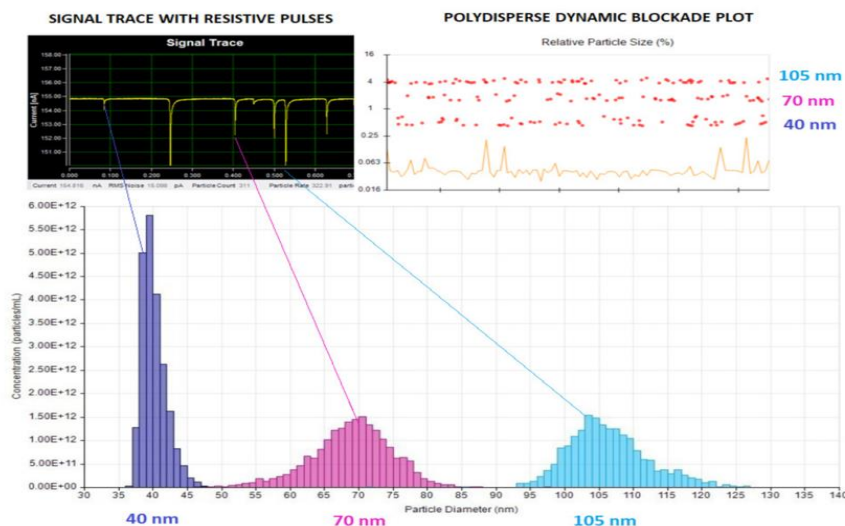


Figura 17. Las mediciones de magnitud y frecuencia se convierten en tamaño y concentración de partículas mediante la calibración con partículas de tamaño y concentración conocidos. (Protocolo Izon).

La duración del bloqueo cambia con la velocidad de la partícula y se puede utilizar para calcular la carga superficial relativa de cada partícula. Como el software registra los bloqueos en nA, se utilizan partículas de calibración de tamaño conocido para convertir la magnitud del bloqueo (nA) en un diámetro (nm). La magnitud del bloqueo es proporcional al volumen de la partícula que pasa a través del NP, lo que proporciona una resolución muy alta del diámetro de la partícula. La concentración de partículas es proporcional al cambio en la tasa de bloqueo por unidad de presión aplicada. Los valores precisos de concentración suelen derivarse en 2 o más pasos de presión utilizando partículas de calibración de concentración conocida.

Previo al proceso de medida, se preparan los medios de medición, los cuales deben haber sido preparados en los últimos 7 días y almacenados en la nevera a 4 °C cuando no se están utilizando.

- Electrolito de Medición (ME), se mezclan 30 μ L de Tween 20 (SIGMA P9416-100ML) con 10 mL de PBS en un Falcon de 50 mL.
- Solución Humectante (WS) se prepara de forma similar al ME, se adiciona 100 μ L de Tween 20 a 10 mL de PBS en un Falcon de 50 mL.
- Solución de Revestimiento (CS), se toman 15 mL de ME en un Falcon de 50 mL y se colocan en un baño de agua tibia. Precisamente, se pesan 2,0 g del polvo de CS de Izon, el cual se agrega lentamente al ME calentado. Luego, se mezcla vigorosamente hasta lograr la completa disolución del polvo. La solución se deja reposar en el baño hasta que esté clara. Una vez esté clara, se completa hasta un volumen total de 20 mL y se filtra utilizando un filtro de 0,45 μ m.
- PBS.
- H₂O Bidestilada.

El día de la medición, es necesario filtrar todos los medios con filtros de 0,22 μ m.

Se inicia el procedimiento encendiendo el qNano (Figura 18) y el ordenador destinado para la medición, utilizando el programa Izon Control Suite V3.4.2.51 (©2020 Izon Science Ltd.). Se coloca el NP150 en el qNano, ya que se espera que las partículas tengan un tamaño entre 70 y 420 nm, con una concentración máxima de $5,00\text{E}+09$. El NP se posiciona con el número de serie hacia arriba y se fija un estiramiento de 45 mm con la ayuda de un pie de rey. Luego, en el programa, se establece el estiramiento a 45 mm y se ajusta el qNano a 47 mm mediante la rueda lateral. Finalmente, se incrementa el voltaje de entrada a 0,1 V.



Figura 18. Aparato qNano de IZON.

El proceso de humectación del NP se inicia pipeteando inversamente 75 μL de la WS en la cámara inferior del qNano. Se secan los lados de la cámara con una Kimwipe Kimtech (Thermo Fischer Scientific) para evitar desbordamientos. Luego, se coloca la cámara superior y se pipetea 35 μL de WS, asegurándose de secar cualquier posible gota que pueda

surgir de la cámara superior. Se posiciona la varilla del VPM en modo de presión, se cierra la válvula de vacío y se aumenta la presión a 20 durante 2 minutos.

Para establecer la corriente, es esencial mantener el NP húmedo. En primer lugar, se retira la presión y la válvula de vacío. Posteriormente, se quita y se seca la cámara superior con una Kimwipe y se permite que la gota se mantenga sobre el NP. En la cámara inferior, se elimina la WS con una pipeta y se reemplaza con 75 μL de ME. Se seca la gota superior del NP y los lados de la cámara inferior, siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente. Luego, se vuelve a colocar la cámara superior y se añaden 35 μL de ME, asegurándose de secar posibles gotas que puedan formarse en la cámara superior. Se cierra la válvula de vacío, se incrementa la presión a 20 y se ajusta el voltaje hasta alcanzar una intensidad de entre 100-140 nA.

Para revestir el NP, se retira la presión y la válvula de vacío. Luego, se seca la cámara superior utilizando una Kimwipe, permitiendo que la gota permanezca sobre el NP. En la cámara inferior, se elimina la WS con una pipeta y se sustituye por 75 μL de la CS. Se procede a secar la gota superior del NP y los lados de la cámara inferior como se indicó previamente. A continuación, se vuelve a colocar la cámara superior y se añaden 35 μL de CS, asegurándose de secar posibles gotas que puedan surgir en la cámara superior. Se cierra la válvula de vacío y se incrementa la presión a 20 durante un período de 10 minutos.

A esto le sigue el proceso de limpieza y lavado. Primero, se elimina la presión y la válvula de vacío. Luego, se retiran los 35 μL de CS de la cámara superior y se reemplazan por 35 μL de ME. Se realizan movimientos de arriba/abajo con la pipeta tres veces, cambiando la punta en cada ocasión. Se quita la cámara superior y se permite que la gota permanezca sobre el NP. En la cámara inferior, se retira el CS y se reemplaza con 75 μL de ME, realizando movimientos de arriba/abajo con la pipeta tres veces y cambiando la punta en cada movimiento. Se seca la gota superior del NP y los lados de la cámara inferior, de acuerdo con el procedimiento anterior. A continuación, se vuelve a colocar la cámara superior y se añaden 35 μL de ME, asegurándose de secar posibles gotas que puedan surgir en la cámara superior. Se cierra la válvula de vacío y se incrementa la presión a 20 durante 2 minutos, tratando de lograr la misma corriente que se tenía previamente (100-140 nA).

En la preparación del paso de la medida, se retira la WS y se agrega 35 μ L de muestra, asegurándose de secar las posibles gotas en la cámara superior. Posteriormente, se cierra la válvula de vacío y se incrementa la presión. Luego, se ajustan el voltaje, la tensión (43-49 mm) y la presión para lograr una velocidad de partículas estable, manteniéndola entre 100 y 1500 partículas por minuto.

En el paso de medición, se presiona el botón de inicio y se espera hasta que se hayan contado al menos 500 partículas, manteniendo un ritmo de al menos 100 partículas por minuto. Luego, se presiona el botón de stop y se guarda la medición con la fecha y el nombre de la investigación, seguido de las muestras medidas. Por ejemplo: "20211006 493-682". Se especifica el tipo de NP utilizado (NP150) y su número de serie. La muestra se nombra, por ejemplo, como "Muestra 493 P14". Se ajusta la dilución, la presión y el reactivo (siempre escrito de la misma manera). Se destaca que un estiramiento más bajo favorece una mayor resolución, siendo ideal bloqueos de alrededor de 0,2 nA. Entre cada muestra medida, se realiza una limpieza como en el paso de limpieza y lavado.

Después se miden el patrón de calibración, es muy similar al procedimiento utilizado para medir las muestras. Sin embargo, en esta ocasión, se agrega el patrón de calibración, en este caso, CPC200. Se presiona el botón de inicio y se espera hasta que se cuenten 500 partículas. Posteriormente, se presiona el botón de stop y se guarda la medición. La información básica, como el nombre de la investigación y los detalles del poro, ya estarán registrados. El nombre de la muestra de calibración se establece, por ejemplo, como "CPC200 P14". Se proporcionan detalles adicionales sobre la calibración, incluyendo el tamaño medio de la partícula, la concentración, la dilución, la presión y el reactivo, siempre utilizando la misma nomenclatura.

En el paso final de lavado, se elimina la presión y se abre la válvula de vacío. Luego, se seca la cámara superior con una Kimwipe y se permite que la gota permanezca sobre el NP. Posteriormente, en la cámara inferior, se retira el ME utilizando una pipeta y se reemplaza con 75 μ L de H₂O bidestilada. Se seca la gota superior del NP y los laterales de la cámara inferior, como se describió anteriormente. Acto seguido, se vuelve a colocar la cámara superior y se añaden 35 μ L de H₂O bidestilada, asegurándose de secar cualquier posible

gota que aparezca en la cámara superior. A continuación, se cierra la válvula de vacío y se aumenta la presión a 20 durante 2 minutos. Durante este proceso, en el programa se puede observar cómo las EV van explotando, lo que se manifiesta mediante la aparición de numerosos puntos rojos como señales en el programa. Se espera hasta que no aparezcan más puntos. Luego, se retira la cámara superior, se disminuye el estiramiento, se retira el NP y se seca todo con una Kimwipe. Una vez que todo está seco, se vuelve a colocar la cámara superior y la tapa de protección, y se aumenta la presión a 20.

La etapa de procesamiento de datos se inicia haciendo clic derecho sobre la muestra y optando por la alternativa de procesar datos. En este punto, se lleva a cabo la calibración de los datos utilizando las mediciones previas de calibración. A continuación, se eligen los datos deseados y se aplica un filtro, estableciendo los límites de tamaño de partícula estimados. Para refinar aún más la selección, se realiza clic derecho en los datos y se opta por la opción de Fracción de concentración, definiendo así los tamaños de partículas específicos que se están investigando. Para concluir el proceso, se hace clic en el botón Recalibrar, permitiendo así el análisis de los datos.

Para medir la carga de las EV, se emplean NP diseñados específicamente con un potencial Z de 0, suministrados por Izon y previamente verificados. El procedimiento comienza con la medición de una muestra a presión y voltaje predefinidos. Luego, se realiza la medición a presión cero y al mismo voltaje, seguida de mediciones adicionales a presión cero con reducciones en el voltaje al 80% y al 60%. En el proceso de calibración, es suficiente con medir 250 partículas. Es esencial señalar que, al calibrar para el análisis de la carga de las EV, solo se permiten estas cuatro medidas. Si hay más mediciones, el programa impedirá la calibración de las muestras.

Problemas más comunes durante la medición:

- Formación de burbujas: Si aparecen muchos puntos rojos (burbujas) al utilizar solo ME, se puede resolver aumentando la presión a 20. Luego, se retira y se vuelve a colocar el

VPM, se disminuye la presión a 0, se retira y se vuelve a colocar el VPM y, finalmente, se vuelve a aumentar a 20 VPM. Si esta solución no es suficiente, se puede considerar cambiar la solución en ambas cámaras, como se hace en el paso de lavado.

- Formación de agregados o partículas grandes, o disminución de la corriente de referencia: Durante la medición de muestras o patrones, si la corriente de referencia disminuye, la cual siempre debe monitorearse, se puede abordar pausando la medición. Se aumenta la extensión del poro, se golpea la tapa del escudo con el plung, se vuelve a la extensión anterior y se reanuda la medición una vez que la corriente vuelva a los valores anteriores.

Datos clave que tener en cuenta:

- La magnitud de los bloqueos proporciona información sobre el tamaño de las partículas. A medida que los bloqueos aumentan, también lo hace el tamaño de las partículas.
- La duración de la medición es indicativa de la presencia de agregados. A mayor duración, mayor probabilidad de la presencia de agregados en la muestra medida.

3.4.2. Microscopia Electrónica de Transmisión

El TEM es una herramienta avanzada para investigar la estructura de materiales a escalas extremadamente pequeñas, incluyendo la escala atómica y molecular, que puede llegar a ser del orden de 100 nm de grosor. Estas imágenes de alta resolución ofrecen la posibilidad de realizar ampliaciones a nivel atómico de la muestra en cuestión.

El proceso inicia con la preparación de la muestra, donde se procede primero a concentrarla utilizando el kit de concentración qEV de Izon (RT02), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Posteriormente, la muestra se prepara en forma de lámina ultrafina o sección delgada, esta tarea la llevo a cabo el Servicio Central de Soporte a la

Investigación Experimental de la Universitat de València mediante técnicas especializadas de corte y preparación. Las EV se fijan químicamente mediante inmunohistoquímica, se deshidratan con un crioprotector (sacarosa) y se congelan para la criosección. Tras obtener secciones delgadas y descongelarlas, se lleva a cabo el inmunomarcado utilizando anticuerpos conjugados a nanopartículas de oro (anti-CD63), un marcador de superficie en EV. Es fundamental que la muestra tenga un grosor adecuado (3 mm) para soportar el proceso de criosección, permitir que los electrones atraviesen sin dispersión significativa y la posterior observación en el TEM.

Una vez preparada la muestra, se enciende el TEM, en este caso el Microscopio TEM HITACHI HT7800 120kV (Figura 19), y se ajustan los parámetros, como el voltaje de aceleración de los electrones a 100.0 kV y la apertura de sección de área que controla el tamaño del haz de electrones. La muestra preparada se coloca en el soporte del TEM, comúnmente una cuadrícula de cobre con una película de soporte delgada o un orificio que facilita el paso de los electrones a través de ella.

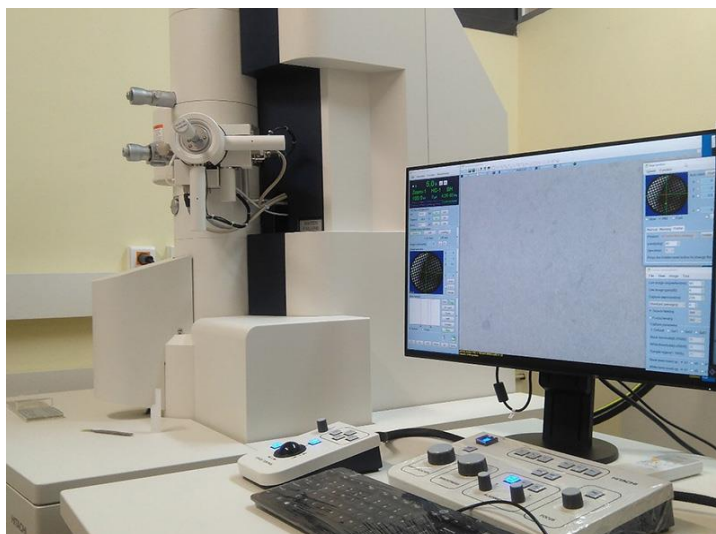


Figura 19. Imagen del Microscopio TEM HITACHI HT7800 120kV.

En el siguiente paso, se enfoca el haz de electrones en la muestra y se selecciona la zona de interés mediante un sistema de lentes electromagnéticas. Es posible obtener una vista previa de la muestra a baja magnificación antes de seleccionar la región exacta que se explorará con mayor detalle. Las imágenes son capturadas con la Cámara digital EMSIS XAROSA conectada al TEM a aumentos de entre 25000x y 40000x, y se pueden visualizar en una pantalla, así como registrarse digitalmente para un análisis posterior. Una vez concluidas las observaciones y el análisis, se apaga el TEM y se retira la muestra.

La interpretación de las imágenes TEM nos proporciona información valiosa sobre la estructura cristalina, la morfología de partículas, la distribución de elementos, la topografía y otros aspectos, dependiendo de la configuración del TEM y la técnica empleada. Este proceso integral contribuye significativamente a la comprensión detallada de la materia a una escala microscópica.

3.5. Otras técnicas realizadas

3.5.1. Técnica de viabilidad celular medida mediante MTT

Durante el proceso experimental, las células COA / SOA se siembran en placas de 6 pocillos y, una vez alcanzada la confluencia, se someten a estimulación con diversos mediadores según las condiciones experimentales. En este caso, se estimulan con 5 μ L de IL-1 β (10 ng/mL) y/o 10 μ L de EV de LS a diferentes concentraciones (7,20E+08, 7,20E+07, 3,60E+07, 1,80E+07 EV/mL) durante 24, 48 o 72 horas a 37 °C. Posteriormente, se evalúan con la solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; SIGMA M2128) mediante los siguientes pasos:

Se prepara la solución de MTT disolviendo 5 mg en 1 mL de PBS y diluyendo 1:11 con DMEM Completo. Luego, se elimina el medio de cultivo de las células y se añaden 500 μ L de la solución de MTT a cada pocillo. Se incuba a 37 °C durante 1-3 horas, observando la coloración celular mediante microscopio. Después, se elimina el sobrenadante y se añaden 400 μ L de DMSO, agitando ligeramente para disolver el precipitado. Si la coloración es intensa, se pueden agregar 200 μ L adicionales de DMSO. La absorbancia (ABS) se mide a una longitud de onda de 531 nm en el espectrofotómetro *Victor^{3TM} V1420 Multilabel Counter*.

Es fundamental destacar que este procedimiento permite evaluar los efectos de la estimulación con IL-1 β y/o EV en las células COA / SOA, proporcionando información sobre la viabilidad celular de estas.

3.5.2. Técnica de proliferación celular medida mediante BrdU

El ELISA de proliferación celular con bromodesoxiuridina (BrdU) de ABCam colorimétrico (Kit ab126556) se utiliza para medir de manera precisa la síntesis de ADN y la proliferación celular in vitro. Este método se fundamenta en la incorporación de BrdU

como un marcador en células en fase de división activa en microplacas de cultivo celular. Se siembran las células a 24, 48 o 72 horas y se agregan los diversos mediadores según las condiciones experimentales (5 μ L de IL-1 β [10 ng/mL] y/o 10 μ L de EV de LS a diferentes concentraciones [7,20E+08, 7,20E+07, 3,60E+07, 1,80E+07 EV/mL]). Durante las últimas 2 a 24 horas de cultivo, se agrega BrdU a las células, este se incorporará al ADN de las que están proliferando, y posteriormente se fija y permeabiliza el ADN celular para permitir la unión del anticuerpo anti-BrdU. Luego, se agrega un anticuerpo conjugado con peroxidasa y se utiliza un sustrato cromogénico para generar un cambio de color proporcional a la cantidad de BrdU incorporado en las células. Finalmente, se determina la ABS de una alícuota de cada pocillo a la longitud de onda, 450 nm, en el espectrofotómetro *Victor^{3TM} V1420 Multilabel Counter*.

3.5.3. Determinación de mediadores inflamatorios mediante ELISA

La técnica de ELISA es un ensayo que se fundamenta en la detección de antígenos mediante el uso de anticuerpos marcados con una enzima. En el método colorimétrico, se emplea un anticuerpo secundario o de detección biotinilado y el sistema conjugado estreptavidina-peroxidasa, que interacciona con un sustrato específico. El protocolo general de esta técnica se detalla en la Figura 20.

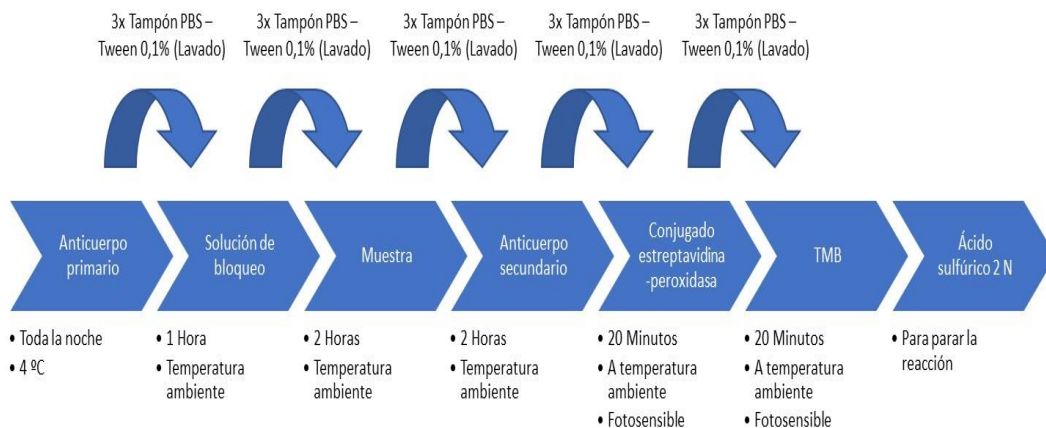


Figura 20. Protocolo general de la técnica ELISA.

Posteriormente, la ABS se cuantifica utilizando un espectrofotómetro *Victor^{3TM} V1420 Multilabel Counter* a una longitud de onda de 450 nm.

La Tabla 1 presenta los kits de ELISA comerciales utilizados en la presente tesis doctoral. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos y las recomendaciones proporcionadas por los fabricantes.

Tabla 1. Analitos cuantificados, número de catálogo y casa comercial y/o fabricante.

Analito	Número de catálogo	Casa comercial y/o fabricante
<i>Calnexina (CNX)</i>	<i>RK01142</i>	<i>Company ABclonal, Inc.</i>
<i>CD81</i>	<i>EX103</i>	<i>Cell Guidance Systems Ltd.</i>
<i>CD9</i>	<i>EX101</i>	<i>Cell Guidance Systems Ltd.</i>
<i>HA</i>	<i>EU2556</i>	<i>Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.</i>
<i>IL-18</i>	<i>DY201</i>	<i>R&D Systems Europe, Ltd.</i>
<i>IL-6</i>	<i>RK00004</i>	<i>Company ABclonal, Inc.</i>
<i>MMP-13</i>	<i>EHMMP13</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
<i>MMP-3</i>	<i>BMS2014-3</i>	<i>Thermo Fisher Scientific Inc.</i>
<i>Programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6IP)</i>	<i>EH10966</i>	<i>Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.</i>
<i>Proteína C reactiva</i>	<i>RK00078</i>	<i>Company ABclonal, Inc.</i>
<i>Gen de Susceptibilidad a Tumores 101 (TSG101)</i>	<i>OKCA02151</i>	<i>Aviva Systems Biology, Corp.</i>

3.6. Análisis estadístico

En la presentación de los resultados, se emplea la media aritmética acompañada del error estándar de la media (ε). El número de muestras en cada experimento se denota como n .

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se aplicó el método de ANOVA simple de una vía, seguido del Test de múltiple comparación de Tukey. Este último nos permite comparar los valores medios de los grupos problema con respecto a un grupo Blanco o Control. En este caso, todos los grupos se compararon con el grupo Control, teniendo en cuenta el error asociado a las comparaciones múltiples. El software utilizado para este análisis fue GraphPad Prism 6.0® (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

Con todos los resultados obtenidos, se considera que existe una diferencia significativa entre los grupos estudiados cuando el valor de p es menor que 0,05 y el valor t obtenido es mayor que el tabulado para un nivel de confianza del 95%. La diferencia puede ser aún más significativa para un valor de p menor que 0,01, con un intervalo de confianza del 99%, y extremadamente significativa cuando el valor de p es menor que 0,001, con niveles de confianza del 99.9%. Se ha adoptado la siguiente representación simbólica (*) para indicar la significatividad estadística: $*$ = $p < 0,05$, $**$ = $p < 0,01$ y $***$ = $p < 0,001$.

4. Resultados

4.1. Caracterización del líquido sinovial osteoartrítico humano:

Las características demográficas de las muestras de LS obtenidas del Hospital IMSKE fueron detalladamente analizadas, proporcionando ideas valiosas sobre la distribución de la OA en la población de estudio.

Distribución por Género:

Las muestras de LS se obtuvieron de 24 varones y 28 mujeres, como se representa en la Figura 21. Este desglose demográfico sugiere una asociación más pronunciada de la OA con el género femenino, corroborando hallazgos previos que indican una mayor prevalencia de esta enfermedad en mujeres.

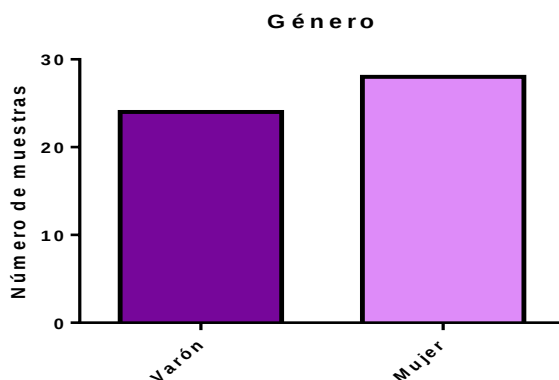


Figura 21. Número de Muestras de LS representadas por géneros (n=52).

Rango de Edades:

Las edades de los pacientes de OA oscilaron entre los 50 y los 83 años, con una edad media de 67 años. Esta caracterización demográfica revela que la OA afecta principalmente a la población de la tercera edad, como se presenta en la Figura 22.

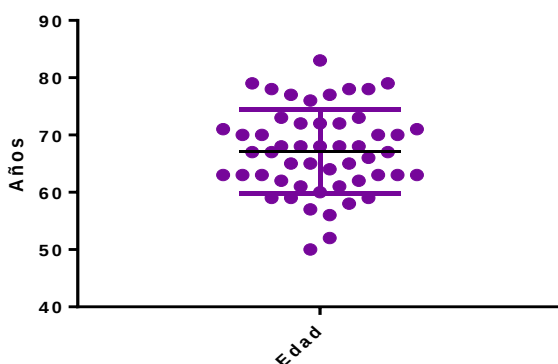


Figura 22. Representación gráfica de las edades de los pacientes con OA (n=52).

Este análisis demográfico refuerza la percepción de la OA como una enfermedad que afecta principalmente a la población femenina y a individuos de edad avanzada. La comprensión de estos factores demográficos es esencial para diseñar estrategias de manejo y tratamiento adecuadas, así como para impulsar investigaciones adicionales sobre la influencia de género y edad en la progresión y manifestación de la OA.

Los LS obtenidos de los pacientes con OA se sometieron a una detallada caracterización visual, considerando aspectos clave como el grado de transparencia, color y viscosidad. Esta evaluación visual se realizó con el objetivo de clasificar los LS en categorías discernibles

que pudieran proporcionar información valiosa sobre las características físicas de estos fluidos biológicos, en ellos se observan cambios que reflejan el progreso de la enfermedad.

Grado de transparencia:

Los LS se dividieron en dos grupos distintos según su grado de transparencia: Opaco y Transparente. Se han analizado 52 muestras, 30 muestras presentan un grado de transparencia opaca y 22 muestras son transparentes. Esta clasificación se llevó a cabo mediante observaciones visuales, y los resultados se pueden observar en la Figura 23, que presenta la estadística hallada, así como ejemplos representativos de cada categoría.

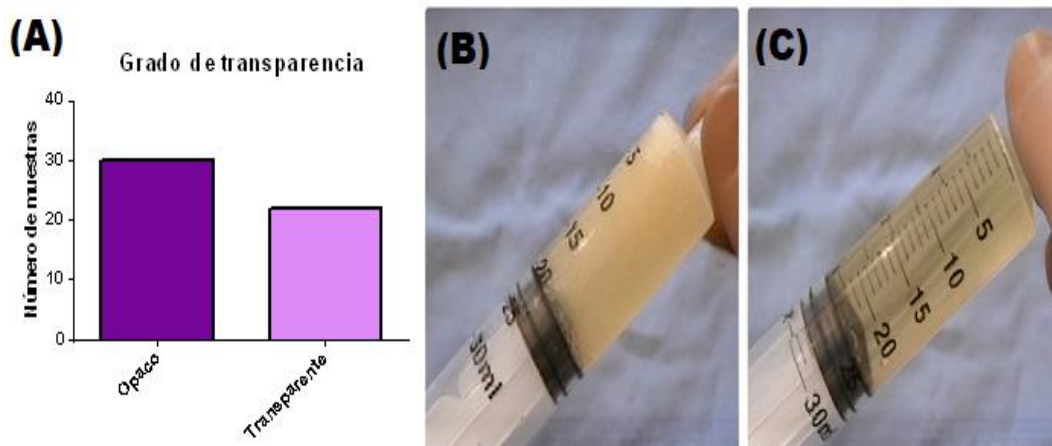


Figura 23. Caracterización de los LS según su Grado de transparencia ($n=52$). (A) Estadística de cada grupo. (B) Muestra de LS Opaco. (C) Muestra de LS Transparente.

Color:

La variabilidad en el color de los LS se categorizó en cuatro grupos principales: Amarillo, Blanco, Incoloro y Rojo. De las 52 muestras analizadas, 32 presentaban color amarillo, 1 color blanco, 2 incoloros y 17 color rojo. Esta clasificación basada en el color

proporciona información valiosa sobre posibles cambios bioquímicos o patológicos en el LS, ya que estos colores están asociados a diferentes estados del LS; Amarillo = LS inflamatorio, Blanco = LS séptico, Incoloro = LS normal o mecánico y Rojo = LS hemorrágico o la posible presencia de sangre durante la extracción. Los detalles visuales de esta clasificación se presentan en la Figura 24.

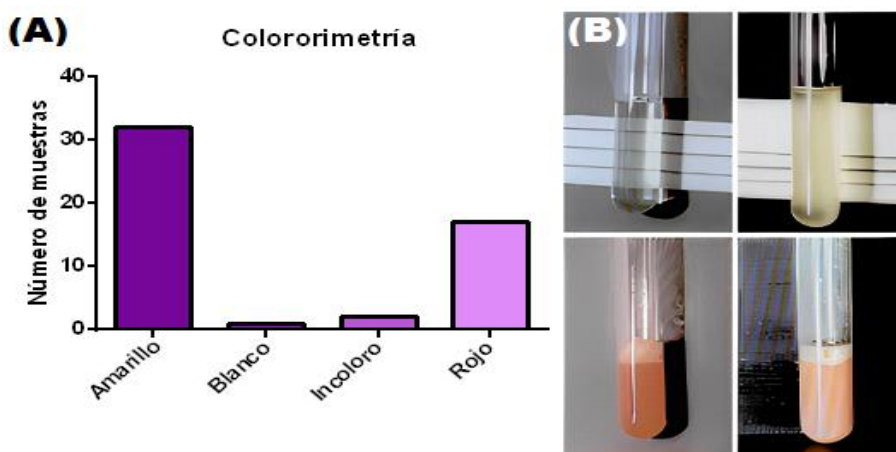


Figura 24. Clasificación de los LS según su Color (n=52). (A) Estadística de cada grupo. (B) Muestras de LS Amarillo, Blanco, Incoloro y Rojo.

Viscosidad:

La viscosidad de los LS se evaluó y se agrupó en tres categorías principales: Alta, Baja y No Aplica. Con relación a las 52 muestras analizadas, 41 presentaban una viscosidad alta, 10 viscosidad baja y 1 última que se desechó y no se identificó al ser blanco el LS. Esta clasificación busca identificar variaciones en la consistencia del LS, lo que podría estar relacionado con cambios en la composición molecular. Por lo general se asocia el grado de viscosidad del LS con lo sano que está el mismo, a mayor viscosidad más sano. La representación visual de esta clasificación se muestra en la Figura 25. Esta variabilidad en

la viscosidad de las muestras podría tener implicaciones importantes en la función articular, ya que a menor densidad del LS más inflamación tiene la articulación.

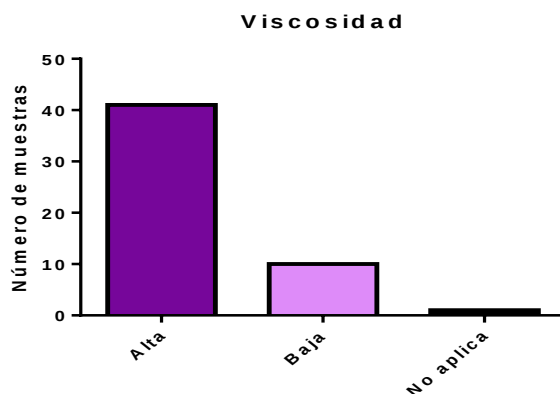


Figura 25. Clasificación de los LS según su Viscosidad (n=52).

El IMSKE también nos proporcionó las analíticas de sangre preoperatorias de los pacientes a los que se les tomaron las muestras de LS, cartílago y sinovio con OA. En la Tabla 2 se pueden observar estos datos. Todos los pacientes presentaron una velocidad de sedimentación, tiempo de protrombina (12,0-14,5 seg.), Índice QUICK (80-120 %), tiempo de tromboplastina parcial activada (25-45 seg.) y conteo de leucocitos ($4,00-10,80 \times 10^9/L$) dentro de rangos normales.

Tabla 2. Analíticas de sangre preoperatorias de pacientes con OA (n=12).

Parámetro	Media	Desviación estándar	Valor de referencia
<i>Tiempo de protrombina (seg.)</i>	13.73	0.56	12.0-14.0
<i>Índice QUICK (%)</i>	94.5	6.06	80-120
<i>Tiempo de tromboplastina parcial activada (seg.)</i>	26.20	2.89	25-45
<i>Leucocitos ($10^9/L$)</i>	6.54	1.47	4.00-10.80

Posterior a las observaciones visuales y el análisis de las analíticas, se llevaron a cabo ensayos para cuantificar el grado de inflamación en el LS de estos pacientes con OA. Estos ensayos se centraron en la medición de mediadores inflamatorios clave, incluyendo la CRP, las IL-1 β e IL-6, y el HA, que se midió tanto directamente en el LS como después del proceso de filtrado, con el objetivo de obtener una comprensión más profunda de la respuesta inflamatoria en el entorno articular.

La CRP, un marcador inflamatorio sistémico, se cuantificó en el LS de los pacientes con OA. Los resultados de este ensayo se presentan en la Figura 26 la media de CRP es de 18,43 $\pm$ 0,35 ng/mL.

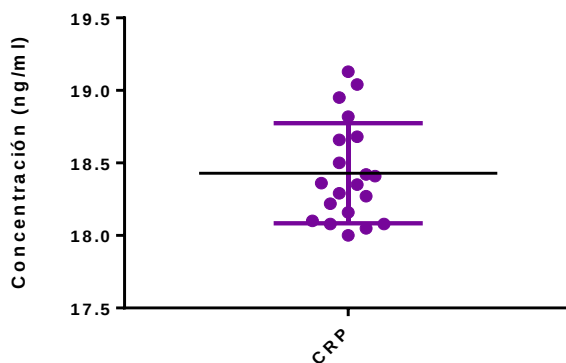


Figura 26. Niveles de CRP en el LS de pacientes con OA (n=25).

La IL-1 β , una citocina proinflamatoria, se analizó para evaluar su presencia en el LS de los pacientes. Los resultados se exhiben en la Figura 27. La concentración media de IL-1 β en el LS es de 338,0 $\pm$ 166,4 ng/mL.

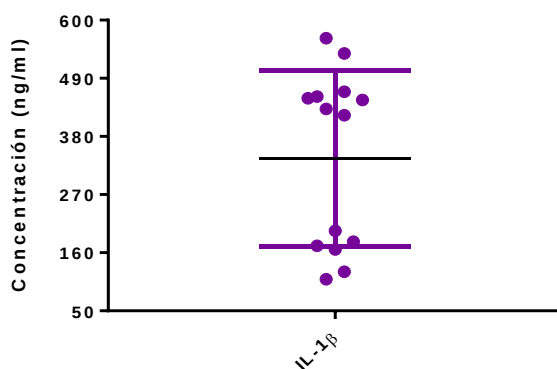


Figura 27. Niveles de IL-1 β en el LS de pacientes con OA (n=25).

La cuantificación de la IL-6, otra citocina inflamatoria, proporcionó información sobre la respuesta inflamatoria local en las articulaciones de los pacientes con OA. Los resultados se ilustran en la Figura 28. Los niveles medios de IL-6 en el LS son de $291,3 \pm 21,49$ ng/mL.

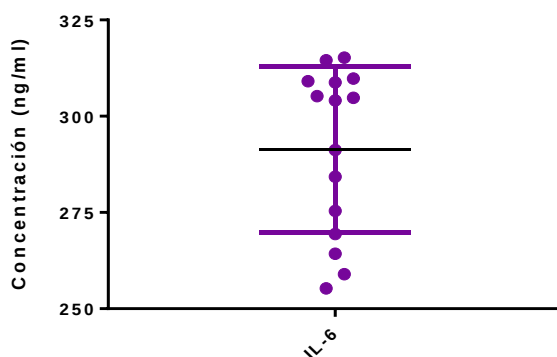


Figura 28. Niveles de IL-6 en el LS de pacientes con OA (n=25).

El HA, un componente esencial del LS, se evaluó para entender su papel en la regulación de la inflamación articular en pacientes con OA. Este se midió directamente en el LS y también después de un proceso de aislamiento y purificación de EV en el LS de estos pacientes con OA. La concentración media de HA en el LS es de $561,6 \pm 129,9$ ng/mL. Además, la media de HA en el filtrado es de $86,88 \pm 3,43$ ng/mL. Estos resultados se presentan en la Figura 29, permitiendo una evaluación completa de la presencia y distribución del HA en el entorno sinovial. Cabe destacar que el HA presente en el LS filtrado es inferior, ya que el HA queda retenido en la SEC.

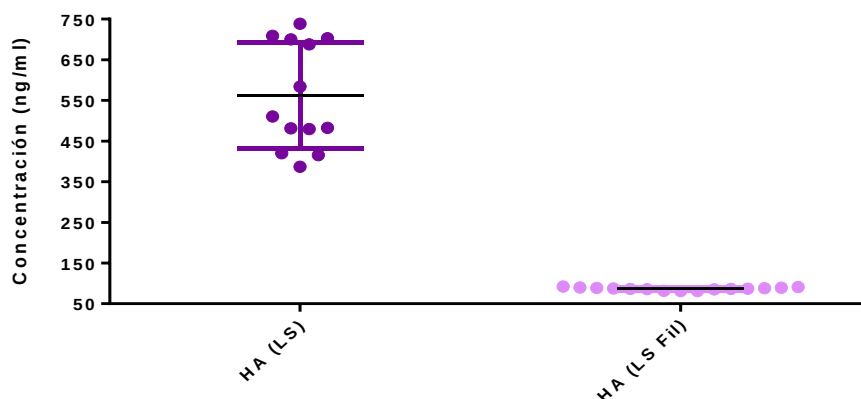


Figura 29. Niveles de HA en el LS y después del filtrado en pacientes con OA (n=25).

Estos ensayos proporcionan una visión detallada de la respuesta inflamatoria en el entorno sinovial de pacientes con OA. La correlación de estos resultados con las observaciones visuales y otros datos demográficos permitirá una comprensión más completa de los mecanismos subyacentes de la enfermedad y facilitará la identificación de posibles objetivos terapéuticos.

4.2. Caracterización de las vesículas extracelulares del líquido sinovial

4.2.1. TRPS con el qNano de Izon

Después de caracterizar el LS de pacientes con OA, se procedió al aislamiento y purificación de las EV presentes en el LS, utilizando ultracentrífuga y SEC. A continuación, empleamos la técnica TRPS con el instrumento qNano de Izon para medir el tamaño de partícula, la concentración y la carga de estas EV.

Los resultados obtenidos del qNano pueden observarse en la Figura 30.

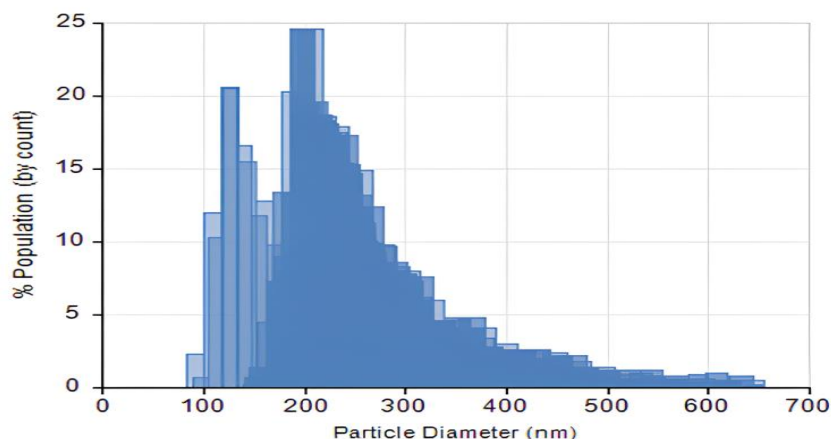


Figura 30. Análisis de partículas con el qNano. Diámetro de partícula vs. % de Población (por conteo) (n=25).

En cuanto al tamaño de partícula, la Figura 31 muestra que el tamaño medio de las partículas del LS es de $261,4 \pm 27,25$ nm, mientras que la moda del tamaño de partícula se sitúa en $196,40 \pm 22,37$ nm. Estos datos permiten comprender la distribución de tamaños de las EV, identificando las características dominantes y proporcionando una visión detallada de la heterogeneidad de las EV presentes en el LS.

Es importante destacar que más del 83% de las partículas medidas tienen un tamaño inferior a 250 nm. De las partículas que superan ese tamaño, la mayoría son agregados formados debido al pequeño tamaño inicial de las partículas individuales. Esto sugiere que el porcentaje de partículas por debajo de 250 nm sería aún mayor si no fuera por la formación de estos agregados, lo que indica una predominancia de EV pequeñas en las muestras. Esta información es crucial para entender las propiedades físicas y el comportamiento biológico de las EV en el LS, ya que las partículas de menor tamaño pueden tener diferentes funcionalidades y roles en comparación con las partículas más grandes.

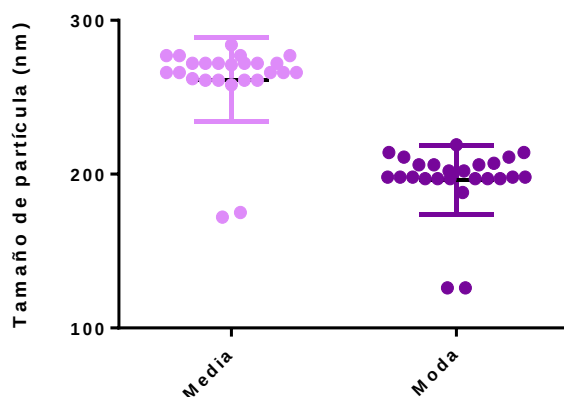


Figura 31. Tamaño Medio y Moda de EV en el LS de pacientes con OA (n=25).

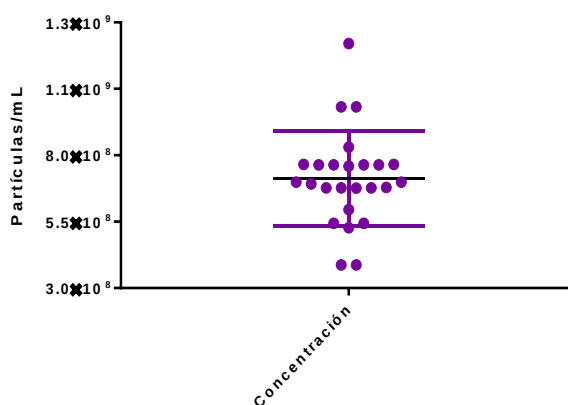


Figura 32. Concentración de EV/mL presentes en el LS de pacientes con OA (n=25).

En cuanto a la concentración de partículas/mL presentes en las muestras analizadas, la Figura 32 refleja una concentración media de EV en el LS de pacientes con OA es de $7,128\text{e}+008 \pm 1,778\text{e}+008$ partículas/mL. Este dato proporciona una medida cuantitativa de la cantidad de EV en la muestra, lo cual es crucial para entender la abundancia relativa de EV en el LS de pacientes con OA. La alta concentración de EV observada en estos pacientes

podría estar relacionada con los procesos patológicos subyacentes a la OA, sugiriendo una posible participación de las EV en la progresión de la enfermedad.

Por último, analizamos la carga o *Potencial Zeta* de estas partículas, en la Figura 33 se presentan las cargas medias y totales de las EV del LS. La carga media es de $-20,11 \pm 0,90$ mV. Estos valores ofrecen información sobre la carga superficial de las EV, lo cual es relevante para comprender su interacción con el entorno biológico y su estabilidad coloidal.

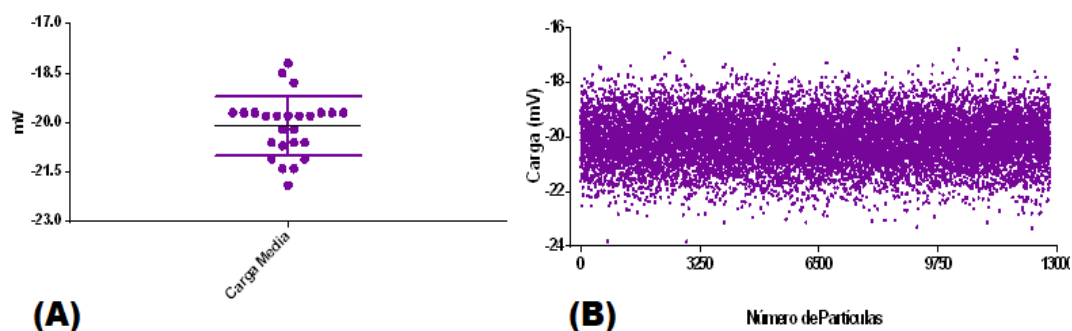


Figura 33. Cargas medidas con el qNano de IZON (n=25). (A) Cargas Medias en las muestras analizadas de LS de pacientes con OA. (B) Cargas de todas las muestras analizadas de LS de pacientes con OA.

Estos resultados numéricos complementan la caracterización física y cuantitativa de las EV en el LS de pacientes con OA. Proporcionan una visión integral de las propiedades físicas y cuantitativas, contribuyendo a una comprensión más detallada de su papel potencial en la patogénesis de la OA. La correlación de estos datos con la información demográfica y los marcadores inflamatorios previamente analizados permitirá avanzar en la comprensión de la participación de las EV en la patogénesis de la OA.

4.2.2. Estudio fenotípico mediante ELISA

Después de realizar las medidas con el qNano y la técnica TRPS, llevamos a cabo ensayos adicionales para confirmar la identificación de las partículas medidas como EV. Se siguió la metodología MISEV 2018 (Théry et al., 2018; ANEXO I) y MISEV 2023 (Welsh et al., 2024), cuyo propósito es ofrecer a los investigadores una perspectiva actualizada de los métodos disponibles, así como sus ventajas y limitaciones, para la producción, separación y caracterización de las EV procedentes de diversas fuentes, como cultivos celulares, fluidos corporales y tejidos sólidos. Para ello realizamos dos ensayos para detectar proteínas de superficie de EV (CD9 y CD81), dos ensayos para evaluar proteínas citosólicas presentes en EV (TSG101 y PDCD6IP), y finalmente un ensayo de control negativo (CNX).

Las proteínas de superficie CD9 y CD81 son miembros de la familia de las tetraspaninas, que son proteínas de membrana que desempeñan un papel crucial en diversas funciones celulares. CD9 y CD81 están involucradas en la regulación de la adhesión celular, la migración, la fusión de membranas y la señalización intracelular. En este estudio obtuvimos una concentración media en CD9 de $3,92 \pm 0,98 \mu\text{g/mL}$ y una concentración media en CD81 de $3,23 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$, como se detalla en la Figura 34.

TSG101 y PDCD6IP son proteínas citosólicas que forman parte del complejo ESCRT, esencial para la formación de EV. TSG101 recluta PDCD6IP al complejo, que a su vez facilita la liberación de EV al interactuar con CHMP4B. Además, PDCD6IP participa en procesos como apoptosis y endocitosis. Obtuvimos una concentración media en TSG101 de $153,70 \pm 44,98 \mu\text{g/mL}$ y una concentración media en PDCD6IP de $188,90 \pm 34,72 \mu\text{g/mL}$ (Figura 35).

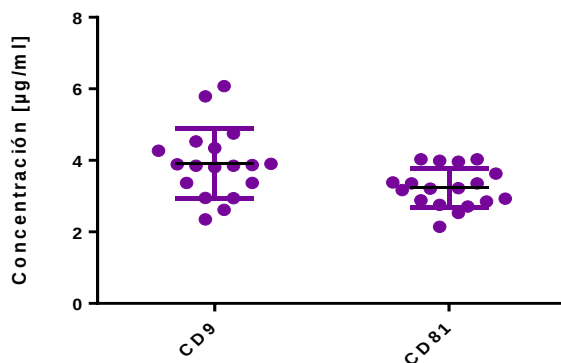


Figura 34. Concentración de CD9 y CD81 presente en EV aisladas y purificadas de LS de pacientes con OA (n=25).

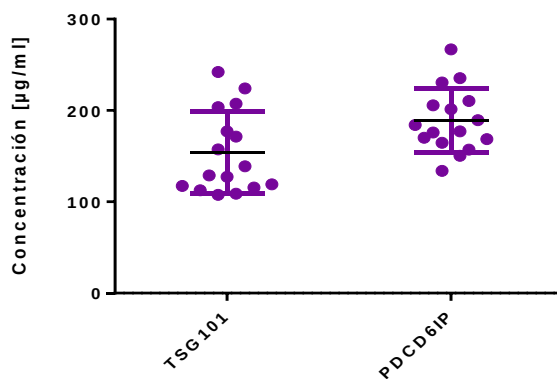


Figura 35. Concentración de TSG101 y PDCD6IP presente en EV aisladas y purificadas de LS de pacientes con OA (n=25).

Finalmente, para evaluar la pureza de las EV aisladas del LS, analizamos la presencia de CNX, una proteína integral de membrana del retículo endoplasmático. Debido a que la CNX tiene un tamaño similar a las EV, su detección podría indicar la presencia de

contaminantes celulares en la muestra. Los resultados mostraron una concentración media de $-14849,00 \pm 0,60 \mu\text{g/mL}$ (Figura 36), lo que sugiere que no había CNX presente en las EV del LS. Esto evidencia que el proceso de aislamiento fue efectivo y que las EV obtenidas están libres de contaminación por proteínas intracelulares, garantizando así la pureza de la muestra para posteriores análisis y/o usos.

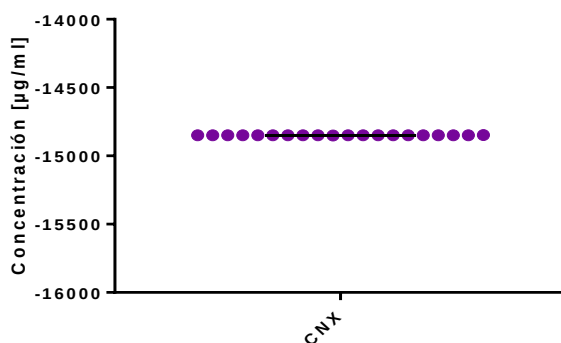


Figura 36. Concentración de CNX presente en EV aisladas y purificadas de LS de pacientes con OA (n=25).

Los resultados mostraron que los EV aislados fueron positivos para CD9, CD81, PDCD6IP, TSG101 y negativos para CNX. Estos ensayos confirmatorios proporcionan evidencia adicional de que estas partículas previamente medidas con el qNano de Izon son EV pequeñas, al demostrar la expresión de proteínas de superficie y citosólicas características. La variabilidad en las concentraciones observadas subraya la heterogeneidad inherente de las EV y destaca la importancia de la metodología MISEV 2023 (Welsh et al., 2024) para validar su identificación en el LS de pacientes con OA.

4.2.3. Microscopía Electrónica de Transmisión

Luego de los ensayos confirmatorios, realizamos un análisis con el TEM y obtuvimos las siguientes imágenes (Figura 37 y 38), que revelan las características morfológicas de las EV pequeñas presentes en el LS de pacientes con OA.

En la Figura 37, se observa la presencia de pequeñas estructuras membranas, consistentes con EV. Estas muestran una forma esférica o elipsoidal, con diámetros que varían en el rango de nanómetros. La heterogeneidad en el tamaño y forma de las EV refleja la diversidad en el origen celular y la composición molecular de las mismas, presentes en las muestras de LS de pacientes con OA. La presencia clara de una membrana lipídica que rodea cada EV indica su origen celular. La bicapa lipídica se presenta como una estructura delgada y oscura que delimita el espacio interno de la vesícula.

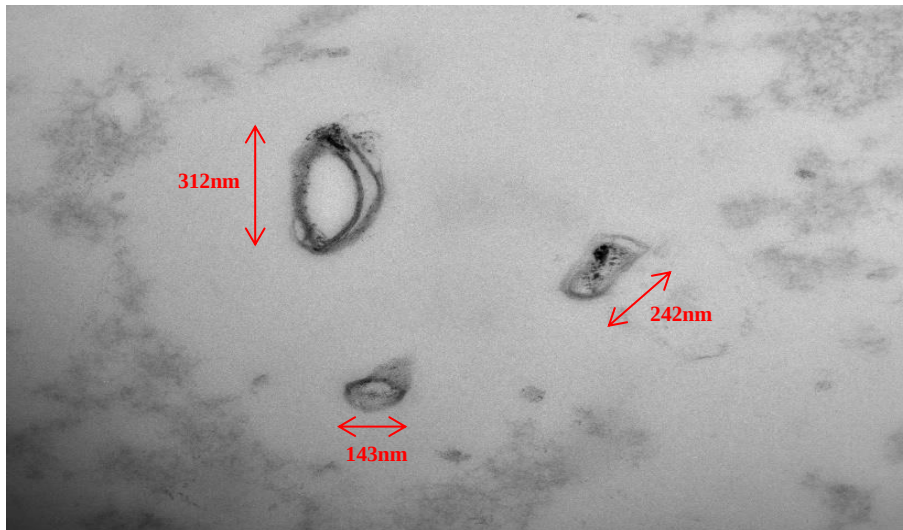


Figura 37. Imagen de EV pequeña con corte transversal realizada a 25k aumentos mediante microscopía TEM (Voltaje de aceleración = 100.0kV).

En la Figura 38, se visualiza el contenido interno de una EV pequeña, que puede variar desde material citoplasmático hasta moléculas específicas. Además, se observan signos de pérdida de contenido, como la presencia de material liberado en el espacio circundante, lo que sugiere un proceso de liberación activa de moléculas.

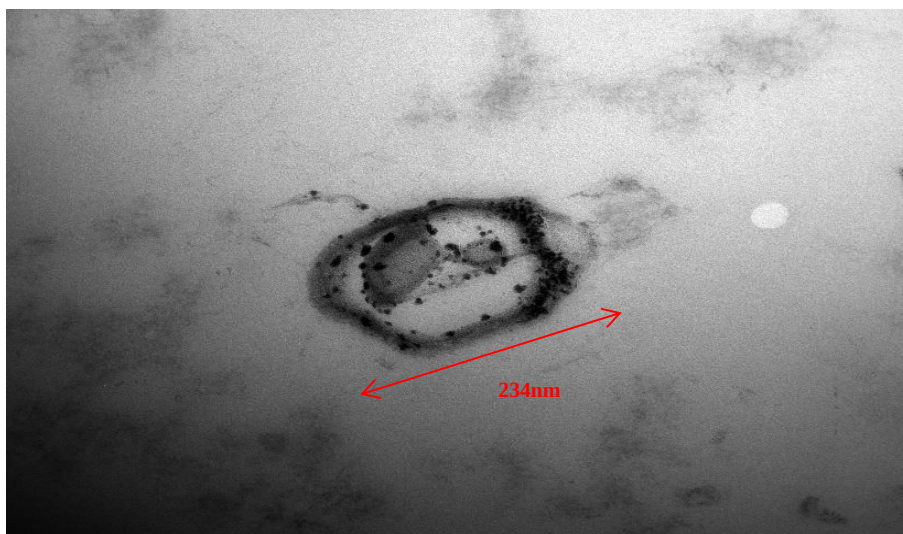


Figura 38. Imagen de EV pequeña con corte longitudinal realizada a 40k aumentos mediante microscopía TEM (Voltaje de aceleración = 100.0kV).

La alta resolución de TEM permite un análisis detallado de la superficie de las EV, incluyendo la identificación de posibles proteínas o marcadores específicos presentes en la membrana. Los puntos negros que se observan en la Figura 38 alrededor de la EV pequeña, corresponden a partículas de inmunomarcado, anticuerpos conjugados a nanopartículas de oro (anti-CD63), que previamente hemos identificado como un marcador de superficie en EV. Estos hallazgos respaldan y complementan los resultados obtenidos mediante TRPS y los ensayos confirmatorios, fortaleciendo la evidencia de la presencia de EV pequeñas en el LS de pacientes con OA y proporcionando información valiosa sobre su morfología.

4.3. Estudios en cultivo primario de sinoviocitos osteoartríticos humanos

4.3.1. Ensayos tiempo dependientes sin vesículas extracelulares

Con el objetivo de investigar los tiempos de uso óptimos de la IL-1 β sin producir daño en los sinoviocitos, se llevaron a cabo experimentos en SOA. Este enfoque se centra en determinar la eficacia y seguridad de la IL-1 β en diferentes condiciones experimentales.

Para determinar la viabilidad celular bajo diferentes condiciones de pase, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular con MTT. Se evaluaron tres variantes de pase: pase 0 (biológico), pase 1 y pase 2. El blanco son células sin tratamiento y el control son células estimuladas con IL-1 β (10 ng/mL). En la Figura 39 tenemos los resultados obtenidos del ensayo de viabilidad celular MTT que muestran que en pase 0 no se observaron cambios significativos en la viabilidad celular, en pase 1 se observó una mejora en la viabilidad celular, y en pase 2 se observó una disminución en la viabilidad celular. Con base en estos resultados, se decidió utilizar SOA en pase 1 para experimentos posteriores, ya que mostro una mejor la viabilidad celular.

Tras los ensayos de viabilidad celular se llevaron a cabo ensayos de proliferación en SOA para determinar el tiempo óptimo de proliferación. Se evaluaron tres tiempos: 24, 48 y 72 horas. De la misma manera que en el ensayo de viabilidad con MTT los blancos son células sin tratamiento y el control es IL-1 β (10 ng/mL). Los resultados (Figura 40) indicaron que la proliferación fue evidente a las 48 horas, mientras que a las 24 horas no se observaron cambios significativos y a las 72 horas la proliferación disminuyó. Por lo tanto, se determinó que el tiempo ideal para trabajar con los SOA sería a las 48 horas.

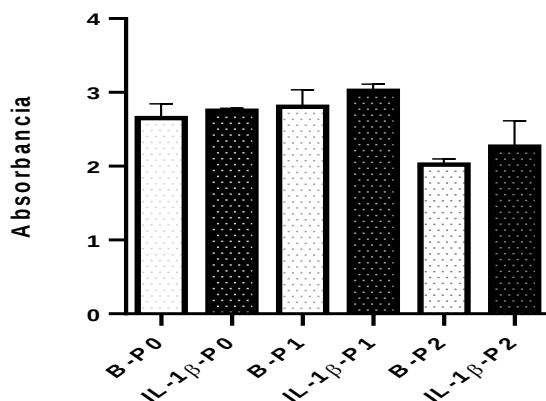


Figura 39. Ensayo de Viabilidad Celular MTT en SOA a diferentes pases celulares
Pase 0 (P0), Pase 1 (P1) y Pase 2 (P2) ($n=6$). B: Blanco.

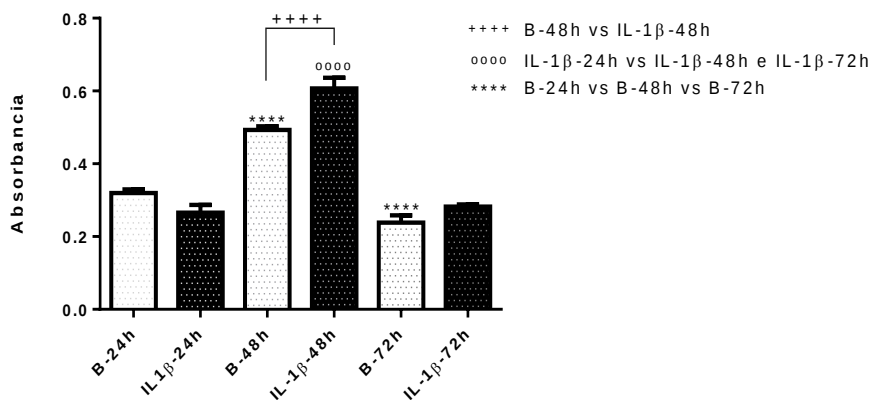
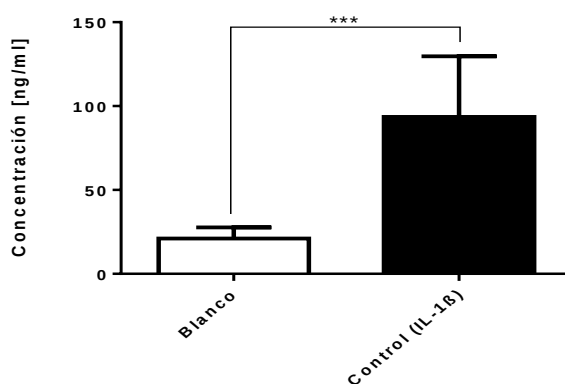


Figura 40. Ensayo de Proliferación en SOA a tiempos 24, 48 y 72 horas ($n=6$). B: Blanco. Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ y *** = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.

Para confirmar la efectividad de trabajar con SOA en pase 1 y a 48 horas, se realizó un ensayo ELISA de MMP-13. Los resultados obtenidos (Figura 41) corroboraron las observaciones anteriores, respaldando la elección del pase 1 y 48 horas como las condiciones óptimas para los experimentos, ya que el estímulo con IL-1 β produjo un aumento en la MMP-13.



*Figura 41. Concentración de MMP-13 en SOA en Pase 1 a 48 horas (n=6). Se compararon los dos grupos entre sí. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$. Se realizó el método de t test.*

Estos experimentos detallados permitieron establecer condiciones óptimas para trabajar con SOA, asegurando la viabilidad celular, la eficacia en la proliferación y la respuesta deseada en la expresión de marcadores relevantes como MMP-13. Estas condiciones son fundamentales para obtener resultados fiables y significativos en investigaciones relacionadas con las EV y la OA.

4.3.2. Ensayos con vesículas extracelulares de líquido sinovial en sinoviocitos osteoartríticos humanos

Con las condiciones de trabajo óptimas establecidas para los SOA, llevamos a cabo una serie de experimentos para explorar el potencial modulador de las EV del LS de pacientes con OA. Los experimentos se realizaron en pase 1 a tiempos de 48 y 96 horas, este segundo tiempo lo incluimos a posteriori al realizar los experimentos en COA y hallar resultados interesantes, los cuales se detallarán en profundidad en el siguiente apartado.

Utilizamos un blanco, el control representado por IL-1 β (10 ng/mL), y cuatro concentraciones de EV pequeñas (EV1=7,20E+08 EV/mL, EV2= 7,20E+07 EV/mL, EV3= 3,60E+07 EV/mL y EV4= 1,80E+07 EV/mL).

En el ensayo de viabilidad celular (Tabla 3), se observó que las diferentes condiciones no alteraron significativamente la viabilidad celular. Para ello se midió la ABS y la viabilidad se mide comparando la media de las células no tratadas con las medias de las células estimuladas, ya fuera con IL-1 β y/o EV pequeñas.

Tabla 3. MTT a las 48 y 96 horas (n=7). La viabilidad celular de SOA no se modificó en las células estimuladas con IL-1 β y/o EV en comparación con las células no tratadas.

<i>Condiciones</i>	<i>48 horas</i>		<i>96 horas</i>	
	<i>ABS Media</i>	<i>Viabilidad (%)</i>	<i>ABS Media</i>	<i>Viabilidad (%)</i>
<i>Blanco</i>	2,551	100,0	2,552	100,0
<i>Control (IL-1β)</i>	2,766	108,4	2,795	109,5
<i>EV1 (7,20E+08 EV/mL)</i>	2,729	107,0	2,756	108,0
<i>EV2 (7,20E+07 EV/mL)</i>	2,758	108,1	2,786	109,2
<i>EV3 (3,60E+07 EV/mL)</i>	2,761	108,3	2,789	109,3
<i>EV4 (1,80E+07 EV/mL)</i>	2,727	106,9	2,754	107,9
<i>EV1+C</i>	2,754	108,0	2,781	109,0
<i>EV2+C</i>	2,743	107,5	2,771	108,6
<i>EV3+C</i>	2,728	107,0	2,755	108,0
<i>EV4+C</i>	2,757	108,1	2,785	109,1

En cuanto al ensayo de proliferación (Figura 42), los resultados obtenidos indican un aumento muy significativo en la proliferación de las células estimuladas con IL-1 β en comparación con las células no tratadas, y las diferentes concentraciones de EV pequeñas también mostraron un efecto positivo, aunque en menor medida, esto se debe a que las EV pequeñas contienen factores de crecimiento, que en ausencia de estímulos externos pueden ser suficiente para aumentar la proliferación, y enzimas antioxidantes y proteínas que manejan el estrés oxidativo, que también puede contribuir a la proliferación basal. Al combinar IL-1 β con las concentraciones de EV pequeñas, se observó una reducción

significativa en la proliferación en comparación con el control (IL-1 β), siendo el incremento tiempo-dependiente a las 96 horas el cambio fue más destacado.

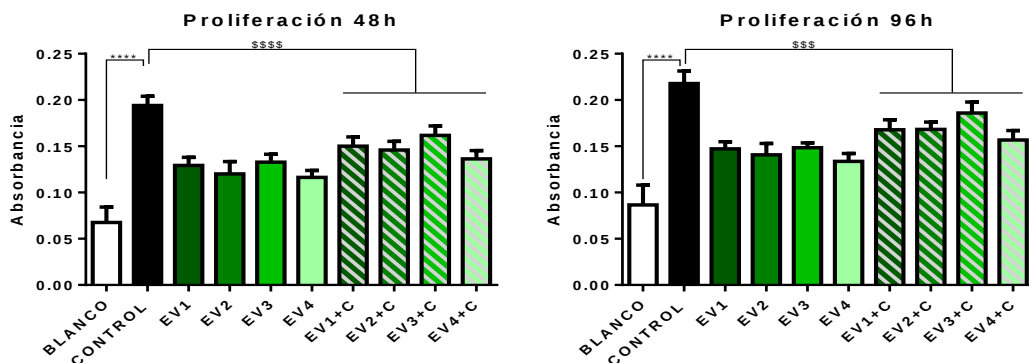


Figura 42. Ensayo de proliferación celular en SOA a las 48 y 96 horas ($n=7$). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ y *** = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.

Tras ello se midieron marcadores inflamatorios como la IL-6 (Figura 43), la IL-1 β incrementó significativamente la inflamación al aumentar la producción de IL-6. Sin embargo, al agregar las diferentes concentraciones de EV pequeñas del LS, se observó una reducción significativa de la inflamación, siendo más efectiva la concentración EV2 ($7,20E+07$ EV/mL) que se puede observar mejor a las 96 horas.

Por otro lado, se midió la MMP-3 (Figura 44), se observó un patrón similar, con un aumento inducido por IL-1 β y una disminución significativa al agregar EV pequeñas, siendo la EV2 ($7,20E+07$ EV/mL) también la más efectiva en la atenuación de la inflamación.

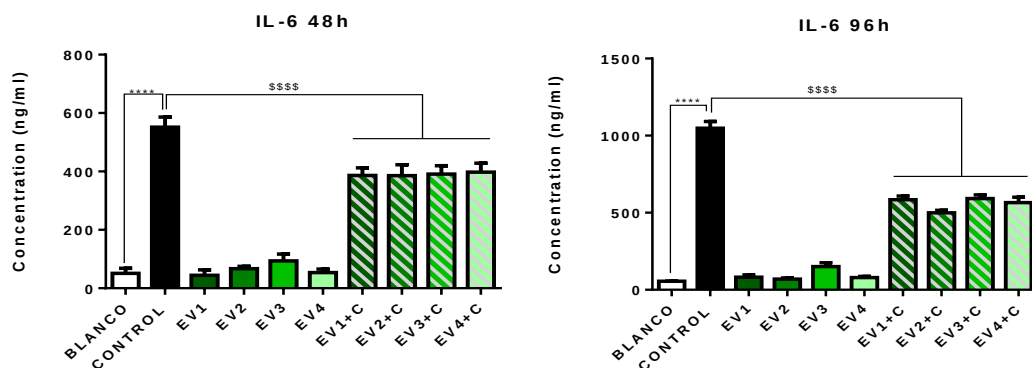


Figura 43. Niveles de IL-6 en los sobrenadantes de SOA a las 48 y 96 horas ($n=7$). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ y *** = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.

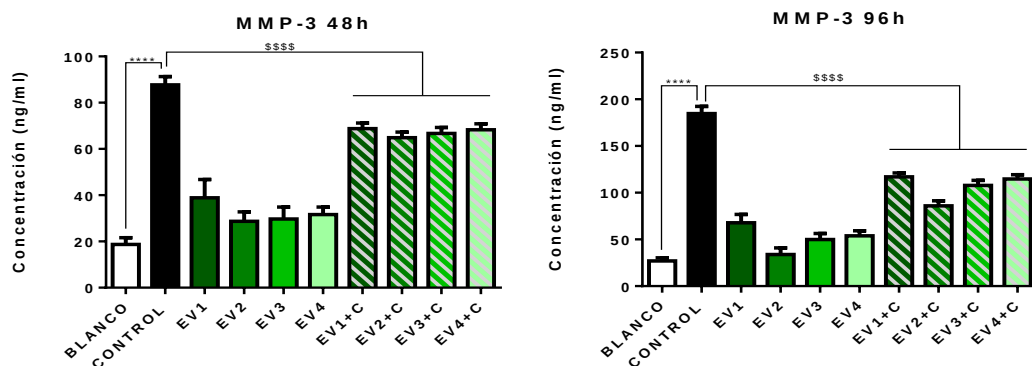


Figura 44. Niveles de MMP-3 en los sobrenadantes de SOA a las 48 y 96 horas ($n=7$). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ y *** = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.

Finalmente, en presencia de IL-1 β y EV pequeñas, se registró un aumento en la producción de HA, aunque en EV2 (7,20E+07 EV/mL) se observó una reducción significativa en comparación con el control y otros estímulos de EV pequeñas (Figura 45).

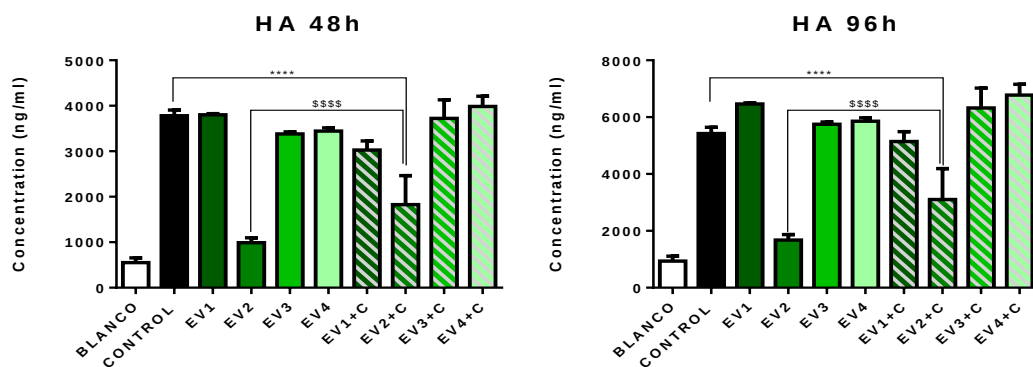


Figura 45. Niveles de HA en los sobrenadantes de SOA a las 48 y 96 horas (n=7).

Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.

Estos resultados destacan el potencial antiinflamatorio de las EV pequeñas del LS, mostrando efectos moduladores en la proliferación celular, la producción de citocinas, la actividad de enzimas asociadas con la OA, como la MMP-3 y los niveles de HA.

4.4. Ensayos en cultivos primarios de condrocitos osteoartríticos humanos con vesículas extracelulares de líquido sinovial

Se llevaron a cabo ensayos paralelos con los SOA y los COA para evaluar las respuestas diferenciales y comparar el impacto de las EV pequeñas del LS de pacientes con OA en estos dos tipos celulares.

En el caso de los COA, al contrario que los SOA, no fue necesario determinar las condiciones óptimas de pase y tiempo, ya que nuestro grupo de investigación ha trabajado con ellos en los últimos años, optando por trabajar a pase 0 y 48-96 horas debido a la pérdida de características deseables en pases posteriores.

Utilizamos un blanco, el control representado por IL-1 β (10 ng/mL), y cuatro concentraciones de EV pequeñas (EV1=7,20E+08 EV/mL, EV2= 7,20E+07 EV/mL, EV3= 3,60E+07 EV/mL y EV4= 1,80E+07 EV/mL).

La evaluación de la viabilidad celular mediante MTT (Tabla 4) mostró que no hubo modificaciones significativas en la viabilidad entre las diversas condiciones medidas en los COA, ya sea con estimulación con IL-1 β y/o EV pequeñas en comparación con las células no tratadas.

Tabla 4. MTT a las 48 y 96 horas (n=7). La viabilidad celular de COA no se modificó en las células estimuladas con IL-1 β y/o EV en comparación con las células no tratadas.

<i>Condiciones</i>	<i>48 horas</i>		<i>96 horas</i>	
	<i>ABS Media</i>	<i>Viabilidad (%)</i>	<i>ABS Media</i>	<i>Viabilidad (%)</i>
<i>Blanco</i>	2,547	100,0	2,565	100,0
<i>Control (IL-1β)</i>	2,765	108,6	2,794	108,9
<i>EV1 (7,20E+08 EV/mL)</i>	2,728	107,1	2,755	107,4
<i>EV2 (7,20E+07 EV/mL)</i>	2,757	108,3	2,785	108,6
<i>EV3 (3,60E+07 EV/mL)</i>	2,760	108,4	2,788	108,7
<i>EV4 (1,80E+07 EV/mL)</i>	2,726	107,0	2,753	107,3
<i>EV1+C</i>	2,753	108,1	2,780	108,4
<i>EV2+C</i>	2,742	107,7	2,770	108,0
<i>EV3+C</i>	2,727	107,1	2,754	107,4
<i>EV4+C</i>	2,756	108,2	2,784	108,5

En cuanto a la proliferación celular en los COA (Figura 46), no se observaron variaciones significativas entre las células estimuladas con IL-1 β y/o EV pequeñas y las células no tratadas. Esto se atribuye al lento tiempo de proliferación inherente a los COA en comparación con los SOA.

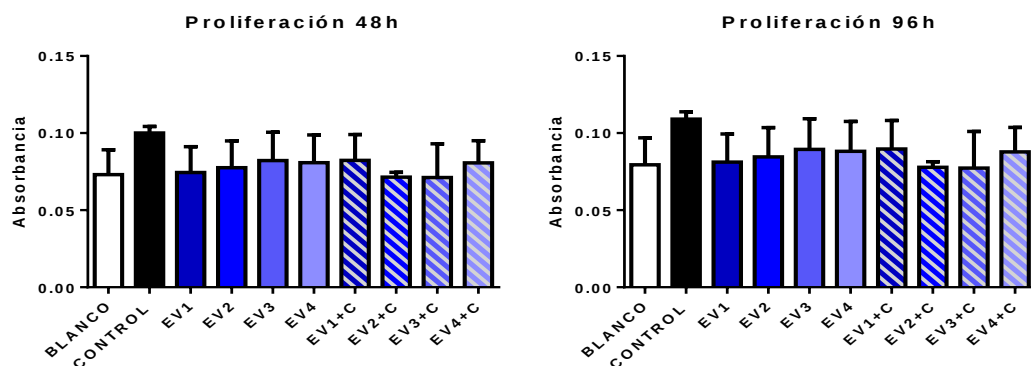


Figura 46. Ensayo de proliferación celular en COA a las 48 y 96 horas ($n=7$). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$ y *** = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.

Para los COA, la IL-1 β indujo un aumento significativo en la producción de IL-6 (Figura 47). No obstante, al agregar diferentes concentraciones de EV pequeñas del LS, se observó una reducción significativa de la inflamación, siendo más efectiva la concentración EV2 (7,20E+07 EV/mL), especialmente a las 96 horas.

La concentración de MMP-13 en los COA mostró un aumento significativo en células estimuladas con IL-1 β , mientras que la adición de EV pequeñas redujo significativamente esta respuesta inflamatoria, siendo EV2 la concentración más efectiva, con un efecto acumulativo en el tiempo (Figura 48).

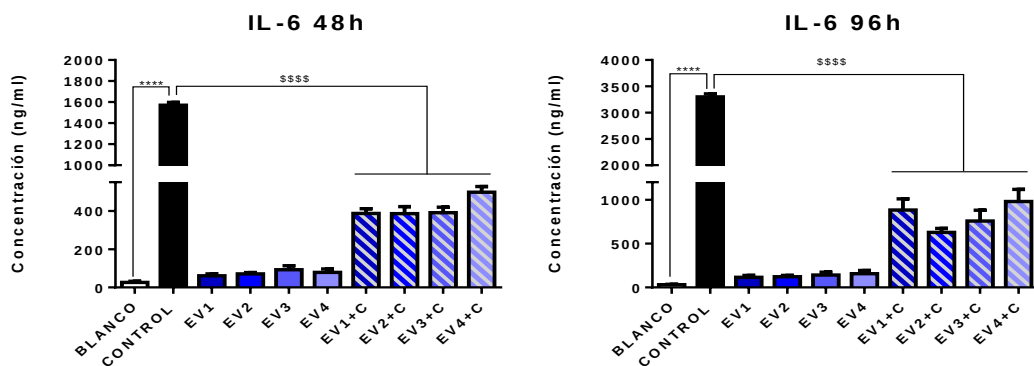


Figura 47. Niveles de IL-6 en los sobrenadantes de COA a las 48 y 96 horas ($n=7$). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. $*$ = $p<0,05$, $**$ = $p<0,01$ y $***$ = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.

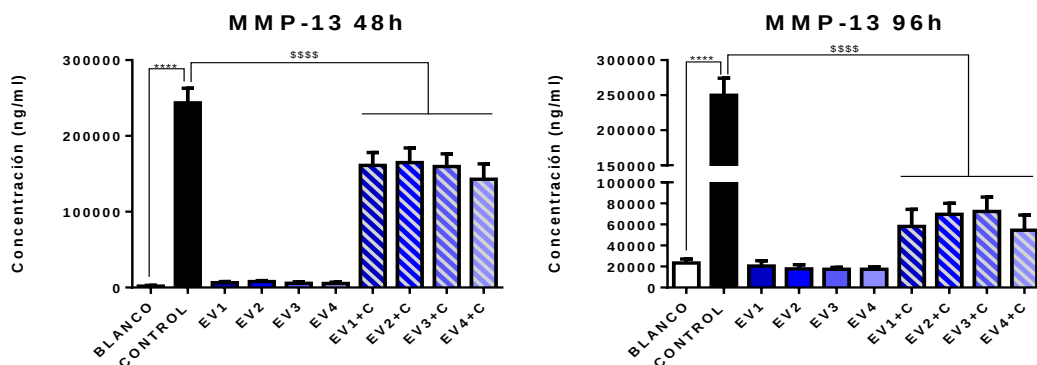


Figura 48. Niveles de MMP-13 en los sobrenadantes de COA a las 48 y 96 horas ($n=7$). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. $*$ = $p<0,05$, $**$ = $p<0,01$ y $***$ = $p<0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.

En el ensayo de HA (Figura 49), se observó un aumento esperado en la producción de HA en COA estimulados con IL-1 β , y los resultados indicaron que los EV pequeñas aumentaron significativamente la producción de HA de manera dependiente del tiempo a las 96 horas en comparación con la IL-1 β . Además, en presencia de IL-1 β y EV pequeñas, los COA también aumentaron la producción de HA, aunque no fue significativo en comparación con las células estimuladas solo con EV pequeñas.

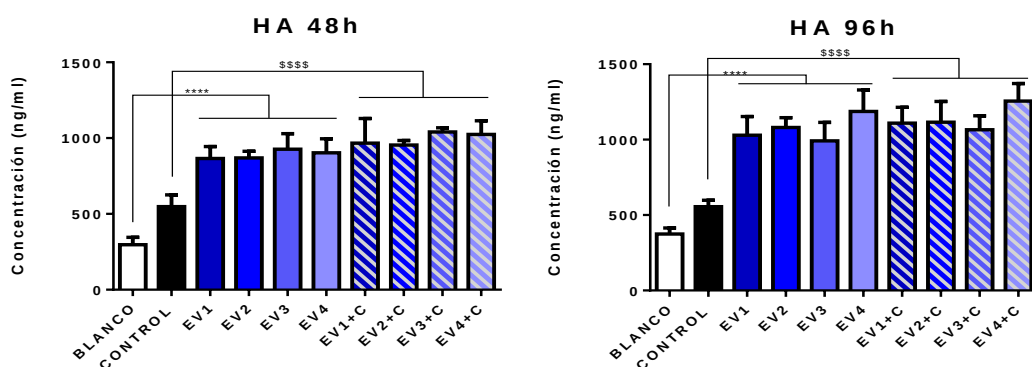


Figura 49. Niveles de HA en los sobrenadantes de COA a las 48 y 96 horas (n=7). Cada grupo se comparó con el resto de los grupos. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ y *** = $p < 0,001$. Se le realizó el método de ANOVA seguido del test de múltiple comparación de Tukey.

Estos resultados muestran la respuesta celular de los COA a los estímulos inflamatorios, así como la capacidad moduladora de las EV pequeñas. Proporcionan una visión más completa de la regulación de las células en el contexto de la OA, destacando el potencial de las EV pequeñas del LS para modular la inflamación y la producción de factores clave asociados con la enfermedad.

5. Discusión

La OA es una de las enfermedades articulares más frecuentes y debilitantes a nivel mundial, representando una carga significativa para la salud pública. Se ha estudiado el potencial terapéutico de las EV pequeñas del LS en modelos in vitro de SOA y COA. El análisis del contenido y las propiedades de las EV pequeñas presentes en el LS de pacientes con OA podría revelar biomarcadores y dianas terapéuticas potenciales. Además, la investigación sobre el papel de las EV pequeñas en la comunicación intercelular y la modulación de la respuesta inflamatoria y degenerativa en la articulación osteoartrítica podría conducir al desarrollo de terapias basadas en EV pequeñas para la OA. Estos estudios tienen como objetivo aportar nuevas perspectivas para poder hacer un diagnóstico más precoz y un tratamiento más específico de la OA.

Los resultados obtenidos de las muestras de LS de pacientes con OA, respecto al género y la edad, se ajustan a los estándares clínicos de la OA. Esta patología es más común en mujeres que en hombres, con una proporción de 3:1 (Zhang & Jordan, 2010; Tschon et al., 2021). La prevalencia de OA aumenta con la edad, siendo más común en personas mayores de 60 años (Warner & Valdes, 2016; Blanco García et al., 2020; Arthritis Foundation, 2023).

En el contexto de la OA, el LS es un indicador clave de la progresión de la enfermedad. La caracterización visual, basada en aspectos como el color, la transparencia y la viscosidad, revela cambios en el LS que indican diferentes etapas de la OA en los pacientes. Según Singhal et al. (2012), es posible clasificar el LS en cinco grupos en función de sus características físicas, lo que proporciona una herramienta valiosa para el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad:

- Grupo I - LS normal o sano: Transparente, incoloro y altamente viscoso.
- Grupo II - LS no inflamatorio: Transparencia con tonalidades amarillentas y una viscosidad elevada.
- Grupo III - LS inflamatorio: Apariencia opaca o turbia, color amarillo y baja viscosidad.
- Grupo IV - LS séptico: Opaco o purulento, color blanco y viscosidad muy baja.
- Grupo V - LS hemorrágico: Color rojo, con variaciones en la transparencia y viscosidad que pueden ser altas o bajas, dependiendo de la presencia de coágulos.

Estos resultados, en relación con las propiedades visuales del LS en la OA, concuerdan con investigaciones anteriores (Oliviero et al., 2022; Vincent, 2022) y refuerzan los estándares clínicos establecidos para la OA. La diversidad en las características visuales del LS, como la apariencia, el color y la viscosidad, subraya la importancia de considerar estos aspectos tanto en el proceso diagnóstico como en el tratamiento de la enfermedad.

En cuanto a las analíticas sanguíneas, todos los pacientes presentaron una velocidad de sedimentación dentro de los rangos normales, lo cual indica que no hay inflamación atribuible a causas distintas de la inflamación sinovial.

Biomarcadores en el LS y su Relación con la OA

En cuanto a los biomarcadores medidos en el LS, como la CRP, IL-1 β , IL-6 y HA, se ha demostrado que están asociados con la inflamación sinovial en la OA y reflejan la gravedad de la enfermedad (Haraden et al., 2019; Sanchez-Lopez et al., 2022). Hemos establecido la relación entre estos biomarcadores y los grupos previamente creados para la caracterización visual de los LS de los pacientes con OA. Las concentraciones de CRP, IL-1 β e IL-6 medidas en los LS de los pacientes con OA fueron más altas en el grupo III, como era de esperar, ya que estos LS están inflamados. Este hallazgo resalta la importancia de las citocinas, particularmente IL-1 β e IL-6, como indicadores significativos de inflamación sinovial. Por otro lado, el HA era más alto en los grupos I y II, indicando LS más normales o sanos. Por lo tanto, a mayor opacidad, color amarillo y baja viscosidad, el LS estaría en el grupo III, sugiriendo un mayor grado de inflamación y un mayor desarrollo de la OA en el paciente. Comprender estos cambios puede contribuir al diagnóstico y manejo efectivo de la OA, ya que un LS saludable debe ser transparente y denso.

No obstante, el interés de nuestros resultados radica en el papel de otros agentes de comunicación intercelular, las EV pequeñas. El estudio de la concentración y el fenotipo de estas EV en el LS es crucial para comprender mejor la fisiopatología de esta enfermedad. Para la caracterización de las partículas presentes en el LS de los pacientes con OA, se determinó la concentración y poblaciones de las EV mediante TRPS; el fenotipo y la

morfología de estas por ELISA y TEM respectivamente. Este enfoque permitió analizar detalladamente las propiedades de las EV presentes en el LS de pacientes con OA. Los resultados del estudio realizado con el qNano concuerdan con las directrices de MISEV 2023 (Welsh et al., 2024) en cuanto al tamaño de partícula y concentración de las EV presentes en los LS de los pacientes con OA. Estos resultados se asemejan, en cuanto a tamaños y concentraciones de partículas, a los obtenidos por Rüwald et al. (2020) y Zhang et al. (2023), pese a haber realizado un protocolo de aislamiento de las EV diferente.

De las muestras evaluadas, sólo dos presentaron un tamaño de partícula medio y una moda inferior al resto. Estas dos muestras las clasificamos como Grupo II o LS no inflamatorio debido a sus propiedades físicas, al presentar transparencia con tonalidades amarillentas y una viscosidad elevada. En las Figuras 26, 27 y 28, se puede observar que estas muestras también presentaron una menor concentración de CRP, IL-1 β e IL-6 (los puntos más bajos de cada Figura), lo que indica un menor grado de inflamación en comparación con el resto de LS. Además, estas muestras mostraron una mayor concentración de EV. Estos resultados resultan muy interesantes ya que sugieren que los LS de pacientes con un menor grado de patología tendrían un menor tamaño de partícula y una mayor concentración de EV.

Este hallazgo resalta la importancia de la caracterización física y bioquímica de las muestras, ya que la correlación observada entre el tamaño de partícula, la concentración de biomarcadores inflamatorios y la concentración de EV puede proporcionar información valiosa sobre el estado inflamatorio de los pacientes. La identificación de un menor tamaño de partícula y una mayor concentración de EV en LS con menos inflamación podría ser fundamental para el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos en la OA.

Utilizando el qNano, también medimos el *Potencial Zeta* de estas partículas, proporcionando información sobre la carga superficial de estas partículas. Estos valores son relevantes para comprender su interacción con el entorno biológico. Aunque no hay publicaciones que específicamente aborden el estudio de la carga presente en las partículas del LS de los pacientes con OA, se puede observar cierta similitud con otros trabajos que miden las cargas de las EV presentes en plasma (Deregibus et al., 2016; Midekessa et al.,

2020). Estas partículas presentan una carga negativa en torno a -20 mV, lo cual desempeña un papel crucial en diversos procesos biológicos, especialmente en la comunicación intercelular. La comprensión de la carga negativa en la superficie de las EV es esencial en aplicaciones como los sistemas de administración de medicamentos, donde esta carga influye en el reconocimiento y la captación de estas vesículas por parte de las células (Elsharkasy et al., 2020). Por otro lado, existen métodos de precipitación que se basan en la carga negativa de las EV para aislarlas y purificarlas de manera eficiente (Tamrin et al., 2023).

El análisis fenotípico de las EV en pacientes con OA se realizó siguiendo las directrices de MISEV 2018 (Théry et al., 2018; ANEXO I) y MISEV 2023 (Welsh et al., 2024). Se utilizaron marcadores proteicos específicos para determinar la composición de las EV aisladas del LS de pacientes con OA. Se han utilizado como marcadores proteicos transmembrana CD9 y CD81, como marcadores citosólicos PDCD6IP y TSG101 y como control un marcador negativo CNX, ya que estos marcadores son los más comúnmente descritos para EV pequeñas y por lo tanto los más confirmatorios de su presencia. Los resultados mostraron que las EV aisladas del LS de pacientes con OA fueron positivas para CD9, CD81, PDCD6IP, TSG101 y negativas para CNX, por lo tanto, son EV pequeñas.

Estos hallazgos son consistentes con estudios previos en que han observado perfiles distintos de tetraspaninas CD9 y CD81 en las EV plasmáticas de pacientes con OA no tratados en comparación con controles sanos (Rydland et al., 2023). Las tetraspaninas desempeñan un papel crucial en el direccionamiento y la absorción de las EV pequeñas, siendo las proteínas que recubren la superficie de este tipo de EV. Además, estudios como los de Andreu & Yáñez-Mó (2014) y Jankovičová et al. (2020) resaltan la importancia de las tetraspaninas en la biogénesis y función de las EV. Andreu & Yáñez-Mó (2014) destacan que las tetraspaninas son esenciales para la biogénesis de las EV pequeñas y regulan el tráfico y fusión de las vesículas, facilitando la transferencia de contenido biológico y afectando la fisiología celular y la comunicación intercelular. Jankovičová et al. (2020) profundizan en cómo las tetraspaninas actúan como reguladores de carga, determinando qué moléculas se empaquetan en las EV pequeñas, lo cual es crucial para la modulación de

procesos biológicos y patológicos al influir en la composición del microambiente extracelular.

Finalmente, tras estudiar el fenotipo y para completar la caracterización de las EV pequeñas del LS, se utilizó el TEM, proporcionando información detallada sobre su estructura, morfología y tamaño. Esta técnica nos permite visualizar las EV con alta resolución, confirmando su presencia, e identificando los marcadores de superficie, como el CD63, que se puede observar en la Figura 38. Este marcador es ampliamente utilizado en la caracterización de EV debido a su alta expresión en estas estructuras y su unión a partículas de oro detectables gracias al TEM (Kolhe et al., 2017; Ben-Trad et al., 2022). Diversos estudios han utilizado el TEM para corroborar la existencia de EV en el LS, revelando variaciones en tamaño, concentración y marcadores de superficie entre diferentes condiciones articulares, como el fallo aséptico del implante y la infección periprotésica de la articulación (Rüwald et al., 2020; Saadeldin et al., 2023), lo que refuerza nuestra elección del TEM como método confirmatorio de la presencia de EV en el LS de pacientes con OA.

La importancia de estos resultados radica en que la mayor parte de las EV aisladas del LS se consideran EV pequeñas al ser de un tamaño inferior a 250 nm, cumplir con los marcadores fenotípicos medidos mediante ELISA y confirmar la morfología a través del TEM según las directrices marcadas en 2018 por la *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) MISEV 2018 (Théry et al., 2018). Sin embargo, según la nueva guía MISEV 2023 (Welsh et al., 2024), estas EV ya no pueden denominarse exosomas. La nueva guía exige demostrar la biogénesis de las EV pequeñas para clasificarlas como exosomas, algo que no se ha hecho en el presente estudio. Por lo tanto, a pesar de cumplir con los demás criterios descritos en MISEV 2023, estas EV deben denominarse EV pequeñas.

Lo más novedoso de este estudio es que actualmente no se ha descrito la composición de EV en el LS humano en el contexto de la OA. En cambio, sí se ha descrito en algunos estudios sobre caballos (Boere et al., 2019; Anderson et al., 2022; Mustonen et al., 2023). Esto podría deberse a que los caballos tienen un mayor volumen de LS, lo que facilita la obtención de muestras, o a factores económicos, ya que la industria equina representa un

mercado significativo. Este hallazgo aporta una nueva dimensión al estudio de las EV y su papel en la OA, proporcionando una base para futuras investigaciones en este campo.

Ensayos Preliminares y Evaluación del Potencial Terapéutico

El estudio preliminar sobre el uso de EV pequeñas derivadas de LS como posibles biomarcadores para diagnosticar la gravedad y evolución de la OA ofrece una perspectiva alentadora. La OA, una enfermedad articular degenerativa prevalente, presenta desafíos importantes en cuanto a su diagnóstico temprano y manejo efectivo. La identificación de biomarcadores precisos podría revolucionar el abordaje clínico, permitiendo intervenciones tempranas y personalizadas.

Nuestra investigación se basa en estudios previos que sugieren el potencial papel de las EV pequeñas en la OA. Investigaciones en nuestro laboratorio han demostrado que las EV derivadas de células MSC del tejido adiposo tienen efectos beneficiosos en modelos de OA, reduciendo la inflamación y la degradación del cartílago (Platas et al., 2013; Tofiño-Vian et al., 2017; Tofiño-Vian et al., 2018; Cavallo et al., 2021). Estos hallazgos respaldan la conexión entre las características fenotípicas de las EV pequeñas y la progresión de la OA, abriendo nuevas perspectivas para el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad.

En nuestra investigación, evaluamos la viabilidad y la proliferación celular de SOA en presencia de EV pequeñas del LS bajo diferentes condiciones experimentales. Los resultados muestran una viabilidad celular constante en diferentes pases celulares, lo que indica un estado óptimo y una capacidad de mantenimiento adecuada en las condiciones de cultivo. Este hallazgo coincide con estudios previos que resaltan la capacidad de los SOA para mantener su viabilidad y función en cultivos in vitro (Filali et al., 2022). Además, observamos un aumento significativo en la proliferación celular a las 48 horas, especialmente bajo la estimulación con IL-1 β , lo cual concuerda con investigaciones previas sobre el papel de esta interleucina en la proliferación de células sinoviales y en la progresión de la OA (Kato et al., 2014; Filali et al., 2022).

Los resultados también revelan un aumento esperado en la inflamación en los SOA estimulados con IL-1 β en comparación con los no tratados, con un incremento significativo en la producción de IL-6 y MMP-3. Sin embargo, observamos una reducción significativa en la producción de estas citocinas proinflamatorias en presencia de EV pequeñas del LS, lo que coincide con estudios previos que han destacado su capacidad para modular la respuesta inflamatoria en la OA (Foers et al. 2021; Bakinowska et al., 2023).

Además, nuestros resultados muestran un aumento significativo en la producción de HA en presencia de EV pequeñas. Este hallazgo respalda la evidencia previamente descrita por Cosenza et al., 2017 y Tofiño-Vian et al., 2018, quienes también han destacado el papel crucial de las EV en la producción de HA y su potencial para proteger el cartílago. Estas investigaciones respaldan la hipótesis de que la interacción entre las EV pequeñas y la matriz extracelular puede tener un impacto positivo en la homeostasis y la salud del tejido cartilaginoso.

Al igual que con los SOA, evaluamos la viabilidad y la proliferación en los COA bajo las mismas condiciones. No se observaron cambios significativos entre los condrocitos estimulados con IL-1 β y/o EV pequeñas del LS y aquellos no tratados. Este análisis comparativo reveló una constancia en la viabilidad y la proliferación celular, independientemente de los estímulos recibidos. Se observó un aumento significativo en la concentración de IL-6 y MMP-13 en células estimuladas con IL-1 β en comparación con las no tratadas. Sin embargo, la presencia de EV pequeñas del LS junto con IL-1 β resultó en una disminución en la producción de estas citocinas en comparación con el grupo de control, sugiriendo una posible regulación positiva por parte de las EV pequeñas.

En cuanto a la producción de HA, se encontró un aumento esperado en condrocitos estimulados con IL-1 β en comparación con las células no tratadas. Además, se observó un incremento significativo en la producción de HA inducida por EV pequeñas del LS, alcanzando su punto máximo a las 96 horas. La adición de IL-1 β junto con EV pequeñas del LS también resultó en un aumento en la producción de HA, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa en comparación con las células estimuladas solo con EV del

LS. Estos resultados sugieren el potencial de utilizar EV pequeñas como agentes terapéuticos condroprotectores al modular la matriz extracelular.

Es importante destacar que, en ciertas condiciones experimentales, como la presencia de una concentración específica de EV pequeñas (EV2: $7,20E+07$ EV/mL), se produjo una reducción significativa mayor en la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6, MMP-3 y MMP-13, en comparación con el control, tanto en COA como en SOA. Aunque las EV utilizadas se extrajeron del LS y no de MSC del tejido adiposo como en los estudios previos de nuestro laboratorio (Tofiño-Vian et al., 2018), esta concentración parece ser la más adecuada para su uso como posible terapia frente a la OA, dado su impacto positivo en COA y SOA.

La reducción significativa en la producción de citocinas inflamatorias a esta concentración específica de EV pequeñas podría deberse a varios factores. En primer lugar, las EV pequeñas a esta concentración pueden contener una mayor cantidad de moléculas antiinflamatorias, como itaconato, que suprimen más eficazmente las respuestas inflamatorias de los macrófagos (Yamaguchi et al., 2023). Además, a esta dosis, las EV pueden inducir una mayor producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, que contrarrestan los efectos proinflamatorios (Hwang et al., 2021). Por otro lado, la fusión de las EV pequeñas con las células diana a esta concentración puede equiparlas mejor con la maquinaria molecular que las hace más susceptibles a señales antiinflamatorias (Papareddy et al., 2024). También es posible que las EV pequeñas a esta dosis inhiban más eficazmente vías de señalización inflamatoria como la del TNF, reduciendo drásticamente la liberación de EV proinflamatorias (Yang et al., 2018).

Además, podría existir un efecto umbral, donde esta concentración de EV pequeñas es óptima para suprimir la inflamación, mientras que dosis más altas o bajas son menos efectivas (Hezel et al., 2017). Por lo tanto, la concentración de EV pequeñas (EV2: $7,20E+07$ EV/mL) parece ser un punto crítico donde estas ejercen su máximo efecto antiinflamatorio, posiblemente a través de una combinación de los mecanismos mencionados. Estudios futuros podrían profundizar en los detalles de estos procesos.

Limitaciones del Estudio

Este estudio presenta varias limitaciones que deben ser consideradas. En primer lugar, la dificultad para obtener muestras de LS de sujetos sanos para estudios comparativos plantea desafíos tanto éticos como prácticos. Esta limitación podría abordarse mediante el uso de modelos animales o métodos no invasivos que permitan obtener datos comparativos de manera ética y eficiente.

La falta de estandarización en los métodos de aislamiento y caracterización de EV pequeñas representa otra limitación significativa. La variabilidad en los protocolos puede dificultar la comparación de resultados entre diferentes estudios, lo que subraya la necesidad de establecer métodos uniformes que garanticen la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados obtenidos.

Además, la evidencia sobre el potencial terapéutico de las EV pequeñas se basa principalmente en estudios in vitro y en modelos animales. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios clínicos adicionales para validar estos hallazgos y avanzar hacia su aplicación en el entorno clínico.

La producción a gran escala de EV pequeñas para aplicaciones clínicas presenta desafíos adicionales. Optimizar los procesos de producción y purificación es esencial para asegurar que las EV pequeñas sean seguras y efectivas cuando se utilicen en terapias clínicas.

Futuras Líneas de Investigación

Para avanzar en este campo, es crucial profundizar en el entendimiento de los mecanismos específicos mediante los cuales las EV pequeñas reducen la inflamación y promueven la reparación del tejido articular. Esta comprensión permitirá el desarrollo de terapias más efectivas y dirigidas.

Es fundamental realizar ensayos clínicos controlados y aleatorizados que evalúen la seguridad y eficacia de las EV pequeñas en pacientes con OA. Estos estudios proporcionarán

la evidencia necesaria para la eventual implementación clínica de terapias basadas en EV pequeñas.

Además, es importante explorar la relación entre la composición del LS y la progresión de la OA para identificar nuevos biomarcadores que puedan mejorar el diagnóstico y el tratamiento personalizado de la enfermedad. Finalmente, la optimización de los procesos de producción y purificación de EV pequeñas es crucial para su aplicación clínica. Hay que asegurar que estos procesos sean escalables y mantengan la calidad del producto final para la viabilidad de las terapias basadas en EV pequeñas.

En resumen, los hallazgos actuales sobre el potencial de los EV pequeñas del LS como biomarcadores y terapias para la OA son prometedores, pero se necesitan más estudios para validar estos resultados y superar las limitaciones existentes. Un enfoque multidisciplinario que combine investigaciones básicas y clínicas será crucial para avanzar en este campo y mejorar el manejo de la OA. Las EV pequeñas, al ser pequeñas vesículas liberadas por diversas células en el espacio extracelular, tienen un gran potencial para indicar cambios fisiológicos y patológicos en el cuerpo humano. Además, se ha demostrado que las EV pequeñas pueden ser fácilmente obtenidos, lo que los convierte en objetivos atractivos para pruebas pronósticas basadas en biomarcadores de enfermedades. Aunque aún no existe un fármaco para tratar la OA, se ha observado que las EV pequeñas desempeñan un papel crucial en su diagnóstico, progresión y tratamiento, lo que destaca la importancia de investigar su uso como biomarcadores y terapias potenciales para esta enfermedad degenerativa de las articulaciones.

6. Conclusiones

Las conclusiones de esta investigación se alinean con los objetivos planteados en la tesis doctoral sobre el estudio de las EV presentes en el LS en el contexto de la OA:

1.- Las EV presentes en el LS de pacientes con OA se aislaron y purificaron. En primer lugar, el análisis del tamaño de las vesículas indicó que la población mayoritaria se corresponde con las denominadas EV pequeñas o exosomas. En segundo lugar, el estudio del fenotipo con marcadores positivos y negativos de vesículas pequeñas, CD9, CD81, PDCD6IP, TSG101 y CNX, confirmó este hallazgo.

2.- Condrocitos y sinoviocitos procedentes de la articulación de pacientes con OA se aislaron, realizándose posteriormente cultivos primarios estimulados con IL-1 β . Seguidamente se establecieron las condiciones óptimas de los cultivos de sinoviocitos y condrocitos que posteriormente se utilizarían para el estudio con EV pequeñas de LS. En el caso de los sinoviocitos, se determinó trabajar en pase 1 a 48-96 horas tras la estimulación con IL-1 β asegurando así la viabilidad celular, la eficacia en la proliferación y la respuesta deseada en la expresión de marcadores relevantes. En el caso de los condrocitos, se trabajó en las condiciones establecidas en trabajos previos por nuestro grupo de investigación, pase 0 a 48-96 horas de estímulo, asegurando de esta manera que las células no pierden sus características fenotípicas.

3.- Los resultados obtenidos en los sinoviocitos estimulados con IL-1 β y tratados con diferentes concentraciones de EV pequeñas del LS parecen indicar que éstas ejercen efectos beneficiosos ya que no alteran la viabilidad celular, disminuyen la producción de IL-6 y MMP-3 y a su vez aumenta la producción de HA respecto a los controles. Además, disminuyen la proliferación cuando el sinoviocito se encuentra en un entorno inflamatorio.

4.- Con respecto a los condrocitos estimulados con IL-1 β , observamos que las EV pequeñas del LS no modificaron la viabilidad celular ni la proliferación, tal y como cabría esperar con este tipo celular. Si que encontramos efectos condroprotectores, ya que las EV del LS disminuyeron significativamente la producción de IL-6 y de MMP-13, principal enzima proteolítica que producen los condrocitos. Es interesante destacar, que las EV

pequeñas del LS aumentaron significativamente la síntesis de HA respecto a las células basales, en ausencia o presencia de IL-1 β en los dos tiempos ensayados.

5.- Nuestros resultados indican por primera vez el posible papel inmunomodulador y condroprotector que las EV pequeñas del LS ejercen y podrían ser la base de nuevas estrategias terapéuticas, además de aportar biomarcadores para un diagnóstico más precoz en patologías inflamatorias crónicas articulares como es la OA.

7. Bibliografía

Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(3):301-12.

Alcaraz MJ, Compañ A, Guillén MI. Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells as Novel Treatments for Musculoskeletal Diseases. *Cells*. 2019;9(1):98.

Al-Haik N, Lewis DA, Struthers G. Neutral protease, collagenase and elastase activities in synovial fluids from arthritic patients. *Agents Actions*. 1984;15(3-4):436-42.

Anderson JR, Jacobsen S, Walters M, Bundgaard L, Diendorfer A, Hackl M, et al. Small non-coding RNA landscape of extracellular vesicles from a post-traumatic model of equine osteoarthritis. *Front Vet Sci*. 2022;9:901269.

Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*. 2014;5:442.

Aubourg G, Rice SJ, Bruce-Wootton P, Loughlin J. Genetics of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022;30(5):636-49.

Bakinowska E, Kiełbowski K, Pawlik A. The Role of Extracellular Vesicles in the Pathogenesis and Treatment of Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Cells*. 2023;12(23):2716.

Banco de imágenes | Dolor [Internet]. [citado 27 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.dolor.com/herramientas-y-servicios/banco-de-imagenes>

Basallote SG. Live-Med. 200d. C. [citado 12 de mayo de 2024]. ¿Cuáles son las opciones de tratamiento farmacológico para pacientes con artrosis? Disponible en: <https://www.livemed.in/es/blog/cuales-son-las-opciones-de-tratamiento-farmacologico-para-pacientes-con-artrosis/>

Bay-Jensen AC, Sand JMB, Genovese F, Siebuhr AS, Nielsen MJ, Leeming DJ, et al. Chapter 31 - Structural Biomarkers. En: Karsdal MA, editor. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* [Internet]. Academic Press; 2016 [citado 12 de septiembre de 2023]. p. 203-33. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098479000313>

Ben-Trad L, Matei CI, Sava MM, Filali S, Duclos ME, Berthier Y, et al. Synovial Extracellular Vesicles: Structure and Role in Synovial Fluid Tribological Performances. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19):11998.

Bjørge IM, Kim SY, Mano JF, Kalionis B, Chrzanowski W. Extracellular vesicles, exosomes and shedding vesicles in regenerative medicine - a new paradigm for tissue repair. *Biomater Sci.* 2017;6(1):60-78.

Blanco García FJ, Silva Díaz MT, Quevedo Vila V, Seoane-Mato D, Pérez Ruiz F, Juan-Mas A, et al. Prevalencia de artrosis sintomática en España: Estudio EPISER2016. *Reumatol Clin.* 2020;S1699-258X(20)30023-1.

Blom AB, van den Berg WB. The Synovium and Its Role in Osteoarthritis. En: Bronner F, Farach-Carson MC, editores. *Bone and Osteoarthritis [Internet]*. London: Springer; 2007 [citado 15 de enero de 2024]. p. 65-79. (Topics in Bone Biology). Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-1-84628-701-5_4

Boere J, van de Lest CHA, de Grauw JC, Plomp SGM, Libregts SFWM, Arkesteijn GJA, et al. Extracellular vesicles in synovial fluid from juvenile horses: No age-related changes in the quantitative profile. *Vet J.* 2019;244:91-3.

Branch NSC and O. National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. NIAMS; 2017 [citado 8 de julio de 2023]. Osteoarthritis. Disponible en: <https://www.niams.nih.gov/health-topics/osteoarthritis>

Bruyère O, Cooper C, Pelletier JP, Branco J, Luisa Brandi M, Guillemin F, et al. An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: A report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 2014;44(3):253-63.

Burt KG, Scanzello CR. B cells in osteoarthritis: simply a sign or a target for therapy? *Osteoarthritis Cartilage.* 2023;31(9):1148-51.

Cavallo C, Merli G, Borzì RM, Zini N, D'Adamo S, Guescini M, et al. Small Extracellular Vesicles from adipose derived stromal cells significantly attenuate in vitro the NF- κ B dependent inflammatory/catabolic environment of osteoarthritis. *Sci Rep*. 2021;11:1053.

Chen B, Hong H, Sun Y, Chen C, Wu C, Xu G, et al. Role of macrophage polarization in osteoarthritis (Review). *Exp Ther Med*. 2022;24(6):757.

Chen D, Yu H, Zhang Y, Huang Y. Metabolomic analysis of extracellular vesicles from human synovial fluids. *Microchemical Journal*. 2022;177:107257.

Chen H, Wang L, Zeng X, Schwarz H, Nanda HS, Peng X, et al. Exosomes, a New Star for Targeted Delivery. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:751079.

Chen Y, Jiang W, Yong H, He M, Yang Y, Deng Z, et al. Macrophages in osteoarthritis: pathophysiology and therapeutics. *Am J Transl Res*. 2020;12(1):261-8.

Colombini A, Libonati F, Lopa S, Ragni E, De Luca P, Zagra L, et al. Immunomodulatory potential of secretome from cartilage cells and mesenchymal stromal cells in an arthritic context: From predictive fiction toward reality. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:992386.

Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16214.

Cosenza S, Toupet K, Maumus M, Luz-Crawford P, Blanc-Brude O, Jorgensen C, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics*. 2018;8(5):1399-410.

Damerau A, Kirchner M, Pfeifferberger M, Ehlers L, Do Nguyen DH, Mertins P, et al. Metabolic reprogramming of synovial fibroblasts in osteoarthritis by inhibition of pathologically overexpressed pyruvate dehydrogenase kinases. *Metab Eng*. 2022;72:116-32.

De Jong OG, Van Balkom BMW, Schiffelers RM, Bouten CVC, Verhaar MC. Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine. *Front Immunol*. 2014;5:608.

Deregibus MC, Figliolini F, D'antico S, Manzini PM, Pasquino C, De Lena M, et al. Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *Int J Mol Med*. 2016;38(5):1359-66.

Elsharkasy OM, Nordin JZ, Hagey DW, de Jong OG, Schiffelers RM, Andaloussi SE, et al. Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:332-43.

Esa A, Connolly K, Williams R, Archer C. Extracellular Vesicles in the Synovial Joint: Is there a Role in the Pathophysiology of Osteoarthritis? *Malays Orthop J*. 2019;13(1):1-7.

Estrada McDermott J, Pezzanite L, Goodrich L, Santangelo K, Chow L, Dow S, et al. Role of Innate Immunity in Initiation and Progression of Osteoarthritis, with Emphasis on Horses. *Animals (Basel)*. 2021;11(11):3247.

Favero M, Ramonda R, Goldring MB, Goldring SR, Punzi L. Early knee osteoarthritis. *RMD Open*. 2015;1(Suppl 1):e000062.

Felson DT, Hodgson R. Identifying and Treating Pre-Clinical and Early Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2014;40(4):699-710.

Fernández-Moreno M, Rego I, Carreira-Garcia V, Blanco FJ. Genetics in Osteoarthritis. *Curr Genomics*. 2008;9(8):542-7.

Filali S, Darragi-Raies N, Ben-Trad L, Piednoir A, Hong SS, Pirot F, et al. Morphological and Mechanical Characterization of Extracellular Vesicles and Parent Human Synoviocytes under Physiological and Inflammatory Conditions. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21):13201.

Fisiosesto. Artrosis de rodilla, causas, clasificación, tratamiento y ejercicios [Internet]. Fisiosesto. 2021 [citado 12 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://fisiosesto.com/artrosis-de-rodilla/>

Foers AD, Garnham AL, Chatfield S, Smyth GK, Cheng L, Hill AF, et al. Extracellular Vesicles in Synovial Fluid from Rheumatoid Arthritis Patients Contain miRNAs with Capacity to Modulate Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4910.

Foundation O. Tratamientos | OAFI Osteoarthritis Foundation International [Internet]. 2023 [citado 12 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.oafifoundation.com/tratamientos/>

Giménez Basallote S, Caballero Vega J, Martín Jiménez JA, Sánchez Fierro J, García García A. Guía práctica para el tratamiento en Atención Primaria en la artrosis en paciente con comorbilidad. [Internet]. Sociedad Española de Médicos Generales y de Familia (SEMG) y Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMERGEN). 2017. [Citado 1 junio 2023]. Disponible en: https://www.semg.es/images/stories/recursos/2017/documentos/guia_tto_artrosis.pdf

Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2012;4(4):269-85.

Group OS. Orthopaedic Specialty Group. 2016 [citado 17 de julio de 2023]. The 4 Stages of Osteoarthritis. Disponible en: <https://www.osgpc.com/the-4-stages-of-osteoarthritis/>

Guillén MI, Compañ A, Alcaraz MJ. Evaluation of Extracellular Vesicles from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Primary Human Chondrocytes from Patients with Osteoarthritis. *Methods Mol Biol*. 2021;2269:221-31.

Guillén MI, Tofiño-Vian M, Silvestre A, Castejón MA, Alcaraz MJ. Role of peroxiredoxin 6 in the chondroprotective effects of microvesicles from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Translat*. 2021;30:61-9.

Han D, Fang Y, Tan X, Jiang H, Gong X, Wang X, et al. The emerging role of fibroblast-like synoviocytes-mediated synovitis in osteoarthritis: An update. *J Cell Mol Med*. 2020;24(17):9518-32.

Haraden CA, Huebner JL, Hsueh MF, Li YJ, Kraus VB. Synovial fluid biomarkers associated with osteoarthritis severity reflect macrophage and neutrophil related inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2019;21(1):146.

Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of Osteoarthritis. *Clin Immunol*. 2013;146(3):185-96.

Headland SE, Jones HR, Norling LV, Kim A, Souza PR, Corsiero E, et al. Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Sci Transl Med*. 2015;7(315):315ra190.

Healthline [Internet]. 2018 [citado 17 de julio de 2023]. The 5 Stages of Osteoarthritis of the Knee (and How to Treat Them). Disponible en: <https://www.healthline.com/health/osteoarthritis-stages-of-oa-of-the-knee>

Heras A de las. Inforeuma. [citado 7 de agosto de 2023]. Artrosis de rodilla: qué es, síntomas, diagnóstico y tratamiento. Disponible en: <https://inforeuma.com/enfermedades-reumaticas/artrosis-de-rodilla/>

Hezel ME van, Nieuwland R, Bruggen R van, Juffermans NP. The Ability of Extracellular Vesicles to Induce a Pro-Inflammatory Host Response. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1285.

Hoff P, Buttgerit F, Burmester GR, Jakstadt M, Gaber T, Andreas K, et al. Osteoarthritis synovial fluid activates pro-inflammatory cytokines in primary human chondrocytes. *Int Orthop*. 2013;37(1):145-51.

Hwang HS, Kim H, Han G, Lee JW, Kim K, Kwon IC, et al. Extracellular Vesicles as Potential Therapeutics for Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5487.

Jankovičová J, Sečová P, Michalková K, Antalíková J. Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7568.

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):33-42.

Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, Nakamura Y, Nakasa T, Lotz MK, et al. Exosomes from IL-1 β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(4):R163.

Keller LE, Fortier LA, Tait Wojno ED. T Cells in Early Osteoarthritis. En: Lattermann C, Madry H, Nakamura N, Kon E, editores. *Early Osteoarthritis: State-of-the-Art*

Approaches to Diagnosis, Treatment and Controversies [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [citado 11 de enero de 2024]. p. 131-45. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-030-79485-9_11

Knights AJ, Farrell EC, Ellis OM, Lammlin L, Junginger LM, Rzeczycki PM, et al. Synovial fibroblasts assume distinct functional identities and secrete R-spondin 2 in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2023;82(2):272-82.

Kolhe R, Hunter M, Liu S, Jadeja RN, Pundkar C, Mondal AK, et al. Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Sci Rep*. 2017;7:2029.

Lamichhane TN, Sokic S, Schardt JS, Raiker RS, Lin JW, Jay SM. Emerging roles for extracellular vesicles in tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(1):45-54.

Li YS, Luo W, Zhu SA, Lei GH. T Cells in Osteoarthritis: Alterations and Beyond. *Front Immunol*. 2017;8:356.

Li Z, Huang Z, Bai L. Cell Interplay in Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:720477.

Liang H, Li D, Neufeld EV, Sayegh MJ, Kiridly A, Palacios P, et al. Extracellular vesicles from synovial fluid-derived mesenchymal stem cells confer chondroprotective effects on in vitro and in vivo osteoarthritic chondrocytes. *Journal of Cartilage & Joint Preservation*. 2023;3(4):100146.

Lo Sicco C, Reverberi D, Balbi C, Ulivi V, Principi E, Pascucci L, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(3):1018-28.

López-Armada MJ, Vaamonde-García C, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Blanco García FJ. Evidencia de mecanismos inflamatorios en la osteoartritis. *Reumatol Clin*. 2007;3:23-7.

Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:26913.

Maglaviceanu A, Wu B, Kapoor M. Fibroblast-like synoviocytes: Role in synovial fibrosis associated with osteoarthritis. *Wound Repair Regen*. 2021;29(4):642-9.

Manual Merck versión para profesionales [Internet]. 2022 [citado 5 de agosto de 2023]. Artrosis (A) - Trastornos de los tejidos musculoesquelético y conectivo. Disponible en: <https://www.merckmanuals.com/es-us/professional/trastornos-de-los-tejidos-musculoesquel%C3%A9tico-y-conectivo/enfermedades-articulares/artrosis-a?query=artrosis>

Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):18.

Mayo Clinic [Internet]. [citado 7 de julio de 2023]. Osteoarthritis-Osteoarthritis - Symptoms & causes. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/osteoarthritis/symptoms-causes/syc-20351925>

McCarty WJ, Nguyen QT, Hui AY, Chen AC, Sah RL. 5.515 - Cartilage Tissue Engineering. En: Ducheyne P, editor. *Comprehensive Biomaterials* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2011 [citado 12 de septiembre de 2023]. p. 199-212. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552941001719>

Midekessa G, Godakumara K, Ord J, Viil J, Lättekivi F, Dissanayake K, et al. Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. *ACS Omega*. 2020;5(27):16701-10.

Miller RJ, Malfait AM, Miller RE. The innate immune response as a mediator of osteoarthritis pain. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2020;28(5):562-71.

Miyaki S, Lotz MK. Extracellular vesicles in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(1):129-35.

Mohd Noor NA, Abdullah Nurul A, Ahmad Mohd Zain MR, Wan Nor Aduni WK, Azlan M. Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells as Potential Treatments for Osteoarthritis. *Cells*. 2021;10(6):1287.

Murphy DE, de Jong OG, Brouwer M, Wood MJ, Lavieu G, Schiffelers RM, et al. Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking. *Exp Mol Med*. 2019;51(3):1-12.

Mustonen AM, Lehmonen N, Paakkonen T, Raekallio M, Käkälä R, Niemelä T, et al. Equine osteoarthritis modifies fatty acid signatures in synovial fluid and its extracellular vesicles. *Arthritis Res Ther*. 2023;25:39.

Mustonen AM, Nieminen P. Extracellular Vesicles and Their Potential Significance in the Pathogenesis and Treatment of Osteoarthritis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(4):315.

Nanus DE, Badoume A, Wijesinghe SN, Halsey AM, Hurley P, Ahmed Z, et al. Synovial tissue from sites of joint pain in knee osteoarthritis patients exhibits a differential phenotype with distinct fibroblast subsets. *EBioMedicine*. 2021;72:103618.

Nguyen TH, Duong CM, Nguyen XH, Than UTT. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles for Osteoarthritis Treatment: Extracellular Matrix Protection, Chondrocyte and Osteocyte Physiology, Pain and Inflammation Management. *Cells*. 2021;10(11):2887.

Nurul AA, Azlan M, Ahmad Mohd Zain MR, Sebastian AA, Fan YZ, Fauzi MB. Mesenchymal Stem Cells: Current Concepts in the Management of Inflammation in Osteoarthritis. *Biomedicines*. 2021;9(7):785.

O'Brien TJ, Hollinshead F, Goodrich LR. Extracellular vesicles in the treatment and prevention of osteoarthritis: can horses help us translate this therapy to humans? *Extracell Vesicles Circ Nucleic Acids*. 2023;4(2):151-69.

Oliviero F, Scanu A, Galozzi P, Ramonda R. Synovial Fluid Analysis to Identify Osteoarthritis. *J Vis Exp*. 2022;(188).

Orlowsky EW, Kraus VB. The Role of Innate Immunity in Osteoarthritis: When Our First Line of Defense Goes on the Offensive. *J Rheumatol*. 2015;42(3):363-71.

Osteoarthritis | CDC [Internet]. 2023 [citado 5 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/arthritis/types/osteoarthritis.htm>

Osteoarthritis: Symptoms, Diagnosis, and Treatment | Arthritis Foundation [Internet]. [citado 7 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.arthritis.org/diseases/osteoarthritis>

Papareddy P, Tapken I, Kroh K, Varma Bhongir RK, Rahman M, Baumgarten M, et al. The role of extracellular vesicle fusion with target cells in triggering systemic inflammation. *Nat Commun*. 2024;15(1):1150.

Peshkova M, Lychagin A, Lipina M, Di Matteo B, Anzillotti G, Ronzoni F, et al. Gender-Related Aspects in Osteoarthritis Development and Progression: A Review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(5):2767.

Petty RE. Chapter 2 - Structure and Function. En: Petty RE, Laxer RM, Lindsley CB, Wedderburn LR, editores. *Textbook of Pediatric Rheumatology (Seventh Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2016 [citado 12 de septiembre de 2023]. p. 5-13.e2. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323241458000028>

Platas J, Guillén MI, del Caz MDP, Gomar F, Mirabet V, Alcaraz MJ. Conditioned Media from Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Degradative Mediators Induced by Interleukin-1 β in Osteoarthritic Chondrocytes. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:357014.

Rädler J, Gupta D, Zickler A, Andaloussi SE. Exploiting the biogenesis of extracellular vesicles for bioengineering and therapeutic cargo loading. *Mol Ther*. 2023;31(5):1231-50.

Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol Ther*. 2015;23(5):812-23.

Rios JL, Sapède D, Djouad F, Rapp AE, Lang A, Larkin J, et al. Animal Models of Osteoarthritis Part 1–Preclinical Small Animal Models: Challenges and Opportunities for Drug Development. *Current Protocols*. 2022;2(11):e596.

Robinson WH, Lepus CM, Wang Q, Raghu H, Mao R, Lindstrom TM, et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(10):580-92.

Rüwald JM, Randau TM, Hilgers C, Masson W, Irsen S, Eymael RL, et al. Extracellular Vesicle Isolation and Characterization from Periprosthetic Joint Synovial Fluid in Revision Total Joint Arthroplasty. *J Clin Med*. 2020;9(2):516.

Rydland A, Heinicke F, Flåm ST, Mjaavatten MD, Lie BA. Small extracellular vesicles have distinct CD81 and CD9 tetraspanin expression profiles in plasma from rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Med*. 2023;23(6):2867-75.

Saadeldin IM, Ehab S, Cho J. Relevance of multilamellar and multicompartmental vesicles in biological fluids: understanding the significance of proportional variations and disease correlation. *Biomark Res*. 2023;11:77.

Saejung T, Apinun J, Ngarmukos S, Yuktanandana P, Tanavalee A, Reantragoon R. T Cells and Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2017;25:S272.

Sahap Atik O. Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1990;39(4):253-4.

Sakkas LI, Platsoucas CD. The role of T cells in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(2):409-24.

Sánchez Martín MM. ARTROSIS. ETIOPATOGENIA Y TRATAMIENTO. En ANALES DE LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA DE VALLADOLID; 2013. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4820759.pdf>

Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, Lane NE, Guma M. Synovial inflammation in osteoarthritis progression. *Nat Rev Rheumatol*. 2022;18(5):258-75.

Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in Arthritis: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2001;3(2):107.

Seidman AJ, Limaïem F. Synovial Fluid Analysis. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 12 de septiembre de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537114/>

Semenistaja S, Skuja S, Kadisa A, Groma V. Healthy and Osteoarthritis-Affected Joints Facing the Cellular Crosstalk. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):4120.

Sen R, Hurley JA. Osteoarthritis. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 17 de julio de 2023]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482326/>

Shane Anderson A, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24(1):15-26.

Singhal O, Kaur V, Kalhan S, Singhal MK, Gupta A, Machave Y. Arthroscopic synovial biopsy in definitive diagnosis of joint diseases: An evaluation of efficacy and precision. *Int J Appl Basic Med Res.* 2012;2(2):102-6.

Spector TD, MacGregor AJ. Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12 Suppl A:S39-44.

Tamer TM. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol.* 2013;6(3):111-25.

Tamrin SH, Phelps J, Nezhad AS, Sen A. Critical considerations in determining the surface charge of small extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2023;12(9):e12353.

Teng F, Fussenegger M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Adv Sci (Weinh).* 2020;8(1):2003505.

Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750.

Thomson A, Hilkens CMU. Synovial Macrophages in Osteoarthritis: The Key to Understanding Pathogenesis? *Front Immunol*. 2021;12:678757.

Tofiño-Vian M, Guillén MI, Pérez del Caz MD, Castejón MA, Alcaraz MJ. Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Senescence Features in Osteoarthritic Osteoblasts. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:7197598.

Tofiño-Vian M, Guillén MI, Pérez Del Caz MD, Silvestre A, Alcaraz MJ. Microvesicles from Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a New Protective Strategy in Osteoarthritic Chondrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(1):11-25.

Tschon M, Contartese D, Pagani S, Borsari V, Fini M. Gender and Sex Are Key Determinants in Osteoarthritis Not Only Confounding Variables. A Systematic Review of Clinical Data. *J Clin Med*. 2021;10(14):3178.

Vincent TL. OA synovial fluid: biological insights into a whole-joint disease. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022;30(6):765-6.

Vitaloni, M., Botto-van Bemden, A., Sciortino, R. et al. A patients' view of OA: the Global Osteoarthritis Patient Perception Survey (GOAPPS), a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020; 20, 727.

Wang Y, Yu D, Liu Z, Zhou F, Dai J, Wu B, et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):189.

Warner SC, Valdes AM. The Genetics of Osteoarthritis: A Review. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*. 2016;1(1):140-53.

Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. 2024;13(2):e12404.

Wu CL, Harasymowicz NS, Klimak MA, Collins KH, Guilak F. The role of macrophages in osteoarthritis and cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(5):544-54.

Xie X, Doody GM, Shuweihi F, Conaghan PG, Ponchel F. B-cell capacity for expansion and differentiation into plasma cells are altered in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2023;31(9):1176-88.

Yamaguchi A, Maeshige N, Yan J, Ma X, Uemura M, Matsuda M, et al. Skeletal myotube-derived extracellular vesicles enhance itaconate production and attenuate inflammatory responses of macrophages. *Front Immunol*. 2023;14:1099799.

Yang B, Li X, Fu C, Cai W, Meng B, Qu Y, et al. Extracellular vesicles in osteoarthritis of peripheral joint and temporomandibular joint. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1158744.

Yang Y, Boza-Serrano A, Dunning CJR, Clausen BH, Lambertsen KL, Deierborg T. Inflammation leads to distinct populations of extracellular vesicles from microglia. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):168.

Zhang L, Xing R, Huang Z, Ding L, Zhang L, Li M, et al. Synovial Fibrosis Involvement in Osteoarthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:684389.

Zhang S, Chuah SJ, Lai RC, Hui JHP, Lim SK, Toh WS. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials*. 2018;156:16-27.

Zhang X, Liu D, Gao Y, Lin C, An Q, Feng Y, et al. The Biology and Function of Extracellular Vesicles in Cancer Development. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:777441.

Zhang X, Ma S, Naz SI, Jain V, Soderblom EJ, Aliferis C, et al. Comprehensive characterization of pathogenic synovial fluid extracellular vesicles from knee osteoarthritis. *Clin Immunol*. 2023;257:109812.

Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. 2010;26(3):355-69.

Zhu Y, Wang Y, Zhao B, Niu X, Hu B, Li Q, et al. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-

derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):64.

Zhuang Y, Jiang S, Yuan C, Lin K. The potential therapeutic role of extracellular vesicles in osteoarthritis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:1022368.

8. Anexos

8.1. Caracterización de EV mediante análisis proteico (Théry et al., 2018).

Category	1- Transmembrane or GPI-anchored proteins associated to plasma membrane and/or endosomes	2- Cytosolic proteins recovered in EV	3- Major components of non-EV co-isolated structures	4- Transmembrane, lipid-bound, and soluble proteins associated to other intracellular compartments than PM/endosomes	5- Secreted proteins recovered with EV
Use for	All EV	All EV	All EV as purity control	Subtypes of EV (e.g. large oncosomes, large EV) and/or pathologic/atypical state	Functional component of EV: need to determine the mode of association with EV
	1a: non-tissue specific. Tetraspanins (CD63, CD81 , CD82); other multi-pass membrane proteins (CD47; heterotrimeric G proteins GNA*) MHC class I (HLA-A/B/C, H2-K/D/Q), Integrins (ITGA*/ITGB*), transferrin receptor (TFR2); LAMP1/2; heparan sulfate proteoglycans including syndecans (SDC*); EMMPRIN (BSG); ADAM10; GPI-anchored 5'nucleotidase CD73 (NT5E), complement-binding proteins CD55 and CD59; sonic hedgehog (SHH)	2a: with lipid or membrane protein-binding ability. ESCRT-I/II/III (TSG101 , CHMP*) and accessory proteins: PDCD6IP , VPS4A/B; ARRD1; Flotillins-1 and 2 (FLOT1/2); caveolins (CAV*); EHD*; RHOA; annexins (ANXA*); Heat shock proteins HSC70 (HSPA8), and HSP84 (HSP90AB1) note that both are abundant also in exomeres; ARF6; syntenin (SDCBP); microtubule-associated Tau (MAPT, neurons)	3a: lipoproteins (produced by liver, abundant in plasma, serum). ApolipoproteinsA1/2 and B APOA1/2, APOB; APOB100; albumin (ALB)	4a: nucleus. Histones (HIST1H**); Lamin A/C (LMNA)	5a: Cytokines and growth factors. e.g. TGFβ1/2; IFNG, VEGFA, FGF1/2, PDGF*, EGF, interleukins (IL*) ...
	1b: cell/tissue specific. Some TSPANs: TSPAN8 (epithelial cell), CD37 and CD53 (leukocytes), CD9 (absent from NK, B and some MSC); PECAM1 (endothelial cells); ERBB2 (breast cancer); EPCAM (epithelial); CD90 (THY1; MSCs); CD45 (PTPRC; immune cells), CD41 (ITGA2B) or CD42a (GP9; platelets); Glycophorin A (GYPA; RBC); CD14 (monocytes), MHC class II (HLA-DR/DP/DQ, H2-A*); CD3* (T cells); Acetylcholinesterase/AChE-S (neurons), AChE-E (erythrocytes); amyloid beta A4/APP (neurons); multidrug resistance-associated protein (ABCC1)	2b: promiscuous incorporation in EV (and possibly exomeres). Heat shock protein HSP70 (<i>HSPA1A</i>), cytoskeleton: actin (<i>ACT*</i>), tubulin (<i>TUB*</i>); enzymes (<i>GAPDH</i>)	3b: protein and protein/nucleic acid aggregates. Tamm-Horsfall protein (Uromodulin/ <i>UMOD</i> ; urine); ribosomal proteins	4b: mitochondria IMMT, cytochrome C (<i>CYC1</i>); TOMM20 4c: secretory pathway (endoplasmic reticulum, Golgi apparatus) calnexin (<i>CNX</i>); Grp94 (<i>HSP90B1</i>); BIP (<i>HSPA5</i>), <i>GM130 (GOLGA2)</i> 4d: others (autophagosomes, cytoskeleton...). ATG9A, Actinin1/4 (<i>ACTN1/4</i>), cytokeratin 18 (<i>KRT18</i>)	5b: adhesion and extracellular matrix proteins. Fibronectin (<i>FN1</i>), Collagen (<i>COL**</i>), <i>MFGE8</i> ; galectin3-binding protein (<i>LGALS3BP</i>), <i>CD5L</i> ; fetuin-A (<i>AHSG</i>)

Se requiere examinar al menos una proteína de las categorías 1a o 1b, 2a (opcionalmente 2b), 3a o 3b para demostrar la naturaleza y pureza de una preparación de EV. El análisis de proteínas de la categoría 4 es esencial al afirmar un análisis específico de EV pequeños, y de la categoría 5 para documentar actividades funcionales.

8.2. Comité Ético de Investigación en Humanos

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA Vicerectorat
d'Investigació i Política Científica

D. José María Montiel Company, Profesor Contratado Doctor Interino del departamento de Estomatología, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 4 de diciembre de 2017, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:
"Mecanismos reguladores de la inflamación y su resolución en enfermedades crónicas articulares y de la piel", número de procedimiento H1512058528966, cuya responsable es Dña. M^a Carmen Montesinos Mezquita, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a catorce de diciembre de dos mil diecisiete.



8.3. Comité Ético de Investigación con Medicamentos



CEIm: 37/2021

Dr. Fernando Sánchez-Toril López, Presidente del Comité Ético de Investigación con medicamentos del Departamento de Salud Arnau de Vilanova – Llíria.

INFORMA

Reunidos los miembros del **Comité Ético de Investigación con medicamentos** del Departamento Arnau de Vilanova-Llíria, en su sesión ordinaria del día **27 Octubre de 2021 (acta 12/2021)**, y una vez estudiada la documentación presentada por la Dr. **ENRIQUE SALMERÓN GONZÁLEZ**, en calidad de Investigador Principal del Servicio de Cirugía plástica del Hospital IMED Valencia en colaboración con Institut Interuniversitari d'Investigació de Reconeixement Molecular y Desenvolupament Tecnològic (IDM) de la Universitat Politècnica de València; tiene a bien informar que el proyecto de investigación titulado: **"MECANISMOS REGULADORES DE LA INFLAMACIÓN Y SU RESOLUCIÓN EN ENFERMEDADES CRÓNICAS ARTICULARES Y DE LA PIEL"**; con **Protocolo: v.2. de 6 de Octubre de 2021, HIP Y CI: v1 de 19 de mayo de 2021.**; se ajusta a las normas deontológicas establecidas para tales casos.

Se emite **DICTAMEN FAVORABLE** a la realización de dicha colaboración en el proyecto por la Dr. **ENRIQUE SALMERÓN GONZÁLEZ** en el Servicio de Cirugía plástica del Hospital IMED Valencia, con el Institut Interuniversitari d'Investigació de Reconeixement Molecular y Desenvolupament Tecnològic (IDM) de la Universitat Politècnica de València.

Y para que conste, lo firma en Valencia con fecha 27 de Octubre del 2021.

Fdo. Dr. Fernando Sánchez-Toril López
Presidente del CEIm del Departamento Arnau de Vilanova-Llíria.

DEPARTAMENT DE SALUT DE VALÈNCIA – ARNAU DE VILANOVA – LLÍRIA
Sant Climent, 12 · 46015 València · Telèfon 961-976000

8.4. Comité Ético de Investigación con Medicamentos

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL CLÍNICO
UNIVERSITARIO DE VALENCIA

Dra. M^a Luisa Calabuig Muñoz, Presidenta del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión ordinaria, de fecha 29 de junio de 2023 (Acta nº 401), se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación:

Nº DE ORDEN: 2023/101

TÍTULO: Estrategias de diagnóstico y tratamiento en enfermedades inflamatorias crónicas articulares y de la piel.

PROTOCOL: VERSION 3, 12-06-2023

HIP/CI: VERSIÓN 2, 12.06.2023

PETICIÓN DE AYUDA A LA INVESTIGACIÓN: Convocatoria/ayuda: Proyectos de Generación de Conocimiento 2021 (MICINN)

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho proyecto en este centro.

Este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por la Dra. María Carmen Montesinos Mezquita en el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, como investigadora principal, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación biomédica.

El CEIm del Hospital Clínico Universitario de Valencia, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con:

- las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95),
- la norma UNE-EN ISO 9001:2015, y
- con los aspectos relativos al funcionamiento del comité ético de la normativa aplicable.

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 30 de junio de 2023

**MARIA LUISA
CALABUIG
MUÑOZ -**
NIF:44850341
L

Fdo.: Dra. M^ª Luisa Calabuig Muñoz