



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE LOS CRISTALES DE URATO MONOSÓDICO EN
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE MEMBRANA SINOVIAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RICARDO PLATA RODRÍGUEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Ignacio Camacho Arroyo
VOCAL: Rocío Gabriela Tirado Mendoza
SECRETARIO: Yessica Eduviges Zamudio Cuevas
1er. SUPLENTE: Javier Axosco Marín
2° SUPLENTE: Manuel Gutiérrez Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Líquido Sinovial y en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa, del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” INRLGII.



ASESOR DEL TEMA:

D en C. Yessica Eduviges Zamudio Cuevas



SUPERVISOR TÉCNICO:

D en C. Carlos Landa Solís



SUSTENTANTE:

Ricardo Plata Rodríguez

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	3
LISTADO DE ABREVIATURAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	13
1. RESUMEN	14
2. INTRODUCCIÓN	15
2.1. Generalidades sobre la gota	15
2.2. Membrana sinovial como fuente de CTM.....	26
2.3. Características morfológicas e inmunocitoquímicas de CTM-MS	30
2.4. Características del potencial de diferenciación de CTM-MS.....	33
2.4.1. Diferenciación osteogénica.....	33
2.4.2. Diferenciación condrogénica.....	34
2.4.3. Diferenciación adipogénica	35
3. ANTECEDENTES	36
4. JUSTIFICACIÓN	38
5. HIPÓTESIS	39
6. OBJETIVOS	39
6.1. Objetivo general.....	39
6.2. Objetivos particulares.....	39
7. MATERIALES Y MÉTODOS	40
7.1. Tipo de estudio.....	40
7.2. Descripción del universo de trabajo	40
7.3. Definición del grupo control.....	40
7.4. Criterios de inclusión.....	41

7.5. Criterios de eliminación.....	41
7.6. Criterios de exclusión.....	41
7.7. Tamaño de la muestra	42
7.8. Descripción de las variables de estudio, unidades de medida y escalas de medición.....	42
7.9. Descripción de los procedimientos.....	42
7.9.1. Obtención de muestras.....	42
7.9.2. Aislamiento de células de la MS y cultivo primario	43
7.9.3. Separación inmunomagnética de células CD90 ⁺	44
7.9.4. Inmunofenotipificación de las CTM-MS	46
7.9.5. Evaluación de UFC	46
7.9.6. Estimulación celular	47
7.9.7. Análisis de viabilidad celular	47
7.9.8. Determinación de nódulos de calcio (Ca ²⁺)	48
7.9.9. Determinación de citocinas pro-inflamatorias	49
7.9.10. Extracción y cuantificación de proteínas totales	50
7.9.11. Determinación de la expresión proteica RUNX2 en CTM-MS	50
7.10. Análisis estadísticos.....	51
8. RESULTADOS.....	54
8.1. Aislamiento de las CTM-MS.....	54
8.2. Caracterización inmunofenotípica de las células aisladas de MS	55
8.3. Separación inmunomagnética de células CD90 ⁺	57
8.4. Inmunofenotipificación de la subpoblación de células CD90 ⁺	59
8.5. Evaluación de las UFC por las CTM-MS.....	60
8.6. Efecto del AU y de los CUM en la viabilidad de las CTM-MS	62

8.7. Efecto del AU y de los CUM en la formación de nódulos de calcio (Ca ²⁺) en CTM-MS.....	65
8.8. Efecto del AU y de los CUM en la inflamación en CTM-MS.....	68
8.9. Determinación de la expresión proteica RUNX2 en CTM-MS.....	69
9. DISCUSIÓN	71
10. CONCLUSIÓN	75
11. REFERENCIAS.....	76
ANEXO 1. DICTAMEN DE ACEPTACIÓN DEL PROTOCOLO	89
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	91

LISTADO DE ABREVIATURAS

AU	Ácido úrico
CUM	Cristales de urato monosódico
MS	Membrana sinovial
CTM	Células troncales mesenquimales
CTM-MS	Células troncales mesenquimales de la membrana sinovial
UFC	Unidades formadoras de colonias
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
XOR	Xantina óxidoreductasa
XO	Xantino oxidasa
XDH	Xantino deshidrogenasa
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
O₂⁻	Anión superóxido
AMP	Adenosín monofosfato
IMP	Inosín monofosfato
XM	Xantin monofosfato
GMP	Guanín monofosfato
ATP	Adenosín trifosfato

ADP	Adenosín difosfato
GLUT9	Glucotransportador 9
URAT1	Transportador de urato 1
NPT1	Transportador de fosfato inorgánico 1
ABCG2	Miembro 2 de la superfamilia G del casete de unión al ATP
LS	Líquido sinovial
STM	Sinoviocitos tipo macrófago
STF	Sinoviocitos tipo fibroblastos
TLR2 / TLR4	Receptores tipo Toll 2 y 4
NLRP3 / NALP3	Inflamasoma
pre-IL1β	Precursor de interleucina-1 β
IL-1β	Interleucina -1 β
IL-6	Interleucina-6
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
IFN-γ	Interferón gamma
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
CD105	Endoglina
CD73	5'-nucleotidasa
CD90	Antígeno de superficie celular Thy-1

CD34	Antígeno de células progenitoras hematopoyéticas
CD14	Antígeno de diferenciación de monocitos
CD11b	Subunidad alfa integrina M
CD19	Antígeno de linfocitos B
HLA-DR	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II
CFU-F	Colonias de fibroblastos
DMEM	Medio de águila modificado de Dulbecco
SFB	Suero fetal bovino
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
Ocn	Osteocalcina
MEC	Matriz extracelular
ALP	Fosfatasa alcalina
RUNX2/Cbfa1	Factor de transcripción asociado con la diferenciación de los osteoblastos
DEX	Dexametasona
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
Sox9	Gen que codifica para una proteína: el factor de transcripción SOX9, actúa durante la diferenciación de condrocitos.

COMP	Proteína de matriz oligomérica del cartílago
PPARγG	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma
LPL	Lipoprotein lipasa
MMP	Metaloproteinas
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Ligando del receptor activador para factor nuclear kappa-B
SP7 (Osterix)	Factor de transcripción que regula la expression de proteínas de matriz extracelular en la formación de hueso
Ibsp	Sialoproteína ósea
Bglap	Osteocalcina
hBMSCs	Células troncales mesenquimales aisladas de medula ósea
11β- HSD1	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
Cbfa1	Subunidad alfa-1 del factor de unión al núcleo
INR-LGII	Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”
CAR	Colegio Americano de la Reumatología
PBS	Solución salina tamponada con fosfato

PE	Penicilina Estreptomicina
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
PE	Ficoeritrina
PerCP-Cy	Peridinin clorofila
APC	Aloficocianina
CO₂	Dióxido de carbono
UFC	Unidades formadoras de colonias
TA	Temperatura ambiente
PFA	Paraformaldehído
M-PER	Amortiguador de extracción de proteínas
Cu	Cobre
CuSO₄	Sulfato de cobre
CD	Cluster de diferenciación
%	Porcentaje
DE	Desviación estándar
Ca²⁺	Calcio

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del AU	15
Figura 2. Estructura básica de las purinas	16
Figura 3. Biosíntesis del AU.	17
Figura 4. Síntesis del AU.....	18
Figura 5. Degradación de purinas	19
Figura 6. Transportadores de urato en los riñones e intestino en humanos.....	20
Figura 7. Catabolismo de las purinas y formación de AU.....	21
Figura 8. Modificaciones estructurales del AU en función del pH del medio	22
Figura 9. Estructura del urato monosódico.....	22
Figura 10. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial de diferenciación	27
Figura 11. Fuentes de CTM-MS y su diferenciación.....	28
Figura 12. Localización de CTM-MS en la articulación.....	29
Figura 13. Recolección de MS y aislamiento celular	43
Figura 14. Principio de separación MACS.....	45
Figura 15. Aislamiento y osteodiferenciación de CTM-MS (Metodología general del estudio).....	52
Figura 16. Morfología de las células derivadas de MS	54
Figura 17. Histogramas de la expresión de marcadores de superficie de CTM-MS por citometría de flujo.....	56
Figura 18. Inmunofenotipificación de células derivadas de MS.....	57

Figura 19. Separación inmunomagnética de células CD90 ⁺ provenientes de MS.	58
Figura 20. Morfología de las células CD90 ⁺ .	59
Figura 21. Histogramas de marcadores de células separadas inmunomagnéticamente	59
Figura 22. Caracterización de la subpoblación de células CD90 ⁺	60
Figura 23. UFC de CTM-MS	61
Figura 24. Cuantificación de UFC de CTM-MS	61
Figura 25. Morfología de CTM-MS a diferentes concentraciones de AU y CUM.	63
Figura 26. Viabilidad celular de CTM-MS a diferentes concentraciones de AU, CUM y medio osteogénico	64
Figura 27. Efecto del AU y de los CUM en la formación de nódulos de calcio CTM-MS	66
Figura 28. Formación de nódulos de calcio en CTM-MS a diferentes concentraciones de AU, CUM y medio osteogénico	68
Figura 29. Efecto del AU y los CUM en la producción de IL-6 por las CTM-MS	69
Figura 30. Efecto del AU y los CUM en la expresión proteica de RUNX2	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Multipotencia y marcadores de superficie celular CTM-MS	32
Tabla 2. Variables de estudio, unidades de medida y escalas de medición	42
Tabla 3. Marcadores celulares en células derivadas de la MS	55
Tabla 4. Cuantificación de células CD90 ⁺ aisladas por columna inmunomagnética	58
Tabla 5. Cuantificación de células CD90 ⁺ y CD105 ⁺	60
Tabla 6. UFC de CTM-MS por cada MS de distintos donadores	62
Tabla 7. Viabilidad celular de CTM-MS estimuladas con AU, CUM y medio osteogénico	64
Tabla 8. Mineralización de nódulos de calcio en CTM-MS estimuladas con AU, CUM y con medio osteogénico.....	67

1. RESUMEN

La erosión del hueso es una complicación frecuente en la gota crónica y está fuertemente asociada con tofos, los cuales son lesiones comprendidas por un acúmulo de cristales de urato monosódico (CUM) y diversas células del tejido articular. Uno de los tejidos afectados por los CUM, es la membrana sinovial (MS) que es un tejido mesenquimal constituido por sinoviocitos tipo fibroblastos y tipo macrófagos, así como células troncales mesenquimales (CTM); sin embargo, se desconoce el papel del ácido úrico (AU) y de los CUM como inductores del proceso de osteogénesis en las CTM de la MS. **Objetivo.** Evaluar la osteodiferenciación de CTM ante la exposición a AU y a CUM a largo plazo. **Metodología.** Se realizaron cultivos primarios de MS obtenidos de pacientes sometidos a artroscopía por lesión de ligamento cruzado anterior. Para la inmunocaracterización de las CTM se estableció el porcentaje de fluorescencia de los marcadores CD44, CD69, CD90, CD166, así como CD34 y CD45 a través de citometría de flujo. Se aislaron las células CD90+ a través de columnas de separación con perlas magnéticas y se expusieron a distintas dosis de AU (3, 6.8 y 9 mg/dL) y CUM (1, 5 y 10 µg/mL) durante 3 semanas, se evaluaron cambios morfológicos a través de microscopía, se calculó la viabilidad celular, se determinaron marcadores de inflamación como IL-1 β e IL-6, se evaluó la mineralización inducida y la expresión proteica de Runx2, un factor implicado en la diferenciación a osteoblastos. **Resultados:** Se obtuvo un modelo de exposición de CTM-MS a largo plazo con AU y con CUM, los cuales no mostraron daños morfológicos por los estímulos utilizados en ninguna de las dosis estudiadas, ni se detectaron indicadores de inflamación. Se observó una mayor mineralización en la dosis de 6.8 mg/dL de AU y de 5 µg/mL de CUM; sin embargo, no fueron significativas con respecto células sin estímulos (control), en cuanto al papel de los CUM en la expresión de Runx2, la dosis más alta (10 µg/mL) fue la que indujo 1.4 veces mayor expresión de Runx2 con respecto al control. **Conclusiones:** Los CUM en altas dosis y en tiempos prolongados de exposición a las CTM-MS podrían modular su diferenciación osteogénica a través de Runx2; no obstante, son necesarios más estudios que corroboren estos hallazgos en los cuales se consideren otros marcadores de osteodiferenciación.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades sobre la gota

La gota es una enfermedad crónico degenerativa producida por el depósito de CUM y está asociada con la inflamación de zonas articulares, peri-articulares y subcutáneas ¹.

Los depósitos de CUM están condicionados por la existencia de una hiperuricemia sostenida, que se define como un nivel de AU mayor que 6.8 o 7.0 mg/dL ^{2,3} de acuerdo con el Colegio Americano de Reumatología (CAR). La hiperuricemia se debe a un desequilibrio entre la producción y la eliminación del AU debido a un disbolismo de las purinas o bien, por la hipoexcreción renal del AU; la cual induce un incremento en los niveles de urato sérico ⁴.

El AU es un compuesto orgánico que está conformado por carbono, nitrógeno, oxígeno e hidrógeno, su fórmula química es $C_5H_4N_4O_3$, es un ácido diprótico por su capacidad de donar dos protones, tiene una constante de disociación pKa1 de 5.75 y un pKa2 de 10.3, por lo que en un pH alcalino, se forma el ion urato; sin embargo, a pH fisiológico entre 7.2 y 7.4 el 99% de las moléculas de AU disocian un protón, por lo que la mayor parte del AU está presente en el líquido extracelular como urato monovalente también conocido como hidrógeno de urato o urato ácido ⁵, el cual circula como un ácido débil desprotonado (Figura 1).

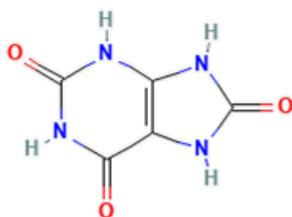


Figura 1. Estructura del AU. En la estructura del AU la ribosa se mantiene en el nucleótido sintetizado. En el caso de los aminoácidos, se tienen estructuras procedentes de glicina, glutamina, aspartato, N-10-formil-THF, N-5,N-10-Metenil-THF y CO_2 . Además, el AU tiene cuatro grupos amino en posición 1, 3, 7 y 9 de sus anillos, tres grupos ceto en la posición 2, 6 y 8 ^{6,7}.

El AU es el producto final de la vía del catabolismo de las purinas y se forma a partir de la acción de la xantina. Las purinas son compuestos orgánicos heterocíclicos, que tienen una estructura de dos anillos fusionados, uno de seis átomos y el otro de cinco (Figura 2). Las bases nitrogenadas adenina y guanina son consideradas bases púricas y forman parte de la molécula del ADN.

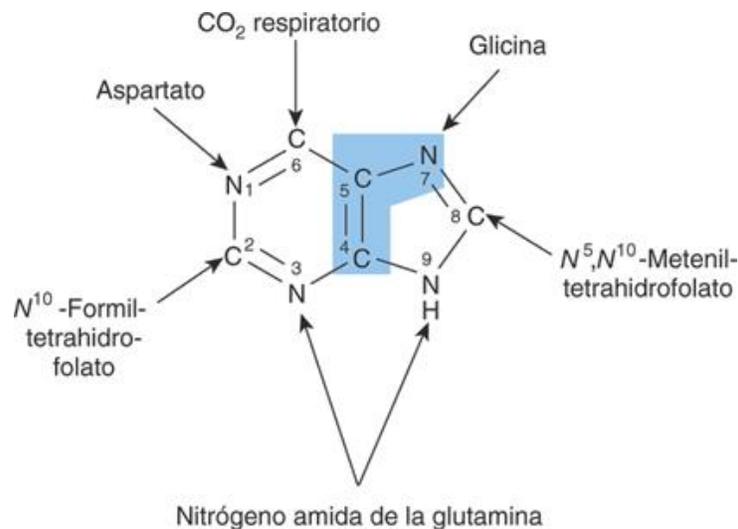


Figura 2. Estructura básica de las purinas. Está compuesta por una molécula heterocíclica de carbono y nitrógeno, formada por un anillo de pirimidina y un anillo de imidazol. Son moléculas procedentes de los aminoácidos, la glicina juega un papel importante en la síntesis de las purinas, la glutamina es la fuente más importante de grupos amino. El carbono de las emisiones de CO₂ se convierte en C6 del anillo de purina. El aspartato se utiliza como fuente de grupos amino en la ruta de las purinas. El último átomo de carbono es suministrado por el N-10-formil-THF y el N-5,N-10-Metenil-THF ⁶.

A nivel celular se ha demostrado que el 99% del AU formado, se deriva de sustratos de la enzima purina-nucleósido fosforilasa que da origen a la guanina e hipoxantina y que posteriormente son convertidas a xantina y luego a AU ⁸ (Figura 3).

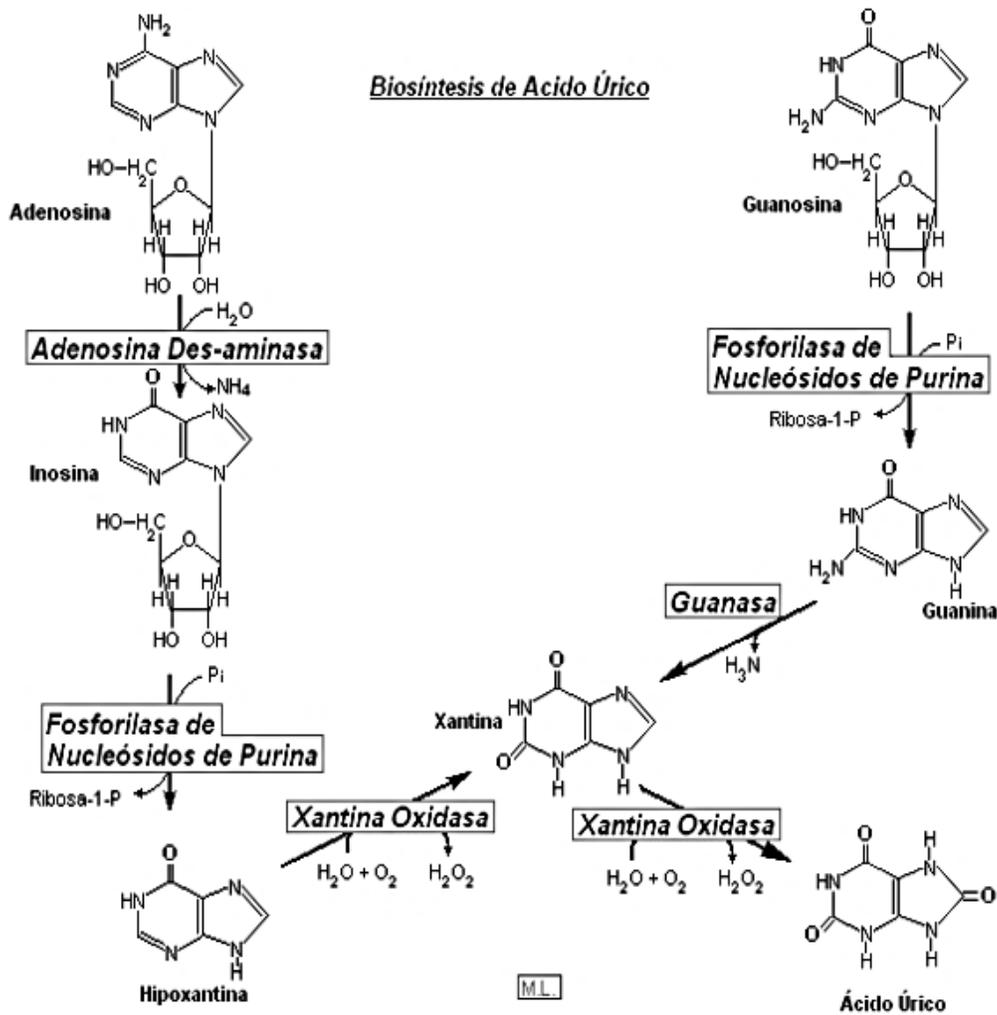


Figura 3. Biosíntesis del AU. El AU es formado a través de la fosforilasa de nucleósidos de purina que da origen a la guanina e hipoxantina y que posteriormente son convertidas a xantina y AU ⁸.

La xantina óxidorreductasa (XOR) de mamíferos puede existir de dos formas que son convertibles entre sí, la xantino oxidasa (XO) y la xantino deshidrogenasa (XDH) ^{8,9}. La XO reduce oxígeno molecular, mientras que la XDH reduce tanto oxígeno como nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) teniendo una gran afinidad por el segundo sustrato. Además, la XDH puede ser convertida a XO en forma irreversible por una variedad de enzimas tales como tripsina, quimiotripsina y pancreatina (Figura 4).

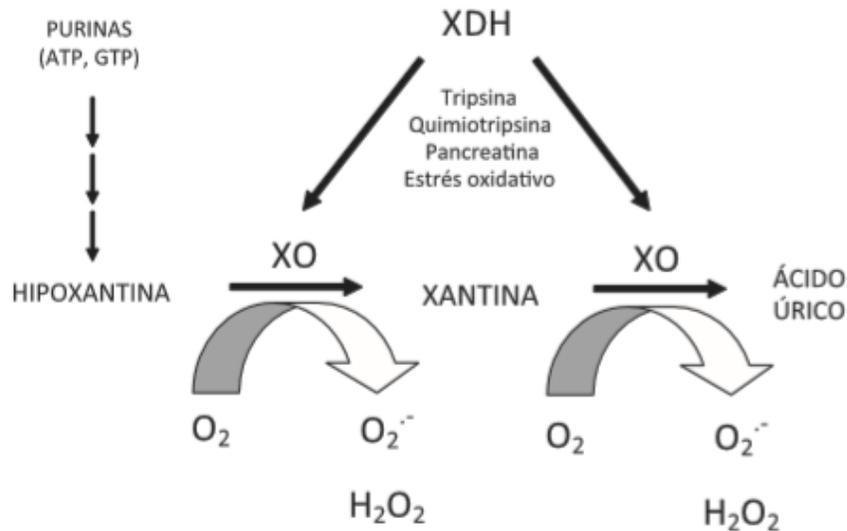


Figura 4. Síntesis del AU. La acción enzimática de la XO es la conversión catalítica consecutiva de hipoxantina a xantina y luego desde xantina a AU. Como subproductos de estas reacciones, se forman especies reactivas de oxígeno (ERO); las cuales son moléculas que poseen alta reactividad con otros sustratos tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)^{8,9}.

Diversos factores, están asociados con la hiperuricemia y el desarrollo de gota, como la ingesta de purinas exógenas, la producción de purinas endógenas, la excreción renal de urato, así como su excreción extrarrenal¹⁰.

Las purinas provienen de manera exógena a través de la dieta, mientras que el aporte endógeno es por la degradación de los ácidos nucleicos y la reutilización de bases púricas (adenina, hipoxantina, xantina y guanina), así como la síntesis de *novo*, que es la vía de aporte más importante, en la que los nucleótidos monofosfatos: adenosín monofosfato (AMP), inosin monofosfato (IMP), xantin monofosfato (XM) y guanin monofosfato (GMP) son degradados a AU¹¹.

La ingesta de alimentos ricos en purinas, como cerveza, carnes y mariscos; además de la ingesta de alcohol o fructosa aumenta la degradación de nucleótidos de purina debido a la fosforilación de la fructosa y la descomposición de adenosín trifosfato (ATP) en adenosín difosfato (ADP) y AMP.

El AMP puede ingresar a la vía de degradación de nucleótidos de purina, lo que lleva a un aumento de las concentraciones séricas de urato (Figura 5) ^{12,13}.

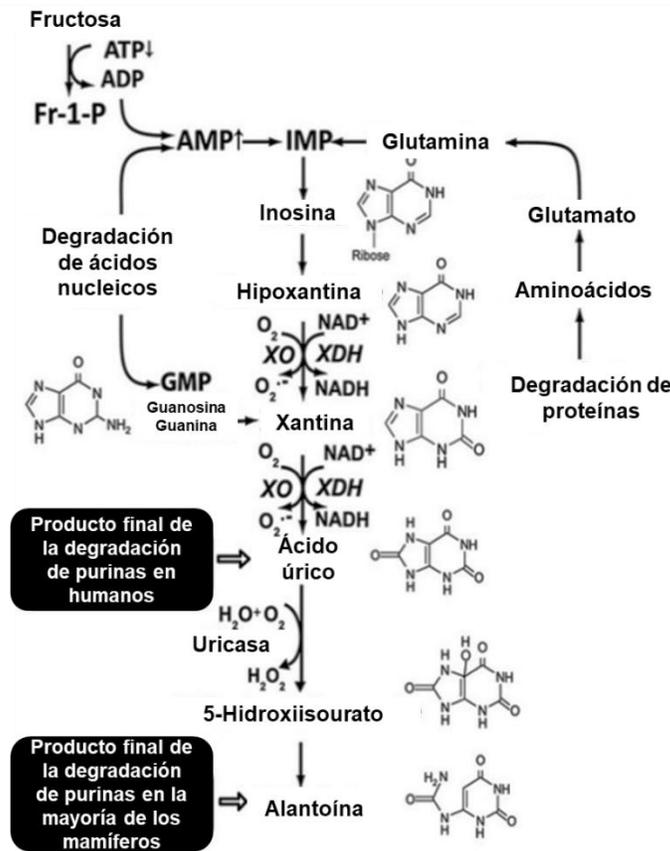


Figura 5. Degradación de purinas. A partir de la fosforilación de la fructosa y la descomposición del ATP en ADP. El AMP puede ingresar a la vía de degradación de nucleótidos de purina, lo que lleva a un aumento de las concentraciones séricas de urato. (IMP: inosín monofosfato; NO*: óxido nítrico; NAD⁺: nicotín adenín dinucleótido oxidado; NADH: nicotín adenín dinucleótido reducido) ¹⁴.

El urato se produce principalmente en el hígado y en menor medida en el intestino delgado. Su producción depende del equilibrio entre ingestión de purinas, síntesis de *novo* en células, reciclaje y la función de degradación de la XO en la vía de las purinas ¹². Los factores genéticos, como los ambientales contribuyen a elevar las concentraciones séricas de urato, los genéticos tienen un mayor efecto que los factores dietéticos. Se sabe que el transporte alterado del urato, tanto en el intestino como en los riñones, tiene un papel en la patogenia de la hiperuricemia y la gota.

Los estudios de asociación de genoma completo han identificado polimorfismos de un solo nucleótido en numerosos *loci* que están asociados con la variación en las concentraciones séricas de urato, muchos de los cuales también están asociados con gota. Los genes transportadores de urato *SLC2A9* (*GLUT9*), *SLC22A12* (*URAT1*), *SLC17A1* (*NPT1*) y *ABCG2* están asociados con la variación en los niveles de urato en suero (Figura 6) ^{12,13}.

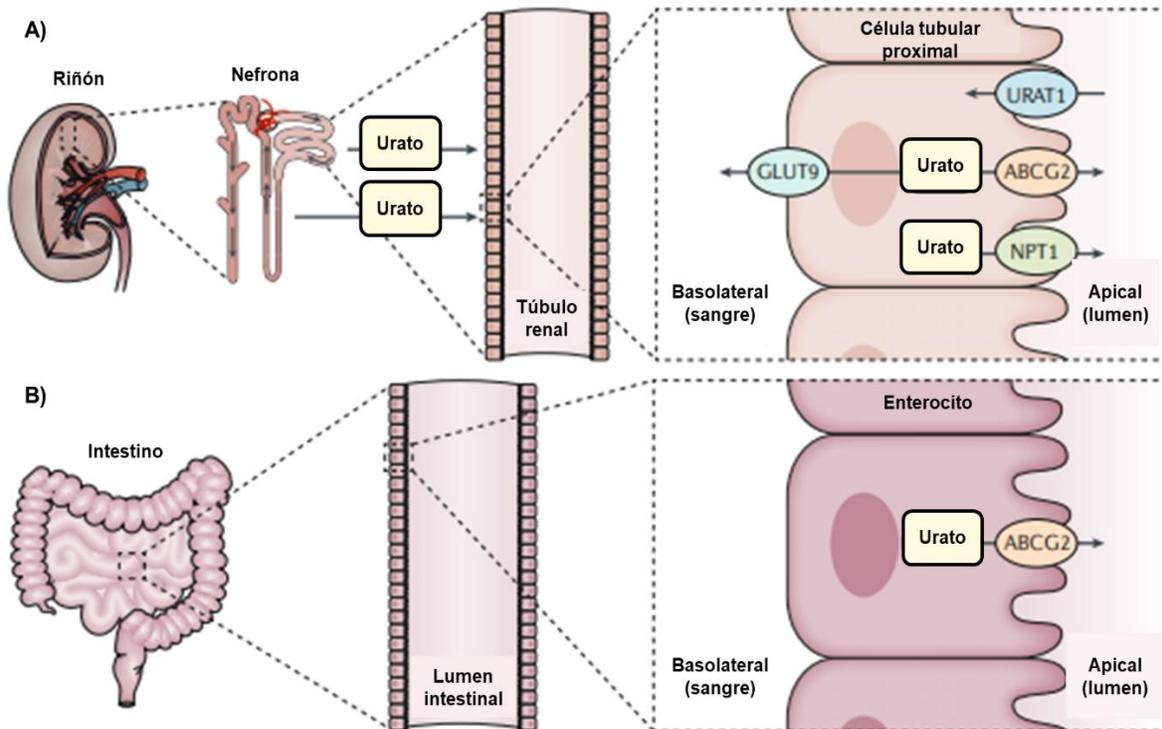


Figura 6. Transportadores de urato en los riñones (a) e intestino (b) en humanos. Los transportadores de urato GLUT9, URAT1, NPT1 y ABCG2 regulan los niveles de urato sérico en humanos. GLUT9 se encuentra en la membrana basolateral y URAT1 en la membrana apical de las células del túbulo proximal de la nefrona mediando la reabsorción de urato renal. GLUT9 funciona como un transportador de salida de urato en las células tubulares. NPT1 está presente en la membrana apical del túbulo proximal renal. ABCG2 está presente en la superficie apical de las células del túbulo proximal y en enterocitos ¹³.

Aunque muchos otros genes se han asociado con hiperuricemia y gota, mutaciones y variantes comunes de *SLC2A9* y *SLC22A12* están fuertemente asociados en ambas condiciones. Los niveles de urato sérico están regulados principalmente por

la actividad de estos cuatro transportadores GLUT9, URAT1, NPT1 y ABCG2 a nivel renal. La mayor parte del AU plasmático es filtrado por el riñón, y el 90% del mismo sufre reabsorción tubular proximal a través del transportador aniónico URAT1, excretándose menos del 10% del filtrado en los glomérulos ¹.

La microbiota transforma un tercio del AU en alantoína (una molécula más hidrosoluble y de fácil eliminación), lo que permite su excreción fecal; los dos tercios restantes se excretan vía renal por el mecanismo de filtración glomerular, reabsorción, secreción y posterior reabsorción ^{12,15,16}.

La concentración plasmática del urato depende del pH de la orina, así como también de otros factores como el volumen de orina, el volumen corporal, la función renal, dieta y el uso de ciertos medicamentos ^{8,17}.

A diferencia de la mayoría de los mamíferos, el humano posee niveles altos de AU al no disponer de uricasa o urato oxidasa, debido a la inactivación del gen que codifica para la urato oxidasa. Esta ausencia de la enzima urato oxidasa impide la degradación de AU en alantoína (Figura 7) ¹⁸.

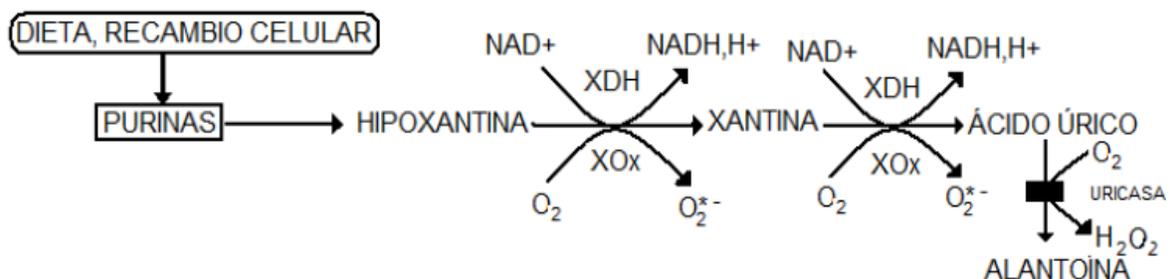


Figura 7. Catabolismo de las purinas y formación de AU. La acción de la enzima urato oxidasa, cuyo gen está mutado en el ser humano, produce alantoína. (IMP: inosín monofosfato; NO*: óxido nítrico; NAD+: nicotín adenín dinucleótido oxidado; NADH: nicotín adenín dinucleótido reducido) ¹⁸.

El mecanismo patogénico más frecuente en la gota es la disminución de la excreción renal de AU lo que conlleva a una acumulación de urato. El exceso de AU tiene un carácter patológico debido a que excede los límites de su solubilidad a la concentración de 7 mg/dl y teniendo en cuenta un pH fisiológico de 7.4 y una

temperatura de 37°C tiende a combinarse con el Na⁺ formando urato monosódico C₅H₄N₄NaO₃ (Figura 8).

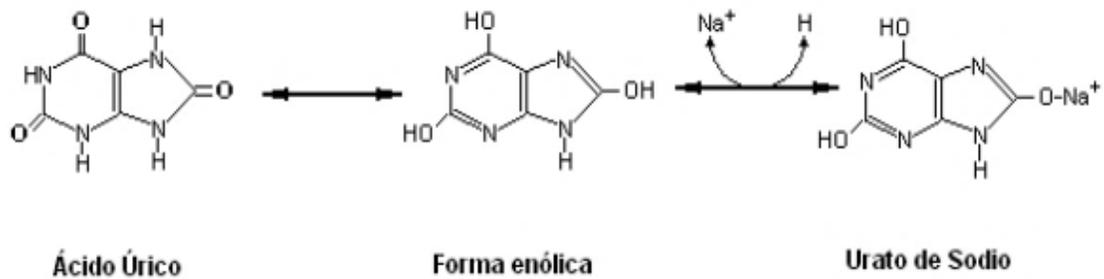


Figura 8. Modificaciones estructurales del AU en función del pH del medio. Las proporciones relativas del AU (ácido débil no dissociado) y del urato de sodio (su base conjugada) dependen del pH de la solución en la que se encuentren disueltos. En los fluidos biológicos con pH normal (7.4) predomina la forma de urato monosódico. En la orina con pH menor de 5.8 predomina la forma de ácido úrico ¹⁹.

La cristalización del NaC₅H₂N₄O₃ (Figura 9) en los tejidos depende de varios factores, especialmente de la concentración local de urato, ya que la solubilidad del urato en el líquido sinovial (LS) está influenciada por la temperatura corporal y el pH; a menor temperatura y mayor pH se facilita la precipitación dentro de la articulación. También debido a cambios morfológicos y bioquímicos en el cartílago y tejido conectivo que comprenden la articulación ²⁰.



Figura 9. Estructura del urato monosódico. El urato monosódico tiene cuatro grupos amino en posición 1, 3, 7 y 9 de sus anillos, tres grupos ceto en la posición 2, 6 y 8. El sodio se encuentra unido al oxígeno el grupo ceto de la posición 6 ²¹.

Sólo una minoría de individuos hiperuricémicos desarrollan gota. Sin embargo, prácticamente todos los enfermos con gota presentan hiperuricemia en algún momento de la evolución de su enfermedad ²². La prevalencia de hiperuricemia se estima en un 10%, y entre un 80 - 90% de los pacientes con gota tienen hiperuricemia ²³.

La hiperuricemia en humanos es relativamente común y se hace más frecuente a medida que la persona envejece; aunque la mayoría de los pacientes con hiperuricemia son asintomáticos y no desarrollan gota. En esta fase de hiperuricemia asintomática la concentración sérica de urato está incrementada, pero no existen síntomas articulares, tofos o urolitiasis. Sólo entre 10 - 20% de los hiperuricémicos asintomáticos llegan a padecer gota ^{23,24}.

La gota es el tipo más común de artritis inflamatoria en los varones jóvenes y en México tiene una prevalencia del 3% según datos de la Secretaria de Salud ²⁵.

La incidencia de gota es del 0,1% cuando la concentración sérica de urato es <7 mg/dl y aumenta al 0,5% para uricemias entre 7 y 8,9 mg/dl y es próxima al 5% si es superior a 9 mg/dl. En personas con una concentración sérica de urato >9 mg/dl la incidencia acumulada de gota llega a ser del 22% a los cinco años ²².

La gota puede presentar cuatro estadios clínicos. Al inicio ocurre la hiperuricemia asintomática, donde hay elevación del AU sin enfermedad articular, puede durar hasta 20 años y termina cuando aparece la artritis aguda, en la cual se presenta el primer ataque articular, es sumamente doloroso y puede manifestarse con fiebre, hinchazón y eritema; también se le conoce como ataque agudo de gota; el tercer período o intercrítico, es el tiempo en el que aparece un nuevo ataque agudo y finalmente la gota crónica ó tofácea, donde aparecen acúmulos de CUM en las articulaciones y/o tejidos blandos y degradación de las estructuras del tejido conectivo, que finalmente llevan a una degeneración de la articulación ²⁶.

La fisiopatología de la gota aguda involucra principalmente células monocíticas, macrófagos, neutrófilos, así como células de los diferentes tejidos que conforman la articulación, tales como condrocitos, osteoclastos y células de la MS, la cual es un

tejido mesenquimal especializado que recubre los espacios de las articulaciones diartrodiales, bolsas y vainas tendinosas que provee nutrientes al cartílago avascular ²⁷.

La sinovitis está caracterizada por infiltración de células inmunes a la MS, siendo esta estructura una de las primeras en activarse ante la presencia de cristales. La MS está constituida por los sinoviocitos tipo macrófago (STM) y sinoviocitos tipo fibroblastos (STF); los cuales merecen una mención debido a la sinovitis que provocan durante un ataque agudo de gota, asimismo se han identificado CTM ²⁸.

Los CUM constituyen los principales estímulos para iniciar, amplificar y mantener una respuesta inflamatoria; estos cristales pueden ser fagocitados como partículas extrañas por los monocitos, los cuales son activados por los CUM a través de los receptores tipo Toll 2 y 4 (TLR2 / TLR4), induciendo posteriormente la activación y el ensamblaje del complejo NLRP3, NALP3 o inflamasoma, el cual es un conjunto multiproteico (conocido como criopirina, componente central del inflamasoma) con actividad proteolítica que permite la activación de caspasas proinflamatorias, las cuales transforman al precursor de la interleucina-1 β (pre-IL1 β) a su forma activa interleucina-1 β (IL-1 β), y esta cuando es secretada en el entorno extracelular, desencadena la inflamación.

Adicionalmente, los CUM promueven la expresión de otras citocinas proinflamatorias en los monocitos como interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) y quimiocinas como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), los cuales en esta fase ya se han diferenciado a macrófagos. La respuesta inflamatoria inducida por el urato monosódico sugiere que la activación de la IL-1 es un mediador fundamental para el inicio de la inflamación aguda en la gota ^{12,28}.

Si no se corrigen los mecanismos fisiopatológicos que provocaron la hiperuricemia, tras un período libre de síntomas ó período intercrítico, los ataques agudos pueden volver a presentarse y entre el 17 y 53% de los pacientes pueden desarrollar artritis

gotosa crónica con la formación de múltiples depósitos de CUM o tofos, la cual puede causar dolor, deformidad y limitación del movimiento articular ^{29,30}.

La infiltración de tofos en el hueso parece ser el mecanismo dominante para la erosión ósea y el daño articular en la gota ²⁹. Los CUM pueden incrustarse en la superficie ósea y formar depósitos en la sinovia, con áreas de inflamación, fibrosis y formación de pannus ó proliferación de tejido sinovial, el cual se comporta como un tumor localmente invasivo cuyos componentes, tales como macrófagos, osteoclastos y STF degradan al hueso y cartílago, los cuales están asociados con daño morfoestructural y discapacidad musculoesquelética ³¹.

En la etapa crónica, al interior de los depósitos tofáceos ocurre un proceso dinámico con reclutamiento celular y activación proinflamatoria de bajo nivel; por lo que los tofos pueden ser motivo de complicaciones como infecciones secundarias, fibrosis, y/o necrosis cutánea.

La gota crónica se caracteriza por la artritis destructiva, frecuentemente con cambios degenerativos y erosiones óseas. El tiempo que transcurre entre la hiperuricemia, el ataque agudo de gota y la artritis gotosa crónica puede llegar a ser de años; por ejemplo, entre el primer ataque agudo hasta la cronicidad con tofos transcurren aproximadamente 10-12 años ³¹.

En los últimos años se ha estudiado el mecanismo de activación de la inflamación y del estrés oxidante inducido por los CUM en varios modelos *in vitro* e *in vivo*, las células más comúnmente estudiadas han sido monocitos-macrófagos y STF; y generalmente han estado enfocados en estudiar la fase aguda de la enfermedad. Actualmente, se desconocen los mecanismos de osteodiferenciación inducidos por los CUM en la etapa crónica de la gota.

2.2. Membrana sinovial como fuente de CTM

La MS es un tejido conectivo laxo que rodea la articulación, la cual es una cavidad que contiene el cartílago y hueso articular, la MS tiene numerosas vellosidades y pliegues que proyectan hacia la cavidad articular. Está formada por dos capas: 1) la capa sinovial íntima o revestimiento sinovial, que limita con los espacios del ligamento y que contiene STM y STF; y 2) la subíntima la cual contiene tejido fibroso, vascular y células inmunitarias, tales como células dendríticas ^{27,32}.

La MS está formada por tres tipos de tejido conectivo: fibroso, adiposo y reticular. El primero se encuentra en las zonas expuestas a una mayor presión, como los ligamentos y tendones, el segundo tipo, el tejido graso, penetra en la articulación y confiere la capacidad de adaptarse al movimiento y finalmente la parte reticulada o capa íntima, la responsable de la producción y absorción del LS, y por lo tanto de la nutrición del cartílago ^{32,33}.

Recientemente se han identificado también CTM en aspirados de LS, provenientes tanto de la capa íntima como subíntima, otorgando al LS un potencial proliferativo y condrogénico ³⁴.

Las CTM son un grupo de células que se caracterizan por la capacidad de dividirse y renovarse a lo largo de la vida de un individuo y por responder a señales o estímulos generados en el micro-ambiente donde se encuentran para diferenciarse hacia linajes celulares con características y funciones especializadas ^{35,36}.

Estas pueden clasificarse según el tejido de origen en células madre embrionarias o adultas y según su potencial de diferenciación en células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales ³⁷. Las células madre totipotentes son aquellas capaces de dar origen a tejido embrionario y extraembrionario; las células pluripotentes producen células derivadas de cualquiera de las tres capas embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo (Figura 10).

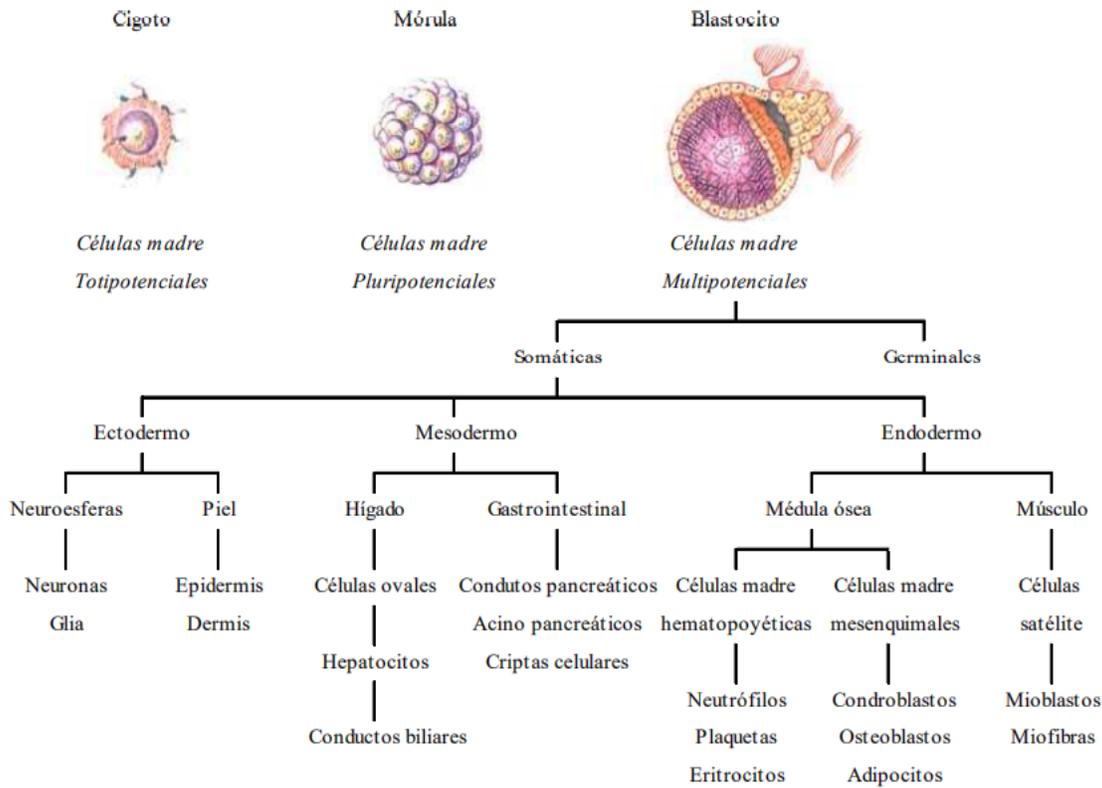


Figura 10. Modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial de diferenciación. Las células madre se pueden clasificar según su potencial de diferenciación: las células madre totipotenciales son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario; las células madre pluripotenciales tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y, por último, las células madre multipotenciales, son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria ^{38,39}.

Las células multipotentes generan todos los tipos celulares derivados de una sola capa embrionaria, como sucede en el caso de las células madre neuronales, hematopoyéticas y mesenquimales ^{38,39}; y por último, las células madre con un menor potencial para diferenciarse son conocidas como células unipotenciales ⁴⁰. Todas las células madre son células indiferenciadas que exhiben una capacidad de auto-renovación ilimitada y que tienen el potencial de generar múltiples linajes celulares o poblaciones progenitoras que pueden contribuir a la homeostasis tisular mediante la repoblación celular y la regeneración de tejidos después de una lesión ³⁶.

Las CTM se definen como células no hematopoyéticas, adherentes al plástico, capaces de formar clones y de renovación automática que pueden diferenciarse *in vitro* en condrocitos, adipocitos y osteoblastos ⁴¹. Además, estas células participan en la homeostasis, remodelación y la reparación tisular, asegurando el reemplazo de las células maduras que se pierden durante el recambio fisiológico, la senescencia, una lesión o enfermedad ⁴².

Cualquier tejido adulto con capacidad para reparar o regenerarse contiene CTM, debido a su capacidad de auto renovación, capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación (Figura 11) ⁴³.

Las CTM se han aislado de múltiples tejidos humanos como la médula ósea ⁴⁴, cordón umbilical ⁴⁵, piel ⁴⁶, placenta ⁴⁷, líquido amniótico ⁴⁸, los músculos esqueléticos ⁴⁹, tejidos adiposos ⁵⁰, LS y MS ⁴².

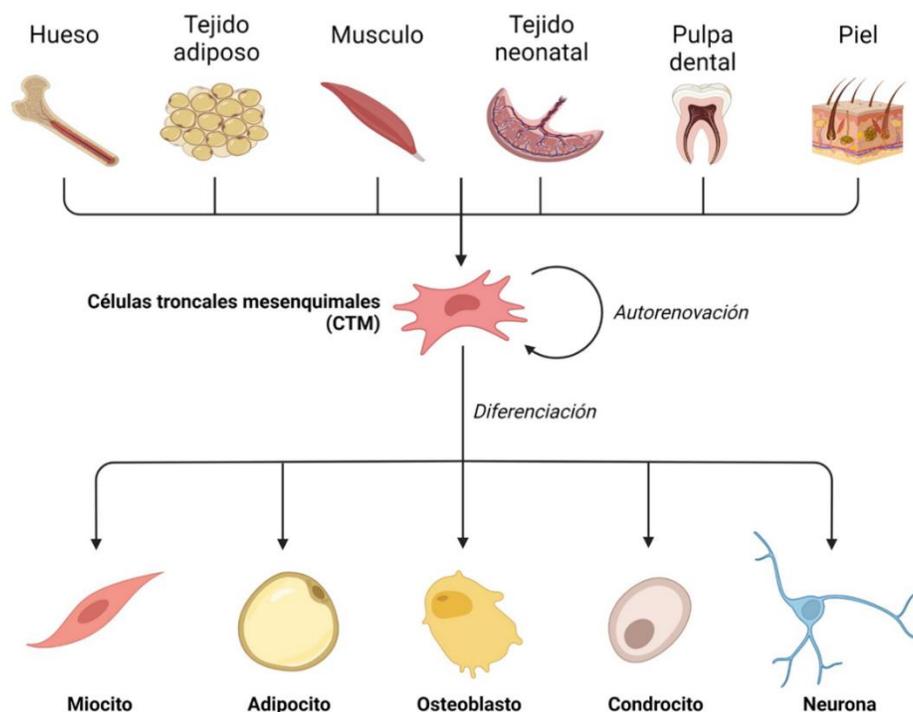


Figura 11. Fuentes de CTM-MS y su diferenciación. Las CTM son células capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas, caracterizadas propiedades esenciales; su capacidad de autorrenovación, fundamentada en la proliferación ilimitada y en su conservación como células indiferenciadas, y su habilidad para generar diferentes tipos celulares (óseas, sanguíneas, epidérmicas, cutáneas, neuronas, etc.), que se localizan en el tejido conectivo de diversos órganos (Figura diseñada para propósito del presente trabajo, con el software BioRender)

De Bari et al. 2007 ⁴², informaron por primera vez sobre la presencia y las características de las CTM en MS, las cuales se han estudiado ampliamente en los últimos años, debido a que exhiben una capacidad condrogénica superior en comparación con las CTM derivadas de los tejidos no articulares; por lo tanto, son reconocidas como una opción viable para reparar el cartílago ^{32,44}.

La MS puede proporcionar una fuente heterogénea de CTM-MS para estudios experimentales ³⁴, ya que estos especímenes contienen diversos tejidos, incluidas las capas íntima y subintima; siendo aún incierta la localización exacta de las CTM en la sinovial (Figura 12) ³³.

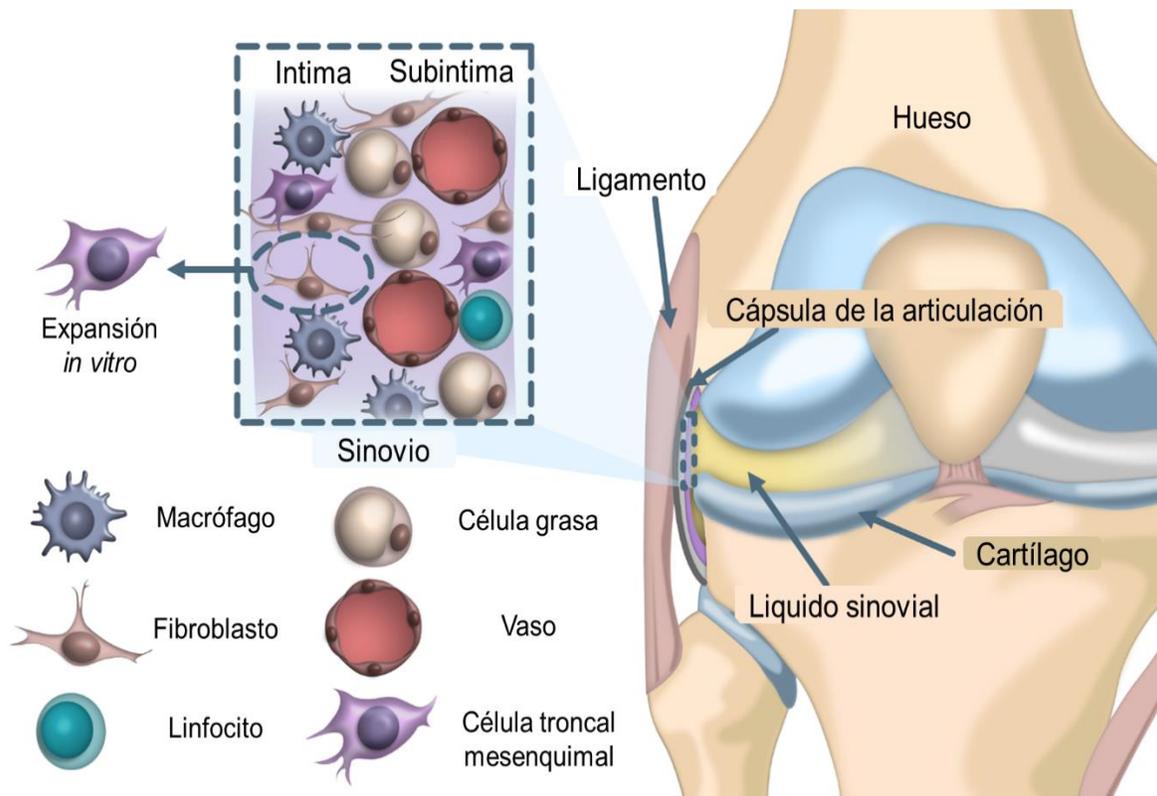


Figura 12. Localización de CTM-MS en la articulación. Anatomía de una articulación donde se muestran tejidos que comprenden la articulación y la localización de la MS además de las células que la conforman (Figura diseñada para propósito del presente trabajo, con el software Affinity Designer) ³³.

Las CTM se han ubicado en la zona de transición entre el cartílago articular y la MS. Hay dos puntos de vista diferentes sobre el origen de CTM-MS. Uno es que las CTM-MS se introducen en la MS a través de los vasos sanguíneos, esto se debe a que CTM-MS generalmente se encuentra alrededor de vasos sanguíneos, y la frecuencia de CTM-MS correlacionan positivamente con el aumento de la vascularización del tejido. La otra perspectiva es que las CTM-MS se originan en la íntima sinovial ⁵¹.

2.3. Características morfológicas e inmunocitoquímicas de CTM-MS

La morfología de las CTM-MS es similar a los STF; es decir morfología de huso, núcleo con cromatina homogénea, nucléolos prominentes y abundante retículo endoplásmico rugoso, además los STF en cultivo tienen capacidad de adherencia al plástico y ausencia de marcadores leucocitarios (CD45-negativos) ^{32,52}.

De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular las CTM son células, que deben poder adherirse al material plástico y expandirse cuando se cultivan *in vitro*; para ser clasificadas como troncales mesenquimales deben poseer la capacidad de diferenciación trilineal (cartílago, tejido óseo y tejido adiposo) ^{43,44,48,53,54}.

Uno de los criterios principales para su identificación son la adherencia al plástico de frascos de cultivo de tejidos y su morfología similar a fibroblastos ⁵⁵. Además deben expresar los siguientes marcadores de superficie CD105 (Endogлина), CD73 (5'-nucleotidasa) y CD90 (antígeno de superficie celular Thy-1), y carecer de la expresión de CD45 (receptor de tirosin fosfatasa tipo C), CD34 (antígeno de células progenitoras hematopoyéticas), CD14 (antígeno de diferenciación de monocitos), e CD11b (subunidad alfa integrina M), CD79 α o CD19 (antígeno de linfocitos B) y HLA-DR (complejo mayor de histocompatibilidad, clase II) ^{44,54}.

Las CTM-MS se caracterizan por la expresión positiva de CD90, CD105, CD73 y CD44 (específicos para células madre), y la expresión negativa de marcadores asociados a los linajes celulares hematopoyéticos CD45, CD34, CD11, CD14, CD117 (Tabla 1) ^{32,42,52,55-58}

Tabla 1. Multipotencia y marcadores de superficie celular CTM-MS.

Especie	Muestra	Diferenciación	Marcadores celulares	Referencias
Humano	MS de sanos, heridos y Articulaciones OA	Osteogénica , Condrogénica y Adipogénica	Positivo:CD44, CD73 CD90, CD105, CD147, CD166, CD55, CD271, SOX9, ACAN, COL10A1, ALP, RUNX2, PPARG, LPL; Negativo: CD14, CD34, CD45, CD117, CD31	59 42 60 58 61
Humano	MS de sanos	Osteogénica , Condrogénica y Adipogénica	Positivo: CD44, CD69, CD73, CD90, CD105, CD106, CD271, SOX9, Nanog, RUNX2, COL2; Negativo; CD34, CD45	52
Humano	MS de articulaciones de rodilla y cadera	Osteogénica , Condrogénica y Adipogénica	Positivo: CD44, CD90 CD105, CD147, RUNX2, BGLAP, COL2, ADIPSINA; Negativo: CD45, CD 31, CD117, CD34, CD166, VEGFR2, NGFR	57
Humano	MS de articulaciones de rodilla (tejido de cadavérico)	Osteogénica , Condrogénica y Adipogénica	Positivo: CD44, CD90, CD105 Negativo: CD45	62

MS: Membrana sinovial, OA: Osteoartritis, CD44: glicoproteína de superficie celular, CD73: 5'-nucleotidasa, CD90: antígeno de superficie celular Thy-1, CD105: endoglina, CD147: inductor de metaloproteínasa de matriz extracelular, CD166: glucoproteína transmembrana tipo I, CD55: factor acelerador de la descomposición del complemento, CD271: marcador de MSC de médula ósea, SOX9: factor de transcripción de la familia SRY, COL10A1: cadena de colágeno alfa-1 (X), ALP: fosfatasa alcalina RUNX2: factor de transcripción, diferenciación de los osteoblastos, PPARG: Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma, LPL: lipoprotein lipasa, CD14: antígeno de diferenciación de monocitos, CD34: antígeno de células progenitoras de hematopoyesis, CD45: receptor de tirosin fosfatasa tipo C, CD117: receptor de células madre, CD31: molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas 1, CD69: proteína de lectina transmembrana de tipo C, CD106: molécula de adhesión celular vascular.

2.4. Características del potencial de diferenciación de CTM-MS

Las CTM están en casi cualquier tejido del cuerpo y tienen la habilidad para migrar hacia los lugares de la lesión y ser capaces de formar nuevos tejidos para regeneración tisular, ya sea directamente por medio de diferenciación hacia células adultas o indirectamente mediante la secreción de citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas para inmunomodulación, estimulando la angiogénesis y reclutando células progenitoras específicas del tejido nativo ⁶³.

Los estudios de Pittenger et al. ⁵³, demostraron la capacidad *in vitro* de las CTM humanas para diferenciarse en células adiposas, osteoblastos y condrocitos. Estos experimentos, realizados a partir de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F), demostraron que la diferenciación de estas células depende de su ambiente, y que no todas tienen el mismo potencial de diferenciación.

Las células formadoras de colonias derivadas de MS tienen un potencial múltiple de diferenciación, *in vitro* ^{57,62}. cuando se expanden en cultivo y con la suplementación con factores de crecimiento hacia células osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas ⁴³.

2.4.1. Diferenciación osteogénica

La diferenciación osteogénica de CTM-MS es inducida *in vitro* con medio Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB), una mezcla de antibióticos: penicilina/ estreptomycin, ácido ascórbico, β -glicerofosfato y dexametasona durante 14 o 21 días ^{59,61}. Las células derivadas de la MS al ser estimuladas con este medio forman una extensa red de nódulos o depósitos de calcio característicos de la diferenciación osteogénica, que en los cultivos se visualiza mediante una tinción específica Tinción de Von Kossa ^{59,61,62} o tinción con rojo de alizarina ^{57,62}; además se valora la expresión de marcadores osteogénicos específicos mediante reacción de cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) ^{59,61} como osteocalcina (Ocn), proteína no colágena

más abundante de la matriz extracelular (MEC) del hueso producida principalmente por osteoblastos; fosfatasa alcalina (ALP), la cual es una enzima hidrolasa, que remueve los grupos fosfatos de diferentes tipos de moléculas y se encuentra en polimorfonucleares, osteoblastos, fibroblastos y diversas células del tejido conectivo, con un papel importante en el remodelado del tejido óseo y RUNX2/Cbfa1, factor de transcripción asociado con la diferenciación de los osteoblastos ⁶⁴.

2.4.2. Diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica es inducida *in vitro* empleando DMEM suplementado con SFB, penicilina/estreptomicina, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona (DEX), insulina, transferrina y selenito de sodio, prolina y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) ^{59,61,65}. La tinción con azul Alciano se usa para evaluar la presencia de proteoglicanos sulfatados dentro de la matriz, lo que confirma la diferenciación condrogénica ^{59,62}; adicionalmente, se evalúa la expresión de marcadores condrogénicos específicos mediante RT-PCR ^{59,61}. como colágeno tipo II, proteína propia de la MEC, componente mayoritario del cartílago y los condrocitos, los cuales son responsables de la síntesis y el mantenimiento de la MEC, esta última compuesta en un 80% de agua y en un 20% de materia sólida, y cuyo principal componente es el colágeno tipo II y los proteoglicanos, por lo tanto se emplea como un marcador de diferenciación de condrocitos; asimismo, se evalúa Sox9 un factor de transcripción condro-progenitor de las células y expresado en condrocitos diferenciados ⁶⁶, además de regular la expresión del colágeno tipo II, IX y XI, el agregano y la proteína de matriz oligomérica del cartílago (COMP) en el desarrollo del cartílago ⁶⁷.

2.4.3. Diferenciación adipogénica

El medio adipogénico utilizado para diferenciar *in vitro* a las CTM-MS en adipocitos es DMEM suplementado con SFB, una mezcla de antibióticos, DEX, indometacina / 3-isobutil-1-metilxantina ^{57,58}. durante tres semanas, con reemplazos de medios cada dos veces por semana. Las inclusiones citoplasmáticas de lípidos neutros son observadas después de la tinción de rojo oleoso o rojo "O" ^{58,62} y se analizan marcadores adipogénicos específicos tales como el receptor activado por proliferador de peroxisomas gamma (PPAR γ G), el cual es un factor transcripcional que regula múltiples genes de diferenciación y proliferación de adipocitos, produce una captura de ácidos grasos y su almacenamiento ⁶⁸ y la expresión de la enzima lipoprotein lipasa (LPL), la cual hidroliza a los triglicéridos de los quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad en los adipocitos ⁶⁰.

3. ANTECEDENTES

La hiperuricemia desempeña un papel en la patogénesis de ciertos procesos como la hipertensión arterial; enfermedad renal crónica, enfermedad cardio y cerebrovascular, resistencia a la insulina, diabetes tipo II y gota. Además, guarda una estrecha relación con el síndrome metabólico ⁶⁹.

El daño articular es una característica de las artropatías erosivas como la gota y se asocia con discapacidad musculoesquelética. A medida que los tofos incrementan de tamaño, en número y cuando se involucran más articulaciones, la deformidad articular, así como la discapacidad progresan ⁷⁰.

La asociación entre el depósito de CUM y el daño articular en pacientes con gota crónica se ha reconocido por la presencia de tofos adyacentes a sitios de pérdida de cartílago y destrucción articular. Los depósitos tofáceos pueden erosionar huesos, cartílagos y tendones, causando un daño estructural significativo ^{70,71}.

Durante el ataque agudo de gota, las citocinas proinflamatorias como la IL-1 β están involucradas en la promoción del daño óseo y tienen un papel en la activación y diferenciación de osteoclastos y de inducir la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular, incluidas las metaloproteinasas (MMP) como consecuencia de una inflamación crónica ⁷².

Se sabe que la estimulación de estirpes monocíticas (precursoras de osteoclastos) con CUM *in vitro* no promueve directamente la formación de osteoclastos; este proceso puede ocurrir de manera indirecta a través de las células del estroma del tofo, ya que medios de cultivo provenientes de una línea celular osteoblástica cultivada con CUM promueven la formación de osteoclastos ⁷³.

Los CUM inhiben la expresión génica y proteica de osteoprotegerina (OPG), también llamado factor inhibidor de la osteoclastogénesis en STF, sin alterar la expresión génica del ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa-B (RANKL). Un nivel más bajo de OPG permite mayor disponibilidad de RANKL, promoviendo la osteoclastogénesis y conduciendo a la erosión ⁷³.

Asimismo Chhana *et al.* ⁷⁴, informaron que los CUM promovieron en osteoblastos la expresión de RANKL/OPG induciendo la osteoclastogénesis y resorción ósea. Adicionalmente encontraron que osteoblastos humanos estimulados con CUM e IL-1 disminuyeron la formación de osteocalcina y la actividad de la enzima ALP, lo que sugiere una diferenciación reducida de osteoblastos.

Los CUM contribuyen a la erosión del hueso en la gota, a través de la formación de osteoclastos y por una disminución en la viabilidad, función y diferenciación de osteoblastos, ya que hay una reducción en la mineralización y en la expresión de genes relacionados con la diferenciación de osteoblastos, tales como, Runx2, osterix (Sp7), sialoproteína ósea (Ibsp) y osteocalcina (Bglap) sugieren que la erosión ósea en la gota ocurre en la interfaz tofo—hueso a través de la alteración del recambio fisiológico del hueso, con formación excesiva de osteoclastos y una diferenciación reducida de los osteoblastos ⁷⁵.

Actualmente, se carecen de estudios realizados en CTM, que evalúen el impacto de los CUM en los procesos de osteodiferenciación. Existen algunos reportes que indican que la hiperuricemia induce la diferenciación *in vitro* de CTM derivadas de placenta en células neuronales ⁶⁹, otros estudios han informado el efecto del AU en la diferenciación osteogénica y adipogénica de CTM humanas aisladas de médula ósea (hBMSCs), a través de las vías de señalización 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1), subunidad alfa-1 del factor de unión al núcleo (Cbfa1), Runx2 y Wnt ^{76,77}.

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la mayoría de los modelos de gota están centrados en la fase aguda de la enfermedad y son dirigidos al estudio de los procesos inflamatorios para esclarecer algunos mecanismos patogénicos y moleculares del papel de los CUM en distintas células que comprenden a la articulación como condrocitos, monocitos y macrófagos, mientras que la participación de la MS ha sido pobremente estudiada, sobretodo la participación de las CTM en la osteodiferenciación inducida por el depósito de CUM en la etapa crónica de la gota.

Existe poca información sobre los mecanismos de osteogénesis inducido por los CUM en la gota que pudieran estar modulando la expresión de proteínas que favorecen el estado erosivo articular. Por tal motivo, es importante identificar los mecanismos de activación de la osteogénesis con la intención de elucidar blancos terapéuticos que nos permitan, mediante medicina traslacional, diseñar nuevas estrategias de terapéutica específicas y eficaces contra la gota erosiva. La comprensión de los mecanismos moleculares a través de los cuales las CTM amplifican su respuesta a los CUM contribuirá a definir mejor su papel en la regulación de la osteogénesis en la artritis gotosa crónica.

5. HIPÓTESIS

El depósito crónico de CUM en la MS induce osteodiferenciación de las CTM-MS.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar el potencial osteogénico de los CUM para promover la diferenciación osteogénica de las CTM-MS.

6.2. Objetivos particulares

- ◆ Obtener cultivos primarios a partir de MS humana
- ◆ Aislar las CTM-MS y caracterizarlas fenotípicamente
- ◆ Analizar la viabilidad celular de las CTM-MS expuestas a AU y CUM
- ◆ Evaluar la diferenciación osteogénica de las CTM-MS expuestas a AU y CUM a través de la formación de depósitos de calcio y de la expresión de Runx2

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Tipo de estudio

Estudio experimental comparativo, analítico, transversal, no probabilístico. Se utilizaron células de al menos cinco pacientes diferentes, para medición de las variables en ensayos independientes.

7.2. Descripción del universo de trabajo

El universo de trabajo fueron pacientes evaluados por médicos adscritos al Servicio de Artroscopía del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” (INR-LGII) con diagnóstico de lesión de ligamento cruzado anterior o posterior que fueron sometidos a cirugía por artroscopia y aceptaron donar remanente de MS. El tejido sinovial de estos pacientes fue procesado para aislamiento de sinoviocitos y de CTM-MS, de cada muestra se separaron células para los siguientes grupos de estudio: control o cultivos de CTM-MS sin estímulo; experimental: CTM-MS expuestas a AU y a CUM; grupo control positivo: CTM-MS expuestas a medio osteogénico.

7.3. Definición del grupo control

Pacientes, hombres y mujeres de 18 a 45 años, sometidos a cirugía de ligamento cruzado anterior ó posterior que ingresaron al protocolo titulado: “Potencial osteogénico de los cristales de urato monosódico en células troncales mesenquimales de membrana sinovial” (Anexo 1). El protocolo recibió aprobación por parte de los tres comités del INR: Comité de Ética en Investigación con número de registro 23/21.

Esta investigación se llevó a cabo en las instalaciones del INR-LGII, específicamente en el Laboratorio de Líquido Sinovial ubicado en el cuarto piso de la Torre de Investigación. Los pacientes que ingresaron al estudio firmaron una carta

de consentimiento informado (Anexo 2). Los cuales donaron un fragmento de MS de los remanentes de su cirugía para la realización de los cultivos de CTM-MS para la conformación de los grupos control, experimental y de inducción positiva.

7.4. Criterios de inclusión

Hombres y mujeres de 18 a 45 años, sometidos a cirugía de ligamento cruzado anterior ó posterior que aceptaron participar y que firmaron carta de consentimiento informado.

7.5. Criterios de eliminación

- MS de pacientes que se contaminaron en la toma de muestra o en el traslado al laboratorio, muestras insuficientes y muestras de pacientes con información clínica incompleta.
- Cultivos contaminados en el transcurso del aislamiento y expansión celular.

7.6. Criterios de exclusión

- Pacientes hiperuricémicos, pacientes con gota definida de acuerdo a los criterios del CAR.
- Presencia de artropatías microcristalinas y metabólicas asociadas a la gota como la Pseudogota o Condrocálcinosis.
- Pacientes con desórdenes autoinmunes como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.
- Pacientes con osteoartritis, definida de acuerdo a los criterios del CAR.

7.7. Tamaño de la muestra

Se incluyeron en total 6 muestras, provenientes de distintos pacientes del INR-LGII del servicio de Artroscopía, de los cuales se realizó el aislamiento de las células para la realización de ensayos independientes. De las cuales se excluyó 1 paciente por contaminación bacteriana en el cultivo primario.

7.8. Descripción de las variables de estudio, unidades de medida y escalas de medición

Tabla 2. Variables de estudio, unidades de medida y escalas de medición.

Variable	Tipo de variable	Unidad de medida	Escala de medición
CUM	Categórica	Nominal	Presencia/ausencia
Expresión de marcador osteogénico Runx2	Categórica	Nominal	Presencia/ausencia
Nódulos de calcio	Categórica	Nominal	Presencia/ausencia
Inflamación	Categórica	Nominal	Presencia/ausencia

7.9. Descripción de los procedimientos

7.9.1. Obtención de muestras

Las muestras de remanentes de MS de aproximadamente 1x1cm² fueron obtenidas a través de cirugía de reparación de ligamentos por artroscopia, estas fueron depositadas en un tubo de 50mL con 15mL de medio de transporte que contenía solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) (GIBCO BRL, Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con 10% (v/v) de Penicilina/ Estreptomina (PE) (GIBCO BRL). Los tubos fueron rotulados con una etiqueta que identificó al participante y fueron transportados al cuarto de cultivo del Laboratorio de Líquido Sinovial.

7.9.2. Aislamiento de células de la MS y cultivo primario

La MS fue lavada tres veces con PBS 1X, seguido de una disgregación mecánica con bisturí, dentro del gabinete de bioseguridad clase III, empleando cajas Petri de 60x15mm, se realizó la siembra por explante, en la que a los fragmentos de MS se les adicionó medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con 20% de SFB y 1% PE. Los explantes fueron incubados a 37°C en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO₂, a las 24 h los cultivos fueron observados por microscopía y las células no adherentes fueron retiradas por sustitución del medio con medio de cultivo fresco, la sustitución de medios de cultivo se llevó a cabo cada tercer día, hasta identificar un 80-90% de confluencia de las células adherentes en la caja de cultivo 57,62.

El procedimiento de recolección de tejidos y aislamiento celular es esquematizado en el siguiente diagrama de trabajo (Figura 13).

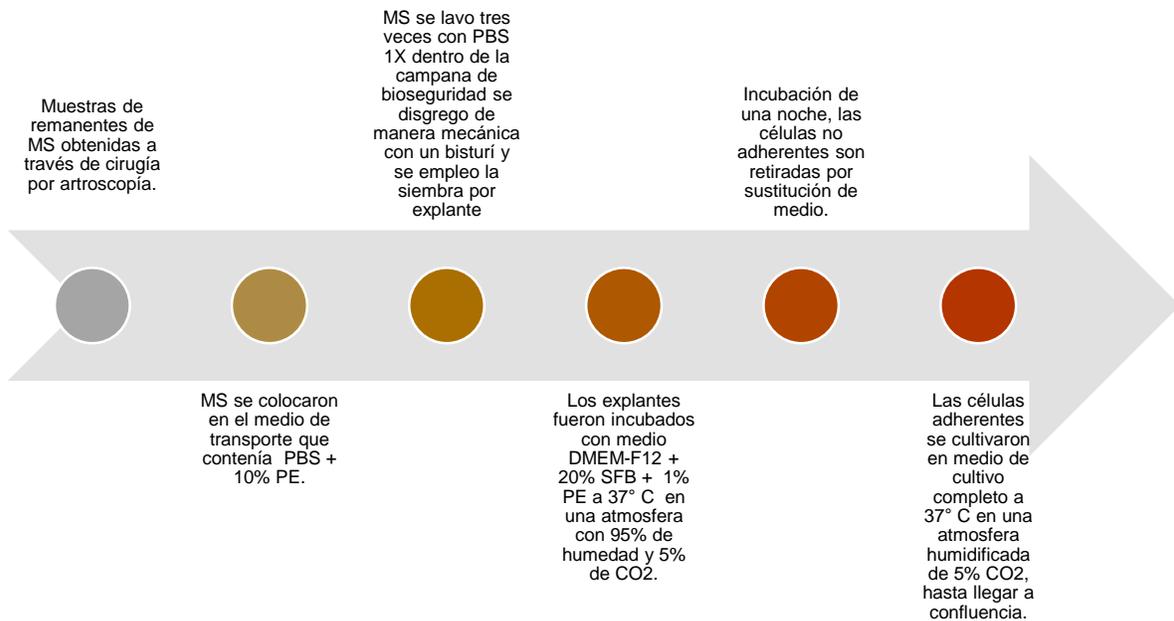


Figura 13. Recolección de MS y aislamiento celular. Las muestras de MS se sometieron a disgregación mecánica y posteriormente se realizó la siembra por explante.

Una vez obtenido el cultivo primario, las células se expandieron hasta un subcultivo en segundo pase, en este 2° pase, las células fueron disgregadas para la inmunofenotipificación. Las células fueron lavadas con PBS 1X y se disgregaron enzimáticamente empleando incubación a 37°C con tripsina-EDTA 1X (GIBCO BRL) durante 5 min, posteriormente la tripsina fue inactivada con DMEM-F12 suplementado con SFB al 10%, una vez realizada la inactivación, las células son recuperadas y centrifugadas durante 5 min, a 1,200 rpm para eliminar la tripsina y el medio de inactivación, el botón celular se resuspendió en PBS, se determinó la densidad celular empleando la tinción con azul tripano en cámara de Neubauer ⁷⁸ y fue dividido en dos fracciones; la primera fracción se empleó para inmunofenotipificación de las células, para lo cual éstas se resuspendieron en PBS a una densidad de 2.0×10^5 células empleando anticuerpos anti CD90 acoplado a isotiocinato de fluoresceína FITC (BD Pharmigen/Cat:561988), CD105 acoplado a ficoeritrina PE (BD Pharmigen Cat:560839), CD73 acoplado a peridinin clorofila PerCP-Cy (BD Pharmigen Cat:581280), CD117 alofococianina APC (BD Pharmigen Cat:561118), CD14 acoplado a FITC (Thermo Scientific Cat:1-82074), CD34 acoplado a PE (BD Pharmigen Cat:555822), CD45 acoplado a FITC (BD Pharmigen Cat:555482), CD166 acoplado a PE (BD Pharmigen Cat:559263), CD271 acoplado a FITC (Miltenyi Biotec Cat:130098) y CD31 acoplado a FITC (Thermo Scientific Cat:1-80360). En la segunda fracción de células se colocaron 5.0×10^5 en una caja petri de 15cm correspondiente al pase 3, para su expansión y posterior ensayo de separación inmunomagnética ^{79,80}.

7.9.3. Separación inmunomagnética de células CD90⁺

Del subcultivo en expansión en tercer pase, se aisló a la subpoblación de células CD90⁺ por separación inmunomagnética empleando el separador MidiMACS, (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) utilizando un anticuerpo anti-CD90 (Miltenyi Biotec) acoplados a perlas magnéticas (MACS, Microbeads, Miltenyi) y utilizando columnas de separación (MS Columns, Miltenyi). Las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti CD90 conjugado a partículas

superparamagnéticas de 50nm, durante 15 min, a 4°C protegidas de la luz, posteriormente las células marcadas se pasaron a través de las columnas de separación, las cuales se encontraban bajo un campo magnético, por selección negativa fueron recuperadas aquellas que no estaban marcadas ó células CD90-, posteriormente la columna fue removida del campo magnético recuperando las células CD90+ por elución (Figura 14).

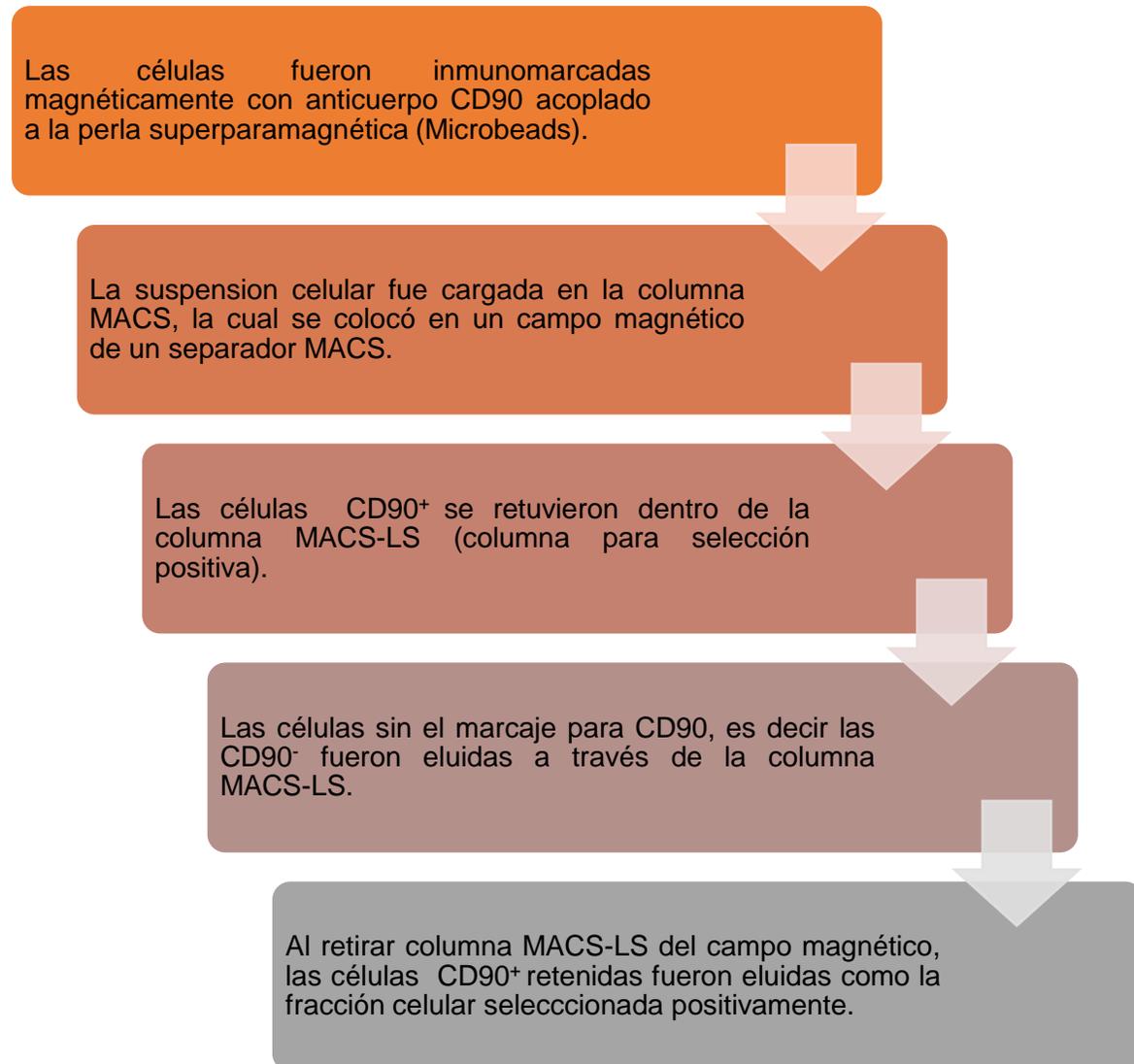


Figura 14. Principio de separación MACS. Las células CD90+ se separaron utilizando el Sistema MINI MACS (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

La subpoblación de células CD90+ se expandió y se utilizó para análisis posteriores.

7.9.4. Inmunofenotipificación de las CTM-MS

Las células CD90⁺ fueron cultivadas hasta alcanzar su confluencia y fueron inmunofenotipificadas por citometría de flujo. Las células fueron disgregadas con Tripsina-EDTA 1X y fueron resuspendidas en PBS. Se determinó la densidad celular por azul tripano, se emplearon 2.0×10^5 células para ser incubadas con diferentes anticuerpos, la primer alícuota con CD90-FITC, CD105-PE, CD73- PerCP-Cy y CD117-APC; otras células fueron marcadas con CD14-FITC y CD34-PE; la tercer alícuota de células con CD45-FITC y CD166-PE; la cuarta alícuota con CD271-FITC y en la quinta alícuota CD31-FITC, un grupo de células sin ningún anticuerpo se utilizó como blanco. Los anticuerpos monoclonales para la citometría de flujo fueron antihumano hechos en ratón.

7.9.5. Evaluación de UFC

Uno de los ensayos desarrollados *in vitro* para cuantificar progenitores multipotenciales, es el cultivo de células progenitoras en la cual los progenitores individuales, denominados unidades formadoras de colonias UFC proliferan para formar discretos agregados celulares o colonias ⁸¹.

Con el fin de identificar si las CTM-MS tenían la capacidad de formar colonias se colocaron 1000 CTM-MS de la subpoblación de células CD90⁺ obtenidas después de la separación inmunomagnética y se cultivaron en placas de 6 pozos durante 14 días basándonos en los procedimientos proporcionados por StemCell Technologies (2019) ⁸¹ empleando DMEM-F12 suplementado con 20% de SFB y PE al 1%, las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO₂, reemplazando el medio de cultivo por medios frescos cada tercer día. Se identificaron las UFC a través de la técnica de incorporación del colorante cristal violeta ⁸². Se retiró el medio de cultivo de las células y se lavaron con 1mL de PBS por cada pozo, para realizar la fijación se utilizó 1mL de glutaraldehído (Sigma-Aldrich) al 2.5% por pozo durante 10 min, posteriormente se retiró y se lavó con agua destilada; se dejó secar al aire. La tinción se realizó con 1mL de cristal violeta

(Sigma-Aldrich) al 0.1%, durante 20 min en agitación continua a velocidad de 40 rpm, posteriormente se retiró el exceso de colorante mediante lavados con agua destilada y se dejó secar al aire. Las UFC fueron identificadas con un microscopio estereoscópico SteReo Discovery V.20 Zeiss y se contabilizaron, expresadas en número de UFC.

7.9.6. Estimulación celular

Las CTM-MS (subpoblación de células CD90⁺ obtenidas de la separación inmunomagnética) se expusieron a diferentes concentraciones de AU: 3, 6.8 y 9 mg/dL simulando una hipo, normo y una hiperuricemia ⁸³, asimismo, otro grupo de células fueron expuestas a CUM en una concentración de 1, 5 y 10 µg/mL en medio DMEM-F12 suplementado con 20% SFB y 1% PE ⁷⁴, como control positivo se emplearon células expuestas únicamente a medio de cultivo osteogénico (StemMACS OsteoDiff Media human, MACS, Miltenyi Biotec). Todos los grupos experimentales fueron comparados con un grupo control de CTM-MS sin estímulos, únicamente con medio de cultivo al 20% de SFB y 1% PE. Todos los medios del cultivo fueron cambiados cada tercer día durante 21 días.

7.9.7. Análisis de viabilidad celular

Para la evaluación de la viabilidad celular, se realizó la técnica descrita por Flick and Gifford ⁸². Después de estimular a las células con las concentraciones y tiempos establecidos, se retiró el sobrenadante de las cajas de cultivo y estos fueron almacenados a -20°C para estudios posteriores. Las células se lavaron con PBS dos veces, posteriormente, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% por 10 min, luego este fue retirado y el cultivo se lavó con agua potable, posteriormente se dejó secar al aire para realizar la tinción con el colorante cristal violeta durante 20 min a temperatura ambiente (TA), se retiró el colorante y se dejó secar al aire. El cristal violeta absorbido por las células fue cuantificado a través de su disolución con ácido

acético al 10% durante 20 min en agitación, finalmente se midió la absorbancia del colorante en un lector de microplacas Bio-Rad a 595nm. Las absorbancias fueron normalizadas a un valor de referencia con respecto al control o células sin estímulo convirtiendo estas en el 100% de células viables ⁸⁴. Los ensayos se realizaron por triplicado.

7.9.8. Determinación de nódulos de calcio (Ca²⁺)

La capacidad de mineralizar la matriz extracelular es una característica funcional de las células pertenecientes al linaje osteoblástico. Por ello, se utilizó la tinción del rojo de alizarina para determinar el grado de mineralización de la matriz extracelular de las CTM-MS cultivadas bajo diferentes condiciones.

La formación de matriz extracelular mineralizada se identificó mediante regiones marcadas de color rojo intenso correspondientes a nódulos de Ca²⁺. Después de estimular a las células con los diferentes tratamientos, se retiró el sobrenadante de las cajas de cultivo y las células se lavaron con PBS dos veces, posteriormente, se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min, luego el cultivo se lavó con agua potable, posteriormente se dejó secar al aire y se tiñeron las células con rojo de alizarina al 2% durante 20 min en un agitador Bio-Ra a 40 rpm, se retiró el colorante y las células fueron lavadas con agua potable y se dejaron secar. La formación de nódulos de Ca²⁺ fue identificada a través de cúmulos pequeños o grandes, pleomórficos entre 0.5-10µm de color rojo (depósitos de calcio característicos de diferenciación osteogénica) en el microscopio invertido Evos (Life Technologies Corp Bothell, WA, USA L1113-178C-173) con luz visible. Posteriormente el rojo de alizarina fue cuantificado mediante su disolución con isopropanol durante 20 min en agitación, finalmente se midió por la absorbancia del colorante en un lector de microplacas a 415nm. Las absorbancias se convirtieron en % de células, utilizando como referencia del 100% la absorbancia del grupo control positivo ó células estimuladas con medio osteogénico. Los ensayos se realizaron por triplicado.

7.9.9. Determinación de citocinas pro-inflamatorias

La cuantificación de los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-6 se obtuvo a partir de los sobrenadantes de las CTM-MS expuestas a los diferentes tratamientos AU (3, 6.8 y 9mg/dL) y CUM (1, 5 y 10 μ g/mL), además de un pozo suplementado con medio de diferenciación osteogénico. La comparación se hizo frente a un grupo control que no fue expuesto a ningún estímulo.

La determinación de las citocinas pro-inflamatorias se realizó mediante ensayo inmunoabsorbante ligado a enzima (ELISA) tipo sándwich, se utilizaron 50 μ L de los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se emplearon los estuches comerciales Human IL-1 beta Standard ABTS ELISA Development Kit, Peprotech (catálogo #900-K95), la IL-6 se determinó con el Human IL-6 Standard ABTS ELISA Development Kit (catálogo #900-K16).

Un anticuerpo de captura (anticuerpo específico anti-hIL-1 β y anti-hIL-6) fue inmovilizado toda la noche en los pocillos de las placas de 96 pozos (Nest Cat: 515201), tras su adición en los pocillos e incubación a TA, se procedieron a realizar los lavados, para lo cual se aspiraron los pozos para extraer el anticuerpo de captura y se lavó la placa cuatro veces utilizando buffer de lavado (Tween20, Sigma-Aldrich Cat: 9005645 + PBS1X). Se realizó un bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA, Biowest, USA) al 1% (p/v) en PBS, la placa se incubó a TA durante 1 h. Se aspiraron los pozos y se lavó la placa cuatro veces por pocillo con buffer de lavado. Se colocaron las muestras y el patrón de referencia (IL-1 β , IL-6) por duplicado.

La placa se incubó durante 2 h a TA. Se aspiraron los pozos y se lavó la placa cuatro veces con buffer de lavado para eliminar los antígenos no unidos. Se adicionó el anticuerpo de detección (anticuerpo específico para IL-1 β , IL-6) el cual se incubó a TA durante 2 h. Se aspiraron los pozos y fueron lavados al menos cuatro veces, después el anticuerpo de detección fue marcado con avidina peroxidasa a una dilución 1:2000 y se realizó una incubación de 30 min a TA, al término de este tiempo se aspiraron los pozos y se lavó la placa cuatro veces, se adicionó, como sustrato cromogénico de la avidina peroxidasa, el 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-

sulfonic acid) ABTS (Sigma-Aldrich cat. A9941), el cual se incubó de 5 a 10 min a TA hasta el desarrollo de color. Se monitoreó el desarrollo de color con un lector de placas de ELISA, (Bio-Rad jMark 10176 Laboratories, Inc. USA) a una longitud de onda de 415nm. Los resultados obtenidos fueron referidos a una curva patrón de IL-1 β , IL-6 respectivamente, expresados en pg/ μ L.

7.9.10. Extracción y cuantificación de proteínas totales

La extracción de proteínas se realizó a partir de proteína total aislada de 250,000 CTM, con el amortiguador de lisis de M-PER (Pierce Chemical, Rockford, Illinois), suplementado con inhibidor de proteasas (Complete, Roche Applied Science, Indianapolis, USA), inhibidor de fosfatasa (PhosphoStop, Roche Applied Science, Indianapolis, USA), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich, USA) y ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich, USA). Las CTM se sonicaron con el Ultrasonicador Cleaner (Tmishion, China) por 15 min y posteriormente se centrifugaron a 15,000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo la proteína total se alícuotó y almaceno a -80°C.

Por lo que se refiere a la cuantificación de proteínas se realizó a partir de una alícuota de 5 μ l del reactivo de Bradford 1X listo para usarse (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) y usando albumina sérica bovina (Biowest the serum specialist, Naullié, France) para elaborar una curva patrón de 25 a 2000 μ g/ml, se incubo por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

7.9.11. Determinación de la expresión proteica RUNX2 en CTM-MS

A partir de 20 μ g de proteína total se les agrego amortiguador de muestra comercial Laemmli Sample Buffer 2X (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) en una relación 1:1. Posteriormente se desnaturalizaron por 7 min a 80°C y se separaron mediante una electroforesis en geles prefabricados de poliacrilamida al 10% (Bio-Rad

Laboratories, Inc., USA) en un amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) al 1X, usando 100 V durante, 25 mA por 90 min. En seguida, la proteína fue transferida a una membrana de nitrocelulosa durante 10 min, 25 V a 1 A es un equipo Trans-blot Turbo System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Las membranas fueron bloqueadas por 1 h en agitación constante con BSA al 5% en PBS-Tween 0.1% por 15 min cada lavado, posteriormente los blots fueron incubados por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa anti-mouse IgG (Abcam, USA) a una dilución de 1:10,000 en una solución de MSA al 2% en PBS-Tween. Después se lavaron con PBS-Tween cuatro veces durante 15 min cada lavado. La inmunodetección se detectó usando el reactivo de Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation, USA) en una dilución 1:1.

Los blots fueron visualizados por exposición a placas radiográficas CL-XPOSURE (Pierce Chemical, Rockford Illinois) y escaneadas con el Software VueScan (HP DeskJet 2135, Corea). Finalmente el análisis densitométrico se realizó con el Software Image J versión 1.53e (National Institute of Health, USA) y se utilizó la expresión de la β -actina como proteína constitutiva.

7.10. Análisis estadísticos

Cada experimento se realizó al menos en tres eventos independientes utilizando células provenientes de distintos pacientes. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism 9.3.1. (471). Estadística inferencial se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un *post hoc* de Dunnet para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre las variables de: viabilidad celular, formación de nódulos de calcio, inflamación y expresión de Runx2. El nivel de significancia considerado fue $P < 0.05$. Se utilizó estadística descriptiva y la frecuencia.

A continuación, se muestra el diagrama general del trabajo con las técnicas, condiciones y algunos materiales utilizados para el desarrollo de este trabajo (Figura 15).

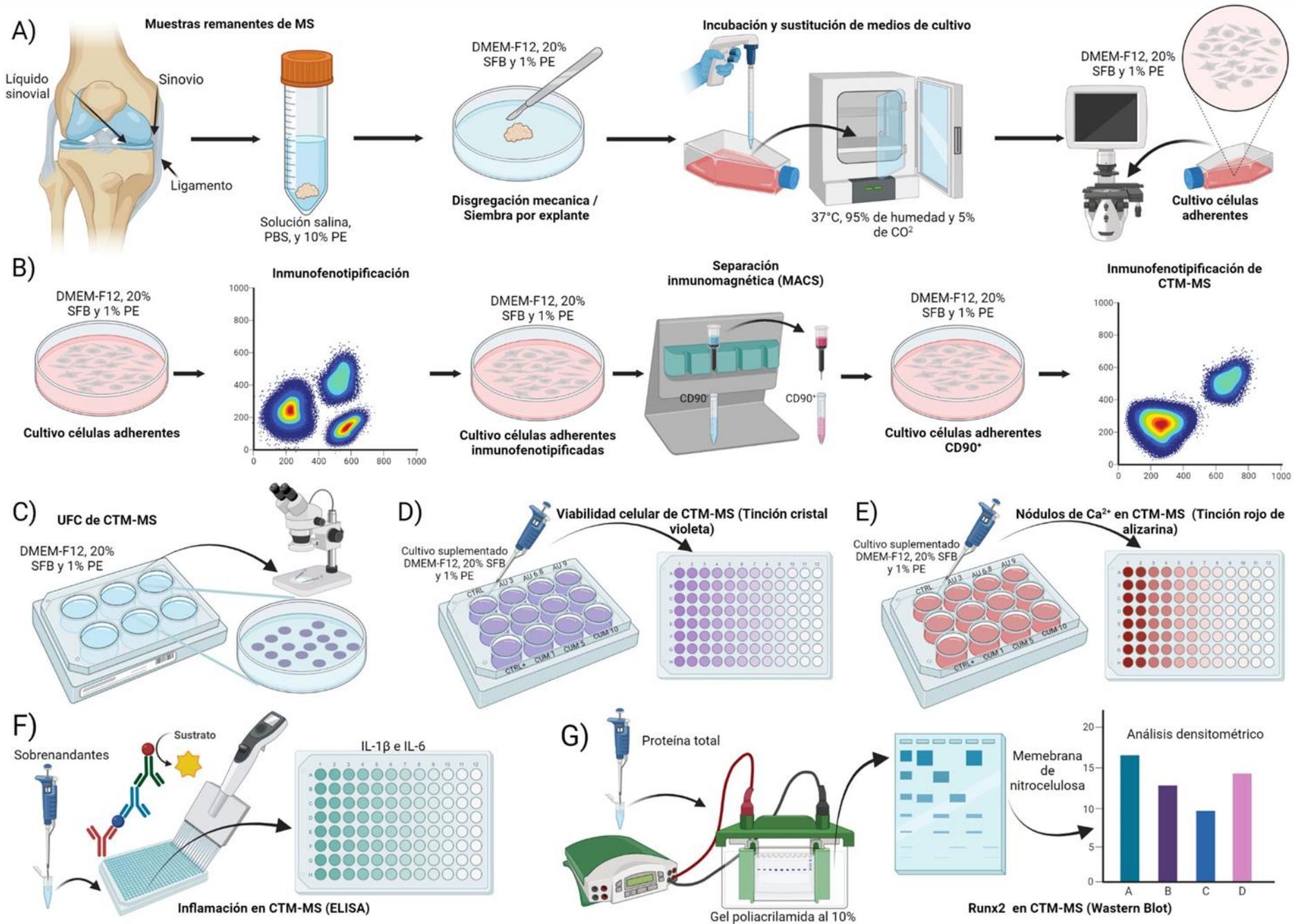


Figura 15. Aislamiento y osteodiferenciación de CTM-MS (Metodología general del estudio). (A) Los cultivos primarios de MS obtenidos de pacientes sometidos a artroscopía por lesión de ligamento cruzado anterior se obtuvieron mediante disgregación mecánica. Las células adherentes fueron observadas por microscopia y cultivadas con medio DMEM-F12, 20% SFB y 1% P/E. (B) En la inmunofenotipificación de células se utilizaron marcadores CD90, CD105, CD73, CD117, CD166, CD271, CD31, así como CD14, CD34 y CD45 detectados a través de citometría de flujo. Se aislaron las células CD90+ mediante columnas de separación con perlas magnéticas, estas fueron cultivadas hasta alcanzar su confluencia y fueron inmunofenotipificadas por citometría de flujo como CTM-MS. (C) Se evaluó la capacidad de formar colonias (UFC) por parte de las CTM-MS obtenidas después de la separación inmunomagnética y se identificaron mediante la tinción de cristal violeta observadas por microscopia. (D) Las CTM-MS se expusieron a distintas dosis de AU (3, 6.8 y 9 mg/dL) y CUM (1, 5 y 10 μ g/mL) durante 3 semanas se evaluaron cambios morfológicos a través de microscopía, se evaluó la viabilidad celular mediante incorporación del colorante cristal violeta, (E) se evaluó la mineralización de la matriz extracelular mediante regiones marcadas de color rojo intenso correspondientes al colorante rojo de alizarina, las mediciones de color se realizaron mediante un lector de placas. (F) Se determinaron marcadores de inflamación (interleucinas) de los sobrenadantes de las CTM-MS por ELISA. (G) La expresión proteica de Runx2, un factor implicado en la diferenciación a osteoblastos se cuantificó a partir de la técnica de Western-blot y se realizó un análisis densitométrico de los blots (Figura diseñada para propósito del presente trabajo, con el software Biorender).

8. RESULTADOS

Se incluyeron en total 6 muestras de MS para el aislamiento de las células, de las cuales 4 pacientes fueron masculinos y 2 femeninos, la media de edad fue de 41 ± 13 años.

8.1. Aislamiento de las CTM-MS

En los cultivos primarios se observaron células redondas, pequeñas, no adherentes y algunas adherentes en las 48 h posteriores al aislamiento celular; sin embargo, algunas células no adherentes fueron descartadas después del primer cambio de medio.

Las células derivadas de la MS cambiaron su morfología dos días después de su aislamiento, en el que una mayor población de células adherentes fue observada, no obstante, estas presentaron características morfológicas diversas, incluso a los 4 días de cultivo. Algunas de las células derivadas de la MS presentaron un fenotipo fibroblástico, células alargadas, fusiformes, con prolongaciones citoplasmáticas irregulares, y crecimiento en grupos; también se observó una población heterogénea de células con morfología de oligo y ploidendrítica. Las observaciones microscópicas mostraron que las células de tipo fibroblástico se convirtieron en el subtipo predominante en el cultivo después de 10 - 15 días (Figura 16).

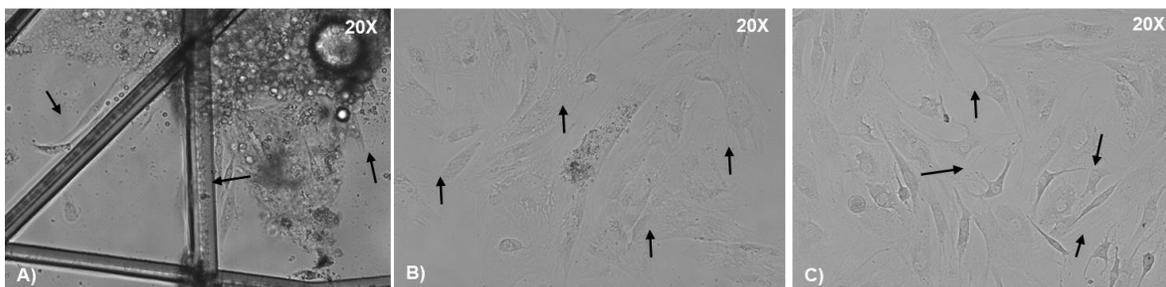


Figura 16. Morfología de las células derivadas de MS. A) Células adherentes en el cultivo primario, las flechas muestran tejido de MS y células. B) Cultivo primario a 10 días de aislamiento y del mantenimiento del cultivo.

C) Subcultivo (células en segundo pase), las flechas muestran la morfología redonda, células alargadas, fusiformes, con prolongaciones citoplasmáticas irregulares. Imágenes obtenidas con microscopía de transmisión, objetivo 20X y representativas de uno de seis pacientes diferentes (n=6).

8.2. Caracterización inmunofenotípica de las células aisladas de MS

El inmunofenotipo se analizó en células derivadas de la MS en segundo pase a través de la expresión de marcadores asociados o específicos de las mismas por citometría de flujo. Las células mostraron una expresión de CD90 de $77 \pm 17\%$, CD105 de $73 \pm 15\%$, CD73 de $71 \pm 18\%$ y CD117 de $40 \pm 15\%$. En menor proporción se cuantificó la expresión de CD14 de $2 \pm 1\%$, CD34 de $2 \pm 1\%$, CD45 de $1 \pm 1\%$, CD166 de $3 \pm 1\%$, CD271 de $4 \pm 8\%$ y CD31 de $2 \pm 2\%$ (Tabla 3).

Tabla 3. Marcadores celulares en células derivadas de la MS.

<i>Marcadores</i>	<i>Expresión</i>
<i>CD90</i>	77.30 ± 16.46
<i>CD105</i>	73.20 ± 14.81
<i>CD73</i>	70.94 ± 17.83
<i>CD117</i>	40.38 ± 14.79
<i>CD14</i>	1.90 ± 1.12
<i>CD34</i>	1.90 ± 1.16
<i>CD45</i>	1.18 ± 0.86
<i>CD166</i>	2.72 ± 0.85
<i>CD271</i>	4.36 ± 7.60
<i>CD31</i>	1.68 ± 1.94

La positividad de los marcadores celulares para el caso de CD90, CD105 y CD73 fue $\geq 70\%$. En el caso del CD117 $\geq 40\%$, CD166 y CD271 $\leq 5\%$. En cuanto a CD14, CD34, CD45 y CD31 fue $\leq 2\%$. La expresión de todos los marcadores mencionados anteriormente fue similar entre todas las muestras de los distintos pacientes. A continuación, mostramos una imagen representativa de los histogramas de cada marcador.

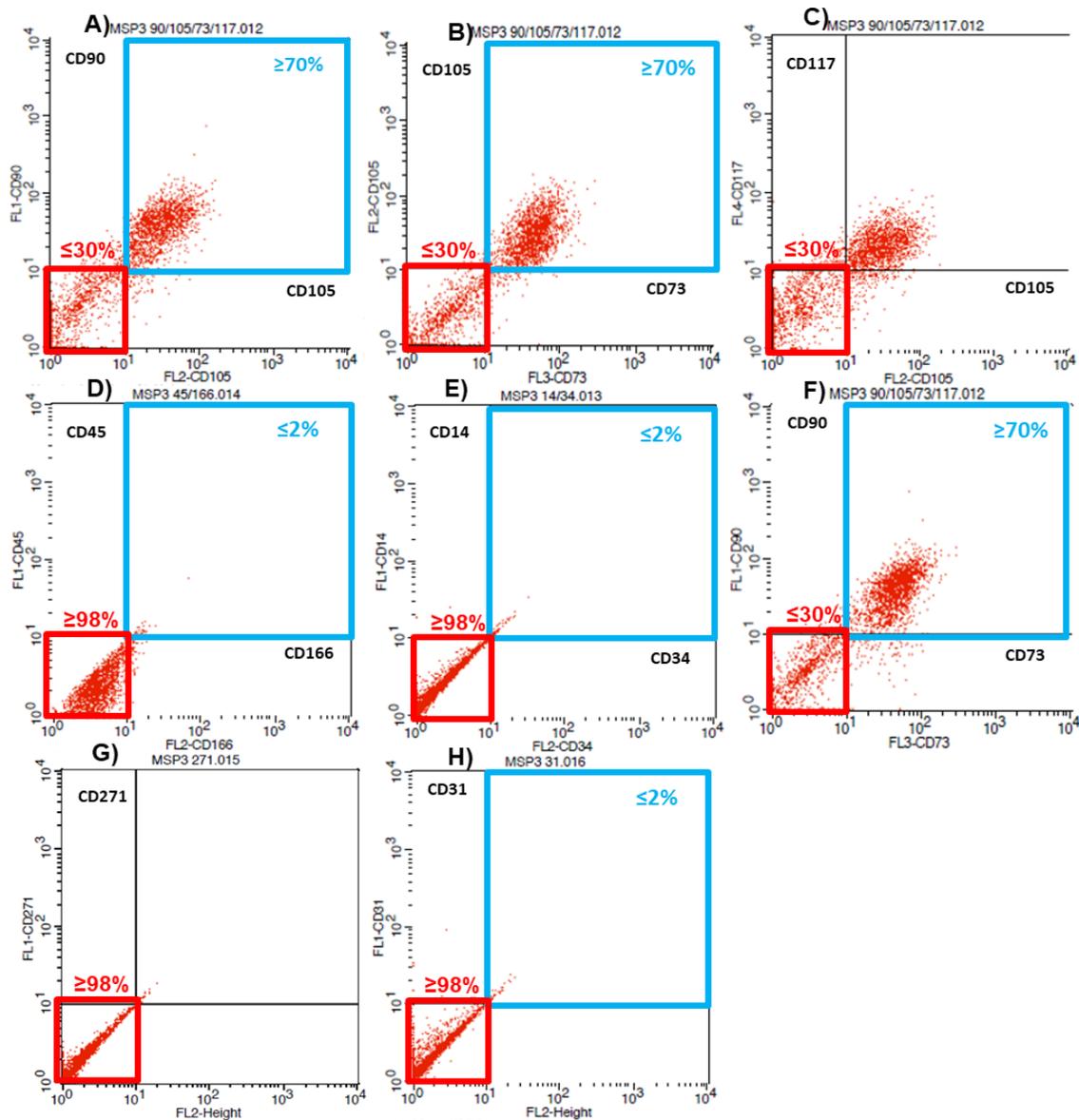


Figura 17. Histogramas de la expresión de marcadores de superficie de CTM-MS por citometría de flujo. Las células de MS mostraron una expresión importante de CD90 (A), CD105 y CD73 (B) (mesenquimal) y una menor expresión de CD117 (C), CD34 y CD14 (E), CD45 (hematopoyético) y CD166 (D), CD271 (G) (neural), CD31 (H) (endotelial). Histogramas representativos de uno de cinco experimentos independientes (n=5).

El porcentaje (%) de cada marcador en las CTM_MS y su desviación estándar (DE) se muestran en la figura 18.

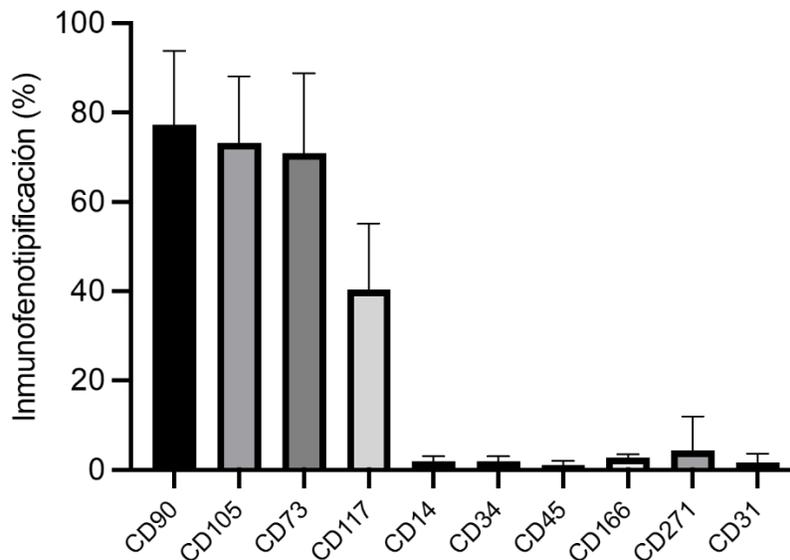


Figura 18. Inmunofenotipificación de células derivadas de MS. Las células de MS mostraron una expresión significativa de CD90, CD105 y CD73 (mesenquimal) y una menor expresión de CD117, CD34, CD45 (hematopoyético), CD271 (neural), CD31 (endotelial). Los datos representan el promedio \pm DE de cinco experimentos independientes (n=5).

8.3. Separación inmunomagnética de células CD90⁺

La subpoblación de células CD90⁺ fue aislada del resto a través de la separación inmunomagnética. Se emplearon $1,983,000 \pm 884,057$ de células en tercer pase. Posterior a la separación por la columna los conteos celulares con azul de tripano estimaron que se aislaron $1,860,000 \pm 922,395$ células CD90⁺ (Figura 19).

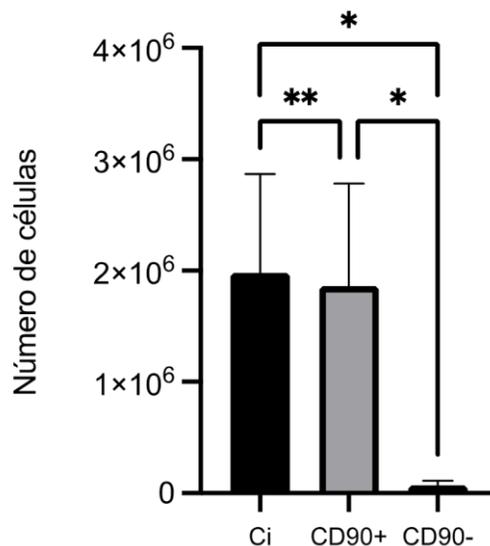


Figura 19. Separación inmunomagnética de células CD90⁺ provenientes de MS. Células CD90⁺ de MS aisladas mediante separación inmunomagnética. Los datos representan el promedio \pm DE de cinco experimentos independientes (n=5). *Ci = células iniciales

Las células de MS mostraron ser mayor número de células CD90⁺ que CD90⁻ (Tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de células CD90⁺ aisladas por columna inmunomagnética.

<i>Células de MS</i>	Número de células
<i>Células Totales</i>	1,983,000 \pm 884,057
<i>Células CD90⁺</i>	1,860,000 \pm 922,395
<i>Células CD90⁻</i>	72,000 \pm 40,866

Después del cultivo de las células CD90⁺, la morfología celular se observó más homogénea, las células se observaron con forma de huso y más uniformidad en la población; al obtener una confluencia del 80% se obtuvo una monocapa con morfología fibroblastoide (Figura 20).

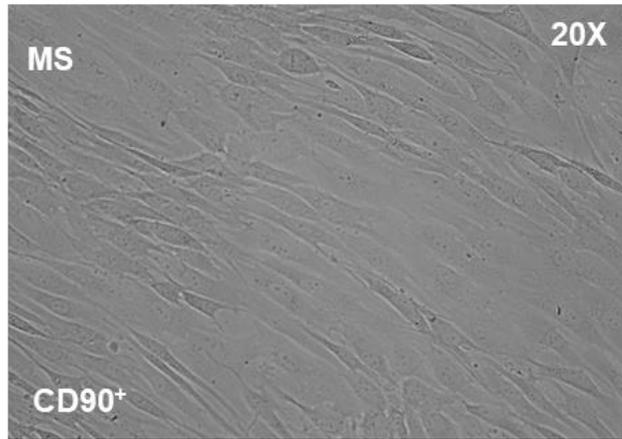


Figura 20. Morfología de las células CD90⁺. Morfología fibroblastoide, las células se observaron con forma de huso. Microscopia óptica de cultivo de células CD90⁺ posterior a la separación inmunomagnética. Cultivo en 5^o pase, 16 días posteriores a su separación (Objetivo 20x). Imagen representativa de uno de cinco experimentos independientes (n=5).

8.4. Inmunofenotipificación de la subpoblación de células CD90⁺

El análisis de la expresión de marcadores específicos para caracterizar la subpoblación de células CD90⁺ como CTM-MS fue realizado por citometría de flujo (Figura 19).

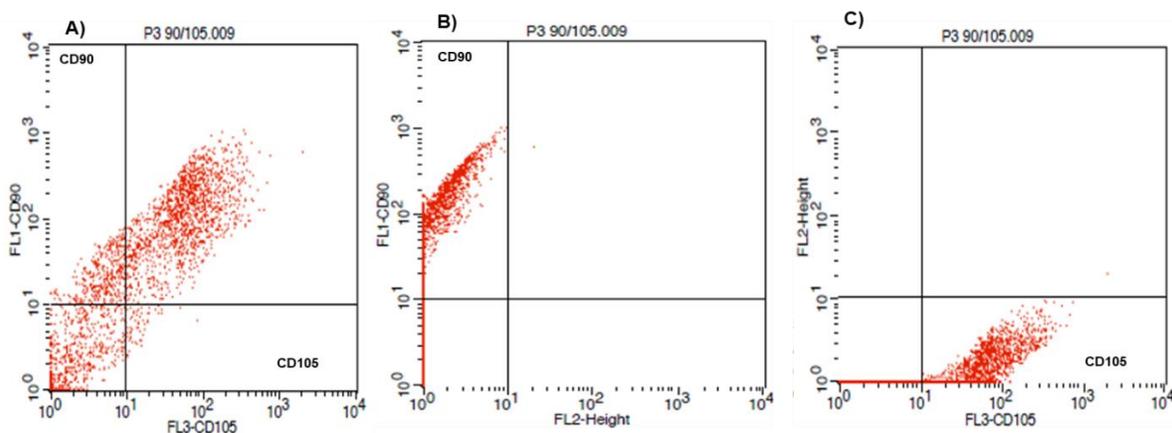


Figura 21. Histogramas de marcadores de células separadas inmunomagnéticamente. Las células de MS separadas por columnas recubiertas con CD90⁺ mostraron una expresión significativa de CD90 y CD105 (mesenquimal).

La citometría de flujo demostró que las células derivadas de la MS y después de la separación inmunomagnética fueron positivas para los antígenos CD90 ($53 \pm 8\%$) y CD105 ($52 \pm 18\%$) (Figura 22 y Tabla 5).

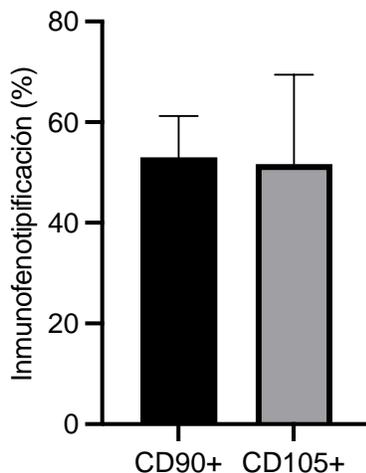


Figura 22. Caracterización de la subpoblación de células CD90⁺. La expresión de marcadores por citometría de flujo en células derivadas de MS después de ser separadas inmunomagnéticamente mostraron una expresión de CD90 y CD105 (mesenquimal). Los datos representan el promedio \pm DE de cinco experimentos independientes (n=5).

Tabla 5. Cuantificación de células CD90⁺ y CD105⁺.

<i>Marcadores</i>	<i>Expresión</i>
<i>CD90</i>	53.03 \pm 8.17
<i>CD105</i>	51.73 \pm 17.69

8.5. Evaluación de las UFC por las CTM-MS

Se analizaron las UFC para cada uno de los cultivos de los distintos pacientes, en la mayoría de todos los cultivos se identificaron UFC, únicamente en uno de ellos no se observaron UFC.

Se identificaron UFC bien definidas con valoración en color violeta, las cuales contienen células en múltiples agrupaciones (Figura 23), se identificaron 53 ± 4 UFC (Figura 24).

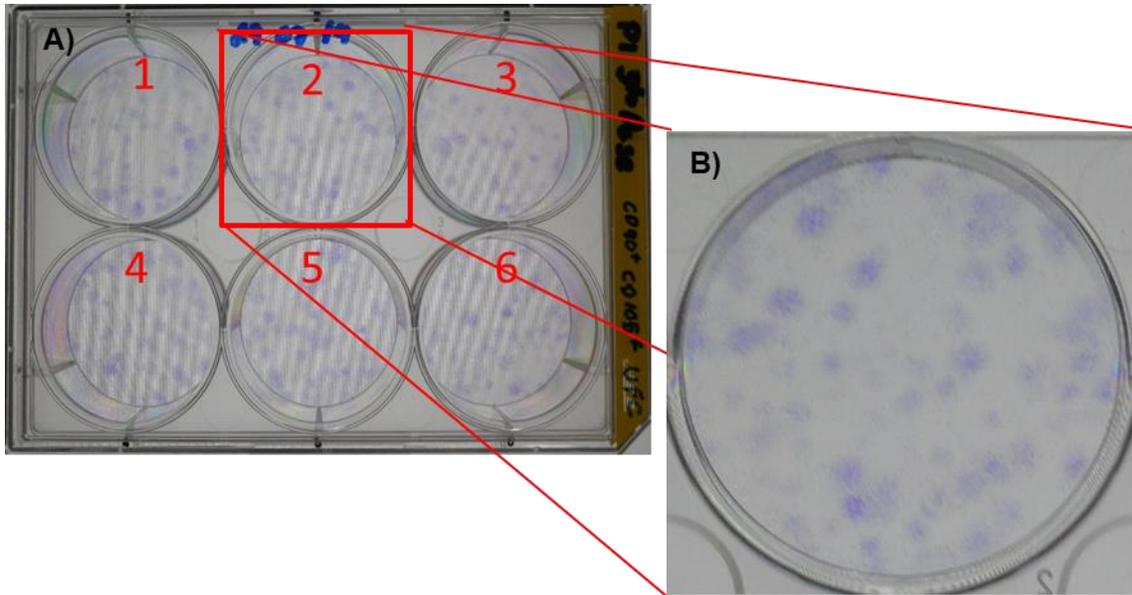


Figura 23. UFC de CTM-MS. A) Cultivos de CTM-MS con formación de UFC en cajas de 6 pozos. B) Ampliación del pozo #2, UFC en color violeta, imagen representativa de uno de cinco experimentos independientes ($n=5$).

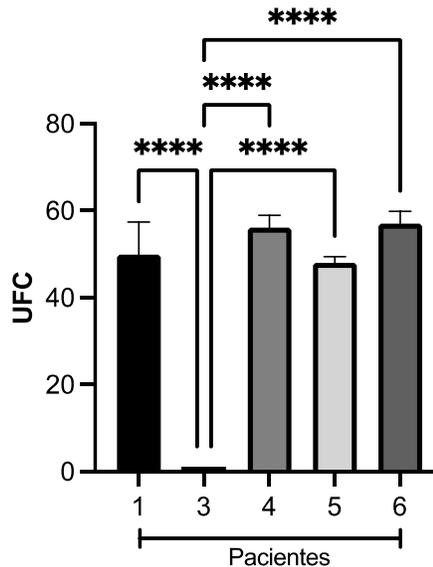


Figura 24. Cuantificación de UFC de CTM-MS. UFC de los diferentes pacientes. Los datos representan el promedio \pm DE de cinco experimentos independientes ($n=5$). (**** $p < 0.00001$ vs. todos los pacientes estudiados)

En los cultivos provenientes del paciente No. 1 se cuantificaron 50 ± 8 UFC, en los del paciente 3 no hubo desarrollo de UFC, en el paciente 4: 56 ± 3 , del 5: 48 ± 1 y finalmente del paciente 6: 57 ± 3 (Tabla 6).

Tabla 6. UFC de CTM-MS por cada MS de distintos donadores.

<i>Pacientes</i>	Número de UFC
<i>P1</i>	49.88 ± 7.47
<i>P2</i>	0.00 ± 0.00
<i>P3</i>	56.00 ± 2.83
<i>P4</i>	48.00 ± 1.41
<i>P5</i>	57.00 ± 2.83

P1: UFC aisladas del paciente 1 del protocolo. P3: UFC derivadas del paciente No.3. P4: UFC derivadas del paciente No. 4. P5 y P6: UFC provenientes de los cultivos de los donadores No. 5 y No. 6, respectivamente.

8.6. Efecto del AU y de los CUM en la viabilidad de las CTM-MS

Para investigar los efectos de las diferentes concentraciones de AU y CUM en la viabilidad de CTM-MS se utilizó el ensayo incorporación del colorante cristal violeta, el cual nos permitió estimar el número de células viables en cada grupo experimental, se utilizó medio de inducción osteogénica como un control positivo de diferenciación.

En cada grupo de estudio la densidad celular fue la misma. La morfología de las células fue de huso, típica de los fibroblastos. Los diferentes estímulos con los que las células fueron expuestas durante 15 días no afectaron la morfología de las células (Figura 25).

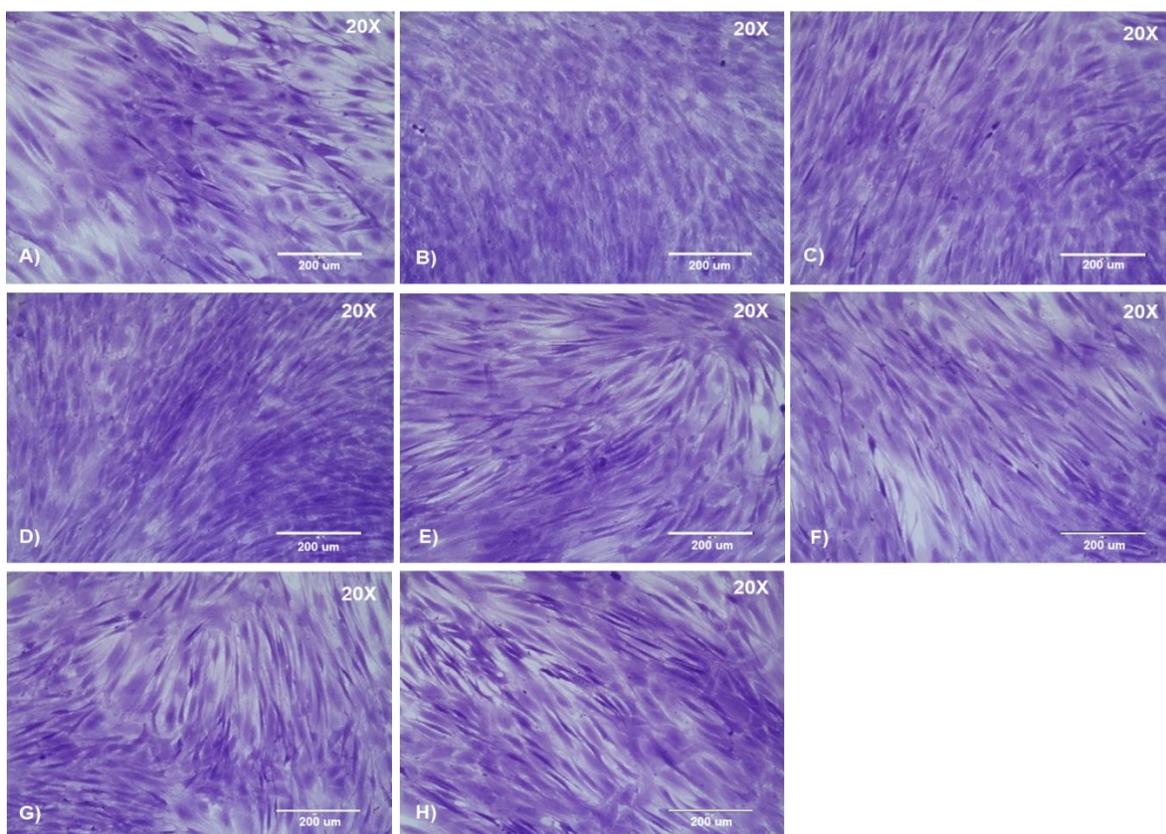


Figura 25. Morfología de CTM-MS a diferentes concentraciones de AU y CUM. Microscopía óptica de las CTM-MS cultivadas con AU y CUM A) Control, B) 3 mg/dL de AU, C) 6.8 mg/dL de AU, D) 9 mg/dL de AU, E) 1 µg/mL de CUM, F) 5 µg/mL de CUM, G) 10 µg/mL de AU y H) Células con medio de inducción osteogénico (Objetivo 20x). Imágenes representativas de uno de cinco experimentos independientes (n=5).

El % de células incrementó significativamente un 38 ± 15 y $19 \pm 5\%$ cuando estas recibieron medio de cultivo suplementado con AU a las concentraciones de 3 y 6.8 mg/dL respectivamente, comparadas con el 100% de viabilidad del control. La concentración de 9 mg/dL de AU decreció un $7 \pm 36\%$ respecto al control. Los CUM a la dosis de 5 µg/mL incrementaron la viabilidad de las células en un $8 \pm 13\%$, asimismo, las células expuestas a 1 µg/mL y 10 µg/mL de cristales tuvieron un ligero incremento en su viabilidad del 4 ± 11 y $7 \pm 11\%$ respectivamente; sin embargo, estos cambios no fueron significativos con respecto al control. Las células expuestas al medio de diferenciación osteogénico mostraron incrementos significativos en la viabilidad celular con respecto al control en un $94 \pm 30\%$. (Tabla 7 y Figura 26).

Tabla 7. Viabilidad celular de CTM-MS estimuladas con AU, CUM y medio osteogénico.

Tratamientos	% de células viables
<i>Control</i>	100,0 ± 0,00
<i>AU 3 mg/dL</i>	138,6 ± 14,54
<i>AU 6.8 mg/dL</i>	119,4 ± 5,32
<i>AU 9 mg/dL</i>	93,40 ± 36,38
<i>CUM 1 µg/ml</i>	104,0 ± 10,63
<i>CUM 5 µg/ml</i>	108,6 ± 12,70
<i>CUM 10 µg/ml</i>	107,2 ± 11,17
<i>Medio Osteogénico</i>	194,0 ± 29,49

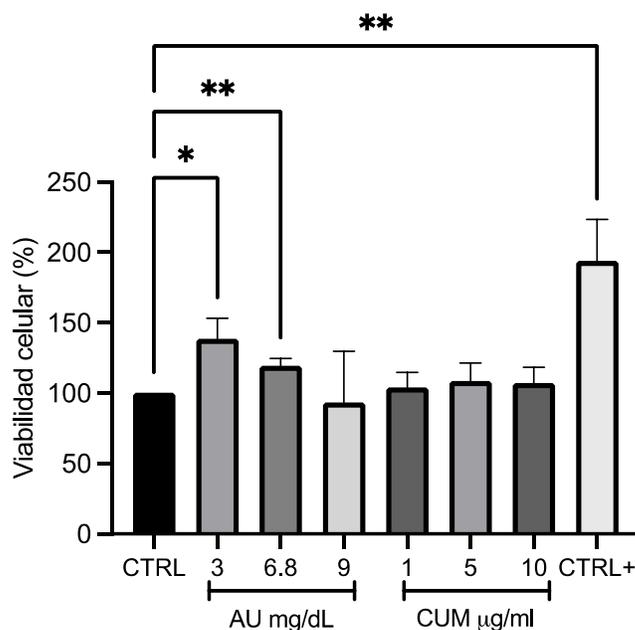


Figura 26. Viabilidad celular de CTM-MS a diferentes concentraciones de AU, CUM y medio osteogénico. La viabilidad celular se observó incrementada en los tratamientos con AU 3 y 6.8 mg/dL, así como en los cultivos suplementados con medio de diferenciación osteogénico. Los datos representan el promedio ± DE de cinco experimentos independientes (n=5). (*p<0.05 vs. Control, **p<0.001 vs. Control)

8.7. Efecto del AU y de los CUM en la formación de nódulos de calcio (Ca²⁺) en CTM-MS

En la figura 25 se observan CTM-MS cultivadas durante 21 días con diferentes estímulos. En el caso del control (Figura 27-A) se observó una menor cantidad de nódulos mineralizados (color rojo) con respecto al grupo de células expuestas al medio de diferenciación osteogénico (control positivo), en las CTM-MS estimuladas con AU a la concentración de 3 mg/dL (Figura 27-B) se observa una mineralización más intensa que en el grupo control (Figura 27-A) y casi similar al control positivo. En el caso de las células estimuladas con AU 6.8 mg/dL (Figura 27-C) y AU 9 mg/dL (Figura 27-D), se observó una escasa mineralización debido a la poca intensidad del color rojo presente en los cultivos con respecto al control positivo. Esta coloración se vio similar grupo control (Figura 27-A).

En las células expuestas a CUM 1 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL (Figura 27-E, F y G respectivamente) se observó una menor cantidad de nódulos mineralizados (color rojo) con respecto del control positivo (Figura 27- H) mostraron una coloración roja, casi nula, la cual fue similar a lo observado en el control (Figura 27-A)

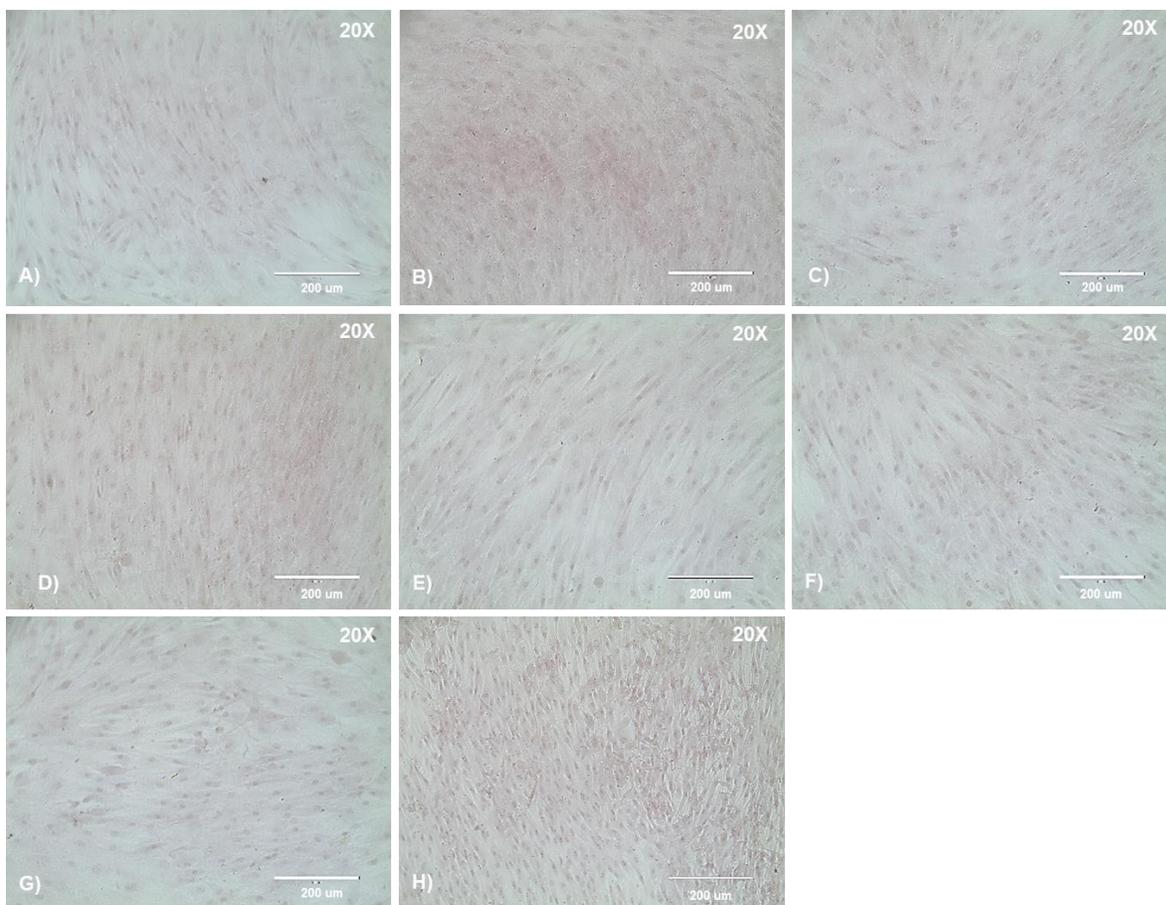


Figura 27. Efecto del AU y de los CUM en la formación de nódulos de calcio CTM-MS. A) Control DMEMF12, B) AU 3 mg/dL, C) AU 6.8 mg/dL, D) AU 9 mg/dL, E) CUM 1 µg/mL, F) CUM 5 µg/mL, G) CUM 10 µg/mL y H) Células con medio de inducción osteogénico. Microscopía óptica de cultivo celular en donde los nódulos de calcio de las células se observan teñidos de color rojo por su afinidad al colorante rojo de alizarina fotografías tomadas con el objetivo x, representativas de uno de cinco experimentos independientes.

En el caso de medio osteogénico (control positivo de diferenciación) regiones rojas fueron cuantificadas y normalizadas como 100% de nódulos de calcio o de mineralización. En las células expuestas a CUM se observó y se cuantificó una formación de nódulos menor con respecto al control positivo, utilizando 1 µg/mL de CUM durante 21 días de estímulo se detectó un $2 \pm 2\%$ de mineralización, con la dosis de 5 µg/mL de CUM, se cuantificó un $5 \pm 3\%$ y con la dosis más alta 10 µg/mL se detectó un $3 \pm 2\%$. Los experimentos con AU a las concentraciones de 3, 6.8 y 9 mg/dL también mostraron una formación de nódulos de calcio menor que el control

positivo; en las células cultivadas con esas dosis de AU la cuantificación de la mineralización fue $4 \pm 2\%$, $5 \pm 3\%$ y $5 \pm 4\%$, respectivamente. En el grupo de células que no recibieron estímulo (control) se observó un menor % de nódulos de calcio teñidos con rojo de alizarina el cual fue $2 \pm 1\%$ (Tabla 8 y Figura 28).

Tabla 8. Mineralización de nódulos de calcio en CTM-MS estimuladas con AU, CUM y con medio osteogénico.

Tratamientos	% de nódulos de calcio
<i>Control +</i>	$100,0 \pm 0,00$
<i>AU 3 mg/dL</i>	3.6 ± 1.94
<i>AU 6.8 mg/dL</i>	5.2 ± 2.95
<i>AU 9 mg/dL</i>	4.8 ± 3.63
<i>CUM 1 $\mu\text{g/ml}$</i>	2.0 ± 1.87
<i>CUM 5 $\mu\text{g/ml}$</i>	5.0 ± 3.16
<i>CUM 10 $\mu\text{g/ml}$</i>	2.6 ± 1.51
<i>Control</i>	1.8 ± 1.09

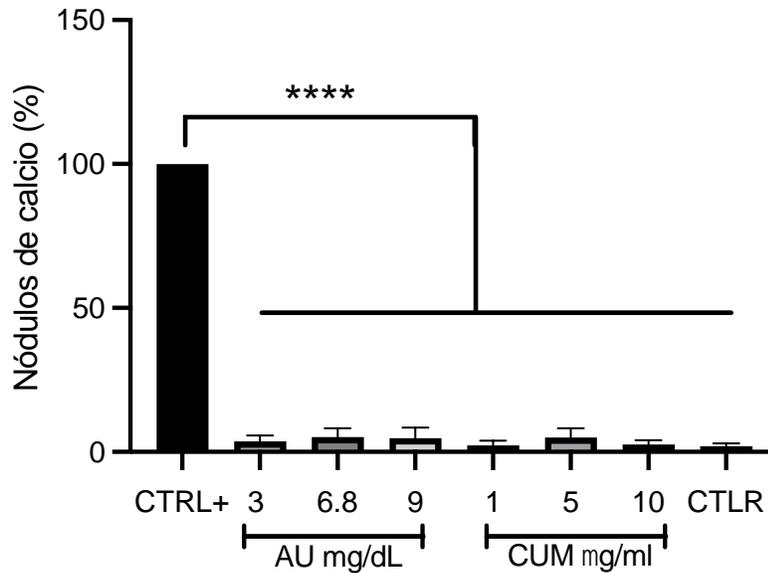


Figura 28. Formación de nódulos de calcio en CTM-MS a diferentes concentraciones de AU, CUM y medio osteogénico. La formación de nódulos de calcio se cuantificó y se observó elevada en el control positivo (medio osteogénico), en los cultivos suplementados con AU y CUM el efecto es nulo, así como en el control. Los datos representan el promedio \pm DE de cinco experimentos independientes (n=5). (****p<0.00001 vs. Control +)

8.8. Efecto del AU y de los CUM en la inflamación en CTM-MS

No se detectaron niveles de IL-1 β en ninguna de las concentraciones de AU y CUM empleadas, así como en las células expuestas a medio de diferenciación osteogénico (datos no presentados).

Con respecto a IL-6, se observó una producción de 1119 ± 656 pg/mL en las células expuestas a 3 mg/dL de AU, en aquellas expuestas a 6.8 mg/dL de AU fue de 1013 ± 327 pg/mL y en células estimuladas con 9 mg/dL de AU fue de 793 ± 430 pg/mL, en todas se cuantificaron niveles menores con respecto al control (1712 ± 503 pg/mL). En cuanto a las CTM-MS estimuladas con 1 μ g/mL, 5 μ g/mL y 10 μ g/mL de CUM, los niveles detectados fueron de 930 ± 352 pg/mL, 899 ± 397 pg/mL y 1026 ± 302 pg/mL respectivamente; en células expuestas a medio de diferenciación osteogénico la producción fue de 63 ± 68 pg/mL (Figura 29).

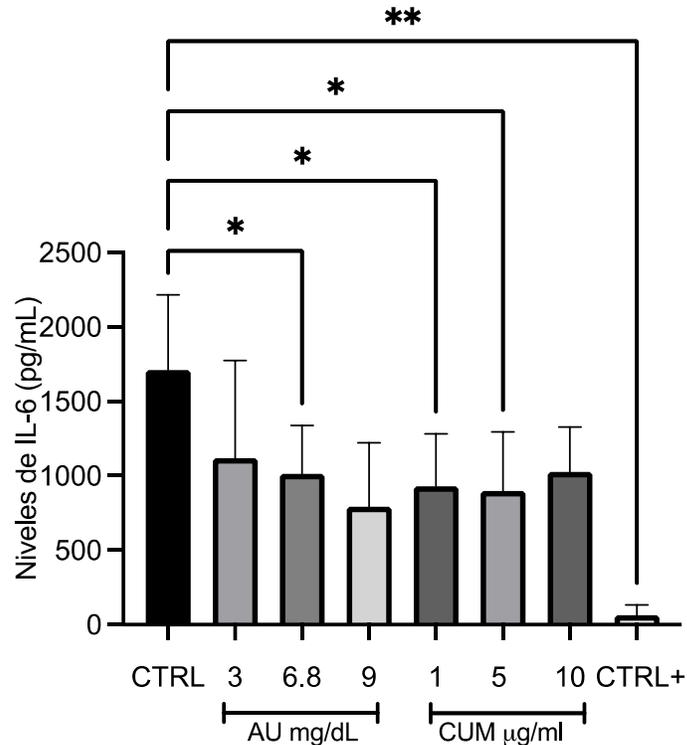


Figura 29. Efecto del AU y los CUM en la producción de IL-6 por las CTM-MS. Cuantificación de IL-6 en CTM-MS tratadas con los diferentes estímulos, AU (3, 6.8 y 9 mg/dL), CUM (1, 5 y 10 µg/mL), medio de diferenciación osteogénico (control +) y control. Los datos representan el promedio \pm DE de cinco experimentos independientes (n=5). (*p<0.05 vs. Control, **p<0.001 vs. Control).

8.9. Determinación de la expresión proteica RUNX2 en CTM-MS

El análisis por Western Blot mostro una sobreexpresión proteica de RUNX2 en las células estimuladas con el medio de diferenciación osteogénica, una expresión moderada en los tratamientos de 3, 6.8 y 9 mg/dL de AU. Las células expuestas a CUM 10 µg/mL mostraron una expresión mayor de Runx2, comparado con las dosis de 1 y 3 µg/mL de CUM. Como control de carga se empleó β -actina empleada como proteína constitutiva (Figura 30-A).

Se obtuvo una expresión proteica de Runx2 de 1.2 ± 0.12 veces en las células expuestas a 3 mg/dL de AU, en aquellas expuestas a 6.8 mg/dL de AU fue de 1.2 ± 0.20 veces y en células estimuladas con 9 mg/dL de AU fue de 1.3 ± 0.24 veces, en todas se evidenciaron un incremento con respecto del control el cual obtuvo una

expresión de 1.0 ± 0.00 veces. Se detectó una tendencia al alza en la expresión de Runx2 en células estimuladas con 9 mg/dL con respecto a las otras concentraciones de 3 y 6.8 mg/dL de AU. En cuanto a las CTM-MS estimuladas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CUM, los niveles detectados fueron de 1.2 ± 0.06 , 1.2 ± 0.11 y 1.4 ± 0.04 veces respectivamente, a las concentraciones menores de cristales 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, las cuales mostraron una tendencia al alza, incluso la expresión de Runx2 de las células expuestas a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CUM fue similar al de las células estimuladas con medio osteogénico (Figura 30-B).

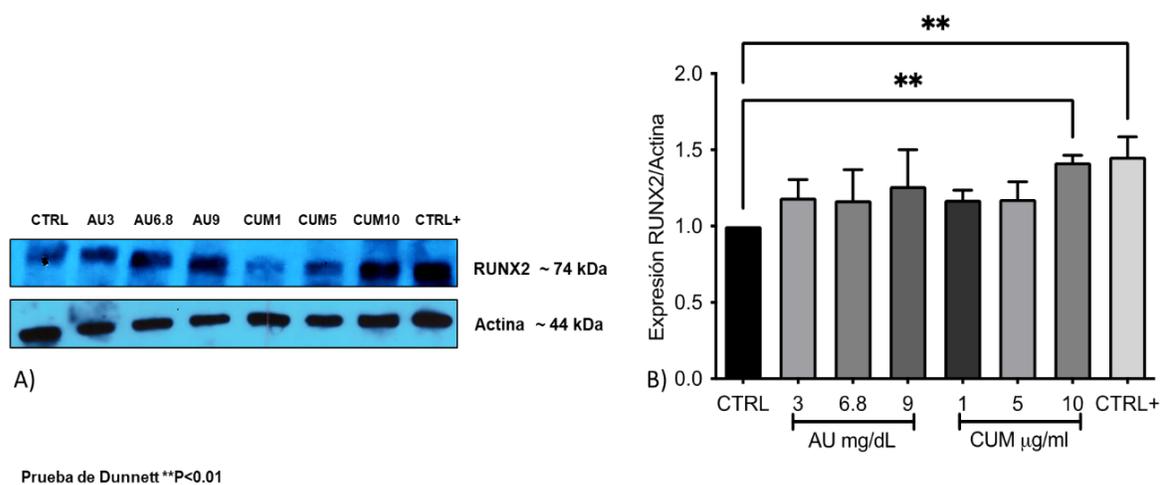


Figura 30. Efecto del AU y los CUM en la expresión proteica de RUNX2. A) Blot representativo de los niveles de expresión proteica en relación con la actina empleada como control interno. B) Gráficas que muestran el análisis densitométrico de la expresión de Runx2 en comparación con el grupo control y entre grupos. Los datos representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes (n=3). (**p<0.01 vs. Control).

9. DISCUSIÓN

Este estudio muestra la capacidad de aislar CTM provenientes de MS, las cuales exhibieron características morfológicas heterogéneas en los cultivos primarios durante los primeros días 10 - 15 días de aislamiento, sin embargo, después de varios subcultivos se obtuvieron cultivos más uniformes de células con morfología de tipo fibroblástico y con capacidad de adherencia al material plástico de la caja de cultivo, esto coincide con Arufe *et al.*, 2010⁵², Huang *et al.*, 2017³², De Bari *et al.*, 2007⁸⁵, Yao *et al.*, 2017³⁴ y Fernandes *et al.*, 2018⁸⁶, en los cuales Arufe *et al.*, 2010⁵² y Huang *et al.*, 2017³² mencionan que la morfología de las CTM-MS es similar a los STF, además tienen la capacidad de adherencia al plástico y la ausencia de marcadores leucocitarios; Yao *et al.*, 2017³⁴ informan que la MS puede proporcionar una fuente heterogénea de CTM-MS para estudios experimentales, ya que estos especímenes están constituidos diversos tejidos, incluidas las capas íntima y subintima.

Las células derivadas de la MS mostraron la expresión de marcadores específicos de troncalidad, tales como CD90⁺ (marcador de adhesión), CD105⁺, CD73⁺ (marcadores de CTM) en mayor proporción y en menor proporción marcadores como CD117⁺ (marcador endotelial), CD34⁺, CD14⁺ y CD45⁺ (marcadores de células hematopoyéticas). Las proteínas CD90, CD105 y CD73 estuvieron altamente expresados en las células derivadas de MS, siendo estas un indicador de troncalidad con posible capacidad multilinaje^{52,57,62} y la falta de expresión de CD34, CD14 y CD45 como criterio de la Sociedad Internacional de Terapia Celular para el reconocimiento de CTM.

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura^{32,34,57,62,86} en cuanto a que las CTM-MS se caracterizan por la expresión positiva de CD90, CD105, CD73 y CD44, y la expresión negativa de marcadores asociados a los linajes celulares hematopoyéticos y endotelial: CD45, CD34, CD11, CD14 y CD117.

De igual manera Sakaguchi *et al.*, 2005⁵⁸, Fernandes *et al.*, 2018⁷⁹ y Segawa *et al.*, 2009⁸⁷ demostraron que las células de MS y de medula ósea tenían marcadores

de superficie negativos para CD34 y CD45, así como positivos para CD90, CD105 y CD44.

Otros estudios han encontrado resultados similares, lo que indica que nuestras células aisladas de MS corresponden a las características típicas de las aisladas de otras fuentes, como células del cordón umbilical, medula ósea y placenta. Tales hallazgos sugieren que las células presentes en la población total de células aisladas de la MS cumplen con los criterios para MSC de la Sociedad Internacional de Terapia Celular ⁵⁴.

Con respecto a la separación celular, a las células derivadas de la MS se les realizó una clasificación celular magnéticamente o separación inmunomagnética (MACS) para enriquecer los cultivos con células CD90⁺ y asegurarnos que las células que sometieramos a procesos de diferenciación realmente fueran CTM-MS tal y como proponen Fickert *et al.*, 2003 ⁸⁸ y Harvanová *et al.*, 2011 ⁶². Con el proceso de separación inmunomagnética logramos obtener una población homogénea de células adherentes únicamente CD90⁺, en el cultivo en monocapa exhibieron apariencia de huso o morfología tipo fibroblástico. La separación inmunomagnética por columnas resultó un método rápido, barato y adecuado para aislar células provenientes de una pequeña parte de tejido sinovial o cultivos con pocas células, en un corto período de tiempo, permitiendo obtener cultivos homogéneos sin contaminación de de linajes hematopoyéticos; en comparación con métodos convencionales que requieren un mayor tiempo, células y equipos más costosos y sofisticados, etc., tal como el método de cultivo de pases largos, el método de dilución limitada ⁶¹ o el Cell Sorting el cual también comparamos, y para el cual se emplearon 7.5x10⁶ células, de las cuales se empleó una parte para el blanco, controles de compensación y la separación, obteniendo únicamente 175,000 células CD90⁺ y CD105⁺, lo cual representó un menor rendimiento.

Para confirmar que las células derivadas de MS después de ser separadas inmunomagnéticamente se trataban de CTM, se realizó un análisis de expresión de marcadores para caracterizar la subpoblación de células CD90⁺ utilizando anticuerpos monoclonales y en el cual los fenotipos obtenidos fueron CD90⁺ y

CD105⁺ característicos de CTM, nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura ^{32,34,54,57,58,62,77,79,87,89}. El hallazgo de que antes y después de la separación inmunomagnética los marcadores CD90 y CD105 se mantuvieran altamente expresados en las CTM es un indicador del éxito de la separación.

Estas células mostraron su capacidad clonogénica, por lo tanto, son adecuadas para inducir un potencial de diferenciación *in vitro* cuando se expanden con la suplementación adecuada de factores de crecimiento hacia células osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas ^{34,57,62,76,77,79,87,89}.

El AU y los CUM no afectaron negativamente la viabilidad de las CTM-MS en ninguna de las dosis evaluadas, en los tiempos en los que fueron estimuladas las células, hemos visto que dosis incrementadas de CUM como 75µg/ml y 100µg/ml en períodos cortos (24h) son capaz de decrecer la viabilidad sinovial y de inducir estrés oxidante y citocinas pro-inflamatorias como IL-1β, IL-6 y TNF-α ^{90,91}; sin embargo, en este estudio se decidieron estudiar microdosis de CUM tratando de evitar una pérdida de la viabilidad sinovial y lograr estudiar un efecto a largo plazo y adicionalmente valorar estados de hipo, normo e hiperuricemia, para evaluar el efecto a largo plazo de estas moléculas sobre las CTM. En cuanto a la inflamación, la IL-1β fue indetectable y en el caso de la IL-6, identificamos en todos los casos niveles de IL-6 menores con respecto al control, por lo que nuestro sistema no inducía inflamación en esas dosis. La gota es una enfermedad autolimitante por lo que estos niveles de inflamación pudieran interpretarse que son debido al estímulo constante de cristales y de AU en el sistema en dosis bajas, a excepción de la dosis de hiperuricemia, existen estudios en los que estas fases no inflamatorias de la gota o de la hiperuricemia se atribuyen a la existencia de estados autolimitantes de la inflamación por la presencia de reguladores como microRNAs (miR-146a) ⁹² ya que los CUM pueden estar presentes dentro de las articulaciones y tejidos extra-articulares clínicamente no inflamados, en personas con brotes agudos previos y en la gota tofácea, lo que sugiere que existen mecanismos reguladores adicionales autolimitantes de la inflamación, lo que pudiera explicar nuestros hallazgos.

En cuanto al efecto del AU y de los CUM en la mineralización ósea, la técnica de rojo alizarina es bastante sensible y no refleja de manera contundente los depósitos de calcio en nuestro modelo; estudios con AU han demostrado que en concentraciones superiores a niveles moderados pueden aumentar la densidad ósea ^{76,77}, en estos casos se evaluaron hBMSCs a las cuales se les cultivó en medio de diferenciación osteogénico suplementado con diferentes concentraciones de AU, caso contrario a nuestro estudio donde evaluamos el AU y los CUM mezclados en un medio base y sin ser agregados como suplemento a un medio de diferenciación osteogénica. No obstante, la expresión de Runx2, si mostró un resultado significativo en la dosis más alta de CUM, la de 10 µg/ml en la que se detectó sobreexpresada la proteína Runx2, al igual que en el cultivo expuesto a medio osteogénico.

En gota se sabe que medicamentos como el alopurinol reducen la apoptosis de osteoblastos e incrementa la viabilidad en modelos animales de hiperuricemia y que también reduce el riesgo de calcificación vascular mediante el decremento de Runx2 ⁹³, lo que sugiere que al estar incrementado Runx2 en células estimuladas con esta dosis lo pudieramos asociar a un indicador de calcificación en nuestro modelo.

En un estudio reciente por Naot et al. 2022 ⁹⁴ (en prensa) se determinó que los factores secretados por macrófagos estimulados con CUM redujeron la viabilidad de osteoblastos de forma dependiente de la dosis en cultivos a largo plazo (13 días); sin embargo, las dosis empleadas en este estudio se utilizaron desde los 100µg/ml hasta los 500 µg/ml, en el cual también se mostró una reducción en la mineralización y una disminución en la expresión de genes relacionados con la diferenciación de osteoblastos, como Runx2, los cuales sugieren que la erosión ósea en las articulaciones afectadas por la gota es una combinación de efectos directos e indirectos de los CUM.

Este estudio empleando CTM-MS resulta novedoso por ser uno de los primeros en emplear este tipo de células y valorar a largo plazo el efecto tanto del AU y de los CUM, estos en dosis bajas para identificar un efecto en la inducción de la mineralización, aunque la expresión de Runx2 no mostró diferencias significativas

entre las diferentes concentraciones evaluadas de AU, si se detectó una tendencia al alza en la expresión de Runx2 en las células con 9 mg/dL de AU, lo cual concuerda que a concentraciones crecientes de AU se promueve una mayor inducción osteogénica, existen algunos reportes que indican que la hiperuricemia induce la diferenciación *in vitro* de CTM derivadas de placenta en células neuronales⁹⁵.

Este estudio empleando CTM-MS resulta novedoso por ser uno de los primeros en emplear este tipo de células y valorar a largo plazo el efecto tanto del AU y de los CUM en dosis bajas para identificar un efecto en la inducción factores involucrados en la mineralización.

10. CONCLUSIÓN

Los CUM en altas dosis y en tiempos prolongados de exposición a las CTM-MS podrían modular su diferenciación osteogénica a través de la regulación de la sobreexpresión del factor Runx2; no obstante, son necesarios más estudios que corroboren estos hallazgos en los cuales se consideren otros marcadores de osteodiferenciación para esclarecer el papel de los cristales en el desarrollo de lesiones erosivas en la articulación.

11. REFERENCIAS

1. Pérez Ruiz F. Guía de práctica clínica para el manejo de la gota. Guía práctica clínica para el manejo de la gota. Published 2012. http://www.ser.es/ArchivosDESCARGABLES/Guias_Paciente/GPCGota13.pdf
2. Neogi T. Gout. *N Engl J Med*. 2011;364(5):443-452. doi:10.1056/NEJMcp1001124
3. Terkeltaub R. Update on gout: New therapeutic strategies and options. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(1):30-38. doi:10.1038/nrrheum.2009.236
4. Dang WT, Xu D, Xie WG, Zhou JG. Expression of Caspase-1 Gene Transcript Variant mRNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Primary Gout in Different TCM Syndromes. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/361607
5. Longo DL. Trastornos del metabolismo intermedio. In: Dan L. Longo, Dennis L. Kasper, J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser JL, ed. *Harrison. Principios de Medicina Interna*. 18th ed. ; 2006:3145-3220.
6. Rodwell VW, Bender DA, Kathleen MB, Kennelly PJ, Weil PA. Harper Bioquímica ilustrada, 31e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical. Published 2018. Accessed July 27, 2021. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2743#229797033>
7. PubChem Compound Summary for CID 1175, Uric acid. National Center for Biotechnology Information (2022). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Uric-acid>
8. Alcaíno H, Greig D, Castro P, Verdejo H, Mellado R, García L, Díaz-Araya G, Quiroga C, Chiong M, Lavandero S. Ácido úrico: Una molécula con acciones paradójicas en la insuficiencia cardiaca. *Rev Med Chil*. 2011;139(4):505-515.

doi:10.4067/S0034-98872011000400014

9. Nishino T, Okamoto K, Kawaguchi Y, Matsumura T, Eger BT, Pai EF, Nishino T. The C-terminal peptide plays a role in the formation of an intermediate form during the transition between xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *FEBS J.* 2015;282(16):3075-3090. doi:10.1111/febs.13277
10. Antepara N. *Consenso Venezolano Sobre Ácido Úrico Como Factor de Riesgo Cardiovascular.* Vol 69. 1a ed. (Antepara N, ed.); 2016. <https://www.slan.org.ve/publicaciones/consensos/Consenso-Venezolano-Acido-Urico.pdf>
11. Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of urate transport. *Physiology.* 2005;20(2):125-133. doi:10.1152/physiol.00039.2004
12. Richette P, Bardin T. Gout. *Lancet.* 2010;375(9711):318-328. doi:10.1016/S0140-6736(09)60883-7
13. Dalbeth N, Choi HK, Joosten LAB, Khanna PP, Matsuo H, Perez-Ruiz F, Stamp LK. Gout. *Nat Rev Dis Prim.* 2019;5(1). doi:10.1038/s41572-019-0115-y
14. Johnson RJ, Sánchez-Lozada LG, Mazzali M, Feig DI, Kanbay M, Sautin YY. What are the key arguments against uric acid as a true risk factor for hypertension? *Hypertension.* 2013;61(5):948-951. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00650
15. Choi H, Mount D, Reginato A. American College of Physicians; American Physiological Society. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med.* 2005;143(7):499-516. doi:10.7326/0003-4819-143-7-200510040-00009
16. Fam AG. Gout: excess calories, purines, and alcohol intake and beyond. Response to a urate-lowering diet. *J Rheumatol.* 2005;32(5):773-777.
17. Contreras Roura J. Errores innatos del metabolismo de las purinas y otras enfermedades relacionadas. *Rev Cuba Pediatría.* 2014;84(2):197-200.

18. Díaz-Arce L C-PF. Ácido úrico: ¿Antioxidante o pro-oxidante? Su relación con la hipertensión arterial. *Panor Cuba y Salud*. 2014;9(3):42-47.
19. Carvajal C. El ácido úrico: de la gota y otros males. *Med Leg Costa Rica*. 2016;33(1):182-189.
20. Parekh BB, Vasant SR, Tank KP, Raut A, Vaidya ADB, Joshi MJ. In vitro Growth and Inhibition Studies of Monosodium Urate Monohydrate Crystals by Different Herbal Extracts Institute of Petroleum Technology , Pandit Deendayal Petroleum University Raisan , Gandhinagar 382 007 India Department of Physics , Crystal Growth. *Am J Infect Dis*. 2009;5(3):225-230.
21. PubChem Compound Summary for CID 23697816, Sodium urate. Information, National Center for Biotechnology (2022). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-urate>
22. Sancho Bueso T, Bernardino de la Serna I, García Puig J. Un paciente con hiperuricemia. *Med Integr*. 2000;35(3):100-111. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-un-paciente-con-hiperuricemia-15362>
23. Smith EUR, Díaz-Torné C, Perez-Ruiz F, March LM. Epidemiology of gout: An update. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(6):811-827. doi:10.1016/j.berh.2010.10.004
24. Keith T. Rott CAA. Gout. *Jama*. 2003;289(4):425-427.
25. Arnaldo U, Castro M, Medina R, Alejandro E, Wonderly NG, Bárbara SR, Mesa E, Luis J. Revista Cubana de Reumatología. Published online 2015:17-24.
26. Zollo A. J. *Secretos de La Medicina*. Vol 53. 4th ed. Elsevier; 2006.
27. De Sousa EB, Casado PL, Neto VM, Duarte MEL, Aguiar DP. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: Latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(5):1-6. doi:10.1186/scrt501

28. Zamudio-Cuevas Y, Hernández-Díaz C, Pineda C, Reginato AM, Cerna-Cortés JF, Ventura-Ríos L, López-Reyes A. Molecular basis of oxidative stress in gouty arthropathy. *Clin Rheumatol*. 2015;34(10):1667-1672. doi:10.1007/s10067-015-2933-y
29. Dalbeth N, Clark B, Gregory K, Gamble G, Sheehan T, Doyle A, McQueen F. Mechanisms of bone erosion in gout: a quantitative analysis using plain radiography and computed tomography. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(8):1290-1295. doi:doi:10.1136/ard.2008.094201
30. *Guía de Práctica Clínica Para El Manejo de Pacientes Con Gota*. 2020th ed.; 2020. Accessed April 7, 2022. <https://www.ser.es/wp-content/uploads/2020/07/Guia-de-Practica-Clinica-para-el-Manejo-de-Pacientes-con-Gota-1.pdf>
31. Pascual E, Andrés M, Vázquez-Mellado J, Dalbeth N. Severe gout: Strategies and innovations for effective management. *Jt Bone Spine*. 2017;84(5):541-546. doi:10.1016/j.jbspin.2016.10.004
32. Huang YZ, Xie HQ, Silini A, Parolini O, Zhang Y, Deng L, Huang YC. Mesenchymal Stem/Progenitor Cells Derived from Articular Cartilage, Synovial Membrane and Synovial Fluid for Cartilage Regeneration: Current Status and Future Perspectives. *Stem Cell Rev Reports*. 2017;13(5):575-586. doi:10.1007/s12015-017-9753-1
33. Zamudio-Cuevas Y, Plata-Rodríguez R, Fernández-Torres J, Flores KM, Cárdenas-Soria VH, Olivos-Meza A, Hernández-Rangel A, Landa-Solís C. Synovial membrane mesenchymal stem cells for cartilaginous tissues repair. *Mol Biol Rep*. 2022;49(3):2503-2517. doi:10.1007/s11033-021-07051-z
34. Yao Y, Li ZY, Zhang H, Zheng YH, Mai LX, Liu WJ, Zhang ZG, Sun YP. Synovial fluid- derived synovial fragments represent an improved source of synovial mesenchymal stem cells in the temporomandibular joint. *Int J Mol Med*. 2017;41(1):173-183. doi:10.3892/ijmm.2017.3210

35. Reina CM, Lara AR, Clavijo SR. Células madre hematopoyéticas, generalidades y vías implicadas en sus mecanismos de auto-renovación. *Rev Ciencias la Salud*. 2007;5(1):67-89.
36. Horwitz EM. Stem cell plasticity: The growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res*. 2003;34(6):600-606. doi:10.1016/j.arcmed.2003.09.006
37. Marone M, De Ritis D, Bonanno G, Mozzetti S, Rutella S, Scambia G, Pierelli L. Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: From isolation to activation. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(3):493-501. doi:10.1080/10428190290011967
38. Prósper F, Verfaillie CM. Células madre adultas. *An Sist Sanit Navar*. 2003;26(3):345-356. doi:10.4321/s1137-66272003000500002
39. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. STEM AND PROGENITOR CELLS: Origins, and Transdifferentiations. *Cell Developmental Biol*. Published online 2001:387-403. doi:10.1146/annurev.med.54.101601.152334
40. Niesler CU. Old dogmas and new hearts: a role for adult stem cells in cardiac repair? *Cardiovasc J S Afr*. 2004;15(4):184-189.
41. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: Optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem*. 2006;97(1):84-97. doi:10.1002/jcb.20546
42. De Bari C, Dell'Accio F. Mesenchymal stem cells in rheumatology: A regenerative approach to joint repair. *Clin Sci*. 2007;113(7-8):339-348. doi:10.1042/CS20070126
43. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, Tawonsawatruk T, Lazzari L, Soo C, Péault B. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(8):1353-1374. doi:10.1007/s00018-013-1462-6

44. Rodriguez-Fontan F, Chahla J, Piuuzzi NS, Payne K, Muschler GF, LaPrade RF, Pascual-Garrido C. Células madre y progenitoras para la reparación de cartílago articular. *Rev Latinoam Cirugía Ortopédica*. 2016;1(2):66-76. doi:10.1016/j.rslaot.2016.10.002
45. Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(6):893-908. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.06.004
46. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJL, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*. 2001;3(9):778-784. doi:10.1038/ncb0901-778
47. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*. 2004;6(6):543-553. doi:10.1080/14653240410005366-1
48. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*. 2004;19(6):1450-1456. doi:10.1093/humrep/deh279
49. Asakura A, Komaki M, Rudnicki MA. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*. 2001;68(4-5):245-253. doi:10.1046/j.1432-0436.2001.680412.x
50. Stanco D, Viganò M, Perucca Orfei C, Di Giancamillo A, Peretti GM, Lanfranchi L, De Girolamo L. Multidifferentiation potential of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and hamstring tendons for musculoskeletal cell-based therapy. *Regen Med*. 2015;10(6):729-743. doi:10.2217/rme.14.92
51. Li F, Tang Y, Song B, Yu M, Li Q, Zhang C, Hou J, Yang R. Nomenclature clarification: Synovial fibroblasts and synovial mesenchymal stem cells. *Stem*

52. Arufe MC, De La Fuente A, Fuentes I, De Toro FJ, Blanco FJ. Chondrogenic potential of subpopulations of cells expressing mesenchymal stem cell markers derived from human synovial membranes. *J Cell Biochem.* 2010;111(4):834-845. doi:10.1002/jcb.22768
53. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (80-).* 1999;284(5411):143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
54. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
55. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (80-).* 1997;276(5309):71-74. doi:10.1126/science.276.5309.71
56. Prado AAF, Favaron PO, da Silva LCLC, Baccarin RYA, Miglino MA, Maria DA. Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane. *BMC Vet Res.* 2015;11(1):1-13. doi:10.1186/s12917-015-0531-5
57. Hatakeyama A, Uchida S, Utsunomiya H, Tsukamoto M, Nakashima H, Nakamura E, Pascual-Garrido C, Sekiya I, Sakai A. Isolation and Characterization of Synovial Mesenchymal Stem Cell Derived from Hip Joints: A Comparative Analysis with a Matched Control Knee Group. *Stem Cells Int.* 2017;2017:8-10. doi:10.1155/2017/9312329
58. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005;52(8):2521-2529. doi:10.1002/art.21212

59. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. Published online 2003. doi:10.1016/S1063-4584(03)00167-5
60. Mizuno M, Katano H, Mabuchi Y, Ogata Y, Ichinose S, Fujii S, Otabe K, Komori K, Ozeki N, Koga H, Tsuji K, Akazawa C, Muneta T, Sekiya I. Specific markers and properties of synovial mesenchymal stem cells in the surface, stromal, and perivascular regions. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):1-11. doi:10.1186/s13287-018-0870-9
61. Djouad F, Bony C, Häupl T, Uzé G, Lahlou N, Louis-Plence P, Apparailly F, Canovas F, Rème T, Sany J, Jorgensen C, Noël D. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(6):R1304. doi:10.1186/ar1827
62. Harvanová D, Tóthová T, Šarišský M, Amrichová J, Rosocha J. Isolation and characterization of synovial mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Czech Republic).* 2011;57(3):119-124.
63. Palacios J del CA, Vivas LAA. *Técnicas Básicas En Cultivos Celulares.*; 2012. <http://books.google.com.py/books?id=4pBLLgEACAAJ>
64. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Angel Alobera Gracia M, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L, Carlos J, Titular P. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. *Med Oral Patol Cir Bucal.* Published online 2006.
65. Fan J, Varshney RR, Ren L, Cai D, Wang DA. Synovium-derived mesenchymal stem cells: A new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2009;15(1):75-86. doi:10.1089/ten.teb.2008.0586
66. Papadopoulou, AK. Papachristou, DJ. Chatzopoulos S, Pirttiniemi P, Papavassiliou A, Basdra E. Load application induces changes in the expression levels of Sox-9, FGFR-3 and VEGF in condylar chondrocytes. *Fed*

Eur Biochem Soc FEBS Lett. 2007;581(2041):6.

67. Wong M, Siegrist M, Cao X. Cyclic compression of articular cartilage explants is associated with progressive consolidation and altered expression pattern of extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 1999;18(391):9.
68. Zárata A, Saucedo R. El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR γ) es un factor de transcripción multigénico de versatilidad metabólica. *Acta Médica Grup Ángeles.* 2005;3(1):53-54.
69. Cui J, Yang N, Xu L, Lin P. Uric acid promotes neuronal differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells in a time- and concentration-dependent manner. *Neural Regen Res.* 2012;7(10):756-760. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2012.10.006
70. Mandell BF. Gota - Trastornos de los tejidos musculoesquelético y conectivo - Manual MSD versión para profesionales. Oct. Published 2020. Accessed July 27, 2021. <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-de-los-tejidos-musculoesquelético-y-conectivo/artritis-inducida-por-cristales/gota>
71. Gómez P, Regina S, Villarroel R, Rosmery M. Diagnóstico Especializado Trastorno metabólico. *Cient Cienc Medica.* 2005;8:41_43.
72. McQueen FM, Doyle A, Reeves Q, Gao A, Tsai A, Gamble GD, Curteis B, Williams M, Dalbeth N. Bone erosions in patients with chronic gouty arthropathy are associated with tophi but not bone oedema or synovitis: New insights from a 3 T MRI study. *Rheumatol (United Kingdom).* 2014;53(1):95-103. doi:10.1093/rheumatology/ket329
73. Dalbeth N, Smith T, Nicolson B, Clark B, Callon K, Naot D, Haskard DO, McQueen FM, Reid IR, Cornish J. Enhanced osteoclastogenesis in patients with tophaceous gout: Urate crystals promote osteoclast development through interactions with stromal cells. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1854-1865. doi:10.1002/art.23488

74. Chhana A, Callon KE, Pool B, Naot D, Watson M, Gamble GD, McQueen FM, Cornish J, Dalbeth N. Monosodium urate monohydrate crystals inhibit osteoblast viability and function: Implications for development of bone erosion in gout. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(9):1684-1691. doi:10.1136/ard.2010.144774
75. Chhana A, Pool B, Callon KE, Tay ML, Musson D, Naot D, McCarthy G, McGlashan S, Cornish J, Dalbeth N. Monosodium urate crystals reduce osteocyte viability and indirectly promote a shift in osteocyte function towards a proinflammatory and proresorptive state. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):208. doi:10.1186/s13075-018-1704-y
76. Liu B, Yang N, Xu L, Han Y, Li P, Ma L, Xin Y, Xian Hao X, Huang H. The Effects of Uric Acid on Bone Mesenchymal Stem Cells Osteogenic Differentiation. *J Appl Sci Eng Innov.* 2017;4(2):39-45. <http://www.jasei.org/PDF/4-2/4-39-45.pdf>
77. Li H-Z, Chen Z, Hou C-L, Tang Y-X, Wang F, Fu Q-G. Uric Acid Promotes Osteogenic Differentiation and Inhibits Adipogenic Differentiation of Human Bone Mesenchymal Stem Cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 2015;29(8):382-387. doi:10.1002/jbt.21707
78. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol Ed by John E Coligan . [et Al], Append 3.* Published online 2001. doi:https://doi:10.1002/0471142735.ima03bs21.
79. Fernandes TL, Kimura HA, Pinheiro CCG, Shimomura K, Nakamura N, Ferreira JR, Gomoll AH, Hernandez AJ, Bueno DF. Human synovial mesenchymal stem cells good manufacturing practices for articular cartilage regeneration. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2018;24(12):709-716. doi:10.1089/ten.tec.2018.0219
80. Krawetz RJ, Wu YE, Martin L, Rattner JB, Matyas JR, Hart DA. Synovial Fluid Progenitors Expressing CD90+ from Normal but Not Osteoarthritic Joints

Undergo Chondrogenic Differentiation without Micro-Mass Culture. *PLoS One*. 2012;7(8):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0043616

81. STEMCELL Technologies. Technical Manual: Human Colony-Forming Unit (CFU) Assays Using MethoCult™. 2019;(Document #28404 / Version 4.6.0).
82. Flick D, Gifford G. Methods. *J Immunol*. 1984;68(167).
83. Sánchez-Lozada LG, Lanaspa MA, Cristóbal-García M, García-Arroyo F, Soto V, Cruz-Robles D, Nakagawa T, Yu MA, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid-induced endothelial dysfunction is associated with mitochondrial alterations and decreased intracellular ATP concentrations. *Nephron - Exp Nephrol*. 2013;121(3-4):71-78. doi:10.1159/000345509
84. Krebs A, Nyffeler J, Rahnenführer J, Leist M. Corrigendum to Normalization of data for viability and relative cell function curves. *ALTEX - Altern to Anim Exp*. 2019;36(3):505. doi:10.14573/altex.1904113.
85. Gullo F, De Bari C. Prospective purification of a subpopulation of human synovial mesenchymal stem cells with enhanced chondro-osteogenic potency. *Rheumatol*. 2013;52(10):1758-1768. doi:10.1093/rheumatology/ket205
86. Fernandes TL, Kimura HA, Pinheiro CCG, Shimomura K, Nakamura N, Ferreira JR, Gomoll AH, Hernandez AJ, Bueno DF. Human synovial mesenchymal stem cells good manufacturing practices for articular cartilage regeneration. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2018;24(12):709-716. doi:10.1089/ten.tec.2018.0219
87. Segawa Y, Muneta T, Makino H, Nimura A, Mochizuki T, Ju YJ, Ezura Y, Umezawa A, Sekiya I. Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res*. 2009;27(4):435-441. doi:10.1002/jor.20786
88. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification, quantification and isolation of

mesenchymal progenitor cell from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthr Cartil.* 2003;11(11):790-800. doi:10.1016/S1063-4584(03)00167-5

89. Ogata Y, Mabuchi Y, Yoshida M, Suto EG, Suzuki N, Muneta T, Sekiya I, Akazawa C. Purified human synovium mesenchymal stem cells as a good resource for cartilage regeneration. *PLoS One.* 2015;10(6):5-9. doi:10.1371/journal.pone.0129096
90. Zamudio-Cuevas Y, Martínez-Flores K, Fernández-Torres J, Loissell-Baltazar YA, Medina-Luna D, López-Macay A, Camacho-Galindo J, Hernández-Díaz C, Santamaría-Olmedo MG, López-Villegas EO, Oliviero F, Scanu A, Cerna-Cortés JF, Gutierrez M, Pineda C, López-Reyes A. Monosodium urate crystals induce oxidative stress in human synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1):1-9. doi:10.1186/s13075-016-1012-3
91. Zamudio-Cuevas Y, Fernández-Torres J, Martínez-Nava GA, Martínez-Flores K, Ramírez Olvera A, Medina-Luna D, Hernández Pérez AD, Landa-Solís C, López-Reyes A. Phagocytosis of monosodium urate crystals by human synoviocytes induces inflammation. *Exp Biol Med (Maywood).* 2019;244(5):344-351. doi:10.1177/1535370219830665
92. Dalbeth N, Pool B, Shaw OM, Harper JL, Tan P, Franklin C, House ME, Cornish J, Naot D. Role of miR-146a in regulation of the acute inflammatory response to monosodium urate crystals. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(4):786-790. doi:10.1136/ANNRHEUMDIS-2014-205409
93. Zhao J, Wei K, Jiang P, Chang C, Xu L, Xu L, Shi Y, Guo S, Xue Y, He D. Inflammatory Response to Regulated Cell Death in Gout and Its Functional Implications. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/FIMMU.2022.888306
94. Naot D, Chhana A, Gao R, Munro JT, Cornish J, Dalbeth N. Factors secreted by monosodium urate crystal-stimulated macrophages promote a proinflammatory state in osteoblasts: a potential indirect mechanism of bone

erosion in gout. Published online May 25, 2022. doi:10.21203/RS.3.RS-1686884/V1

95. Cui J, Yang N, Xu L, Lin P. Uric acid promotes neuronal differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells in a time- and concentration-dependent manner. *Neural Regen Res.* 2012;7(10):756-760. doi:10.3969/J.ISSN.1673-5374.2012.10.006

ANEXO 1. DICTAMEN DE ACEPTACIÓN DEL PROTOCOLO



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional
de Rehabilitación
Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Comité de Investigación

"2021, Año de la Independencia"

INRLGII/CI/116/21

Ciudad de México a 12 de julio de 2021

DRA. EN C. YESSICA EDUVIGES ZAMUDIO CUEVAS
INVESTIGADOR PRINCIPAL
PRESENTE

En respuesta a la solicitud que usted amablemente envió a este Comité para la revisión del proyecto de investigación titulado: **Potencial osteogénico de los cristales de urato monosódico en células troncales mesenquimales de membrana sinovial**, le informo que el Comité de Investigación emitió el siguiente dictamen:

Estatus del proyecto:	APROBADO
Número de registro definitivo:	23/21
Investigador principal:	Yessica Eduviges Zamudio Cuevas
Investigadores Asociados:	Javier Fernández Torres Karina Martínez Flores Carlos Landa Solís Anell Olivos Meza

*Recibí original.
04/08/2021*

Es requisito informar los avances del protocolo, independientemente de la fecha de aprobación, en los meses julio y enero, en el formato F01-PR-DI-04 Avance de Protocolos de Investigación, el cual se encuentra disponible en la página electrónica del INR, así como cualquier otro asunto relacionado con el mismo.

En el caso de los protocolos que incluyan pacientes, un requisito adicional es dar cumplimiento a la Encuesta de Satisfacción de Pacientes en Protocolo, en el formato F01-PR-DI-08, que se encuentra disponible en la página del INR, en la sección de documentos ISO, en el apartado de Investigación: <http://iso9001.inr.gob.mx/Descargas/iso/Formatos/F01-PR-DI-08.doc>.

Si se trata de un protocolo con financiamiento de la industria, éste deberá contar con convenio administrativo, el cual debe ser sancionado por el área jurídica de este Instituto.

Av. Puerto Richelieu Núm. 289, Col. Arsenal de Guadalupe, CP. 14309, Alcoltlan Tlalpan, Ciudad de México. Tel: (55) 59 99 10 00 ext. 13260 www.inr.gob.mx





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

**Instituto Nacional
de Rehabilitación**
Luis Galloza Bores Espar

Comité de Investigación

"2021, Año de la Independencia"

Si se trata de un estudio clínico deberá establecer un *Plan de Mitigación del Riesgo* a los sujetos de investigación, evaluando métodos alternativos de seguridad para el seguimiento del protocolo de investigación, de acuerdo a las **Medidas extraordinarias en relación a Estudios Clínicos ante la Pandemia de COVID-19** publicadas por COFEPRIS y le sugerimos consulte en: <https://www.gob.mx/cofepris/es/articulos/medidas-extraordinarias-en-relacion-a-estudios-clinicos-ante-la-pandemia-de-covid-19?idiom=es>.

Agradezco su contribución y tengo la seguridad de que su investigación se traducirá en aportaciones científicas relevantes reflejadas en publicaciones de alto impacto.

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


DRA. JIMENA QUINZAÑOS FRESNEDO
SECRETARÍA DE COMITÉ

Carta de aprobación del protocolo:

23/21: Potencial osteogénico de los cristales de urato monosódico en células troncales mesenquimales de membrana sinovial.

2/2

Av. México Xochimilco Núm. 284, Col. Arzobispo de Guadalupe, CP. 16288, Alcaldía Xitlapan,
Ciudad de México. Tel: (55) 59 99 12 00 ext.12260 www.inr.gob.mx



ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Ciudad de México, a ____ de ____ de 20__

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de la Investigación: **Potencial osteogénico de los cristales de urato monosódico en células troncales mesenquimales de membrana sinovial**

Nombre del Investigador Principal: **Dra. Yessica Eduviges Zamudio Cuevas**

Nombre del participante: _____

A través de este documento que forma parte del proceso para la obtención del consentimiento informado, me gustaría invitarlo a participar en la investigación titulada: **Potencial osteogénico de los cristales de urato monosódico en células troncales mesenquimales de membrana sinovial**. Antes de decidir, necesita entender por qué se está realizando esta investigación y en qué consistirá su participación. Por favor tómese el tiempo que usted necesite, para leer la siguiente información cuidadosamente y pregunte cualquier cosa que no comprenda. Si usted lo desea puede consultar con personas de su confianza (Familiar y/o Médico tratante) sobre la presente investigación.

1. ¿Dónde se llevará a cabo esta investigación?

Esta investigación se llevará a cabo en las instalaciones del Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra, específicamente en el Laboratorio de Líquido Sinovial ubicado en el cuarto piso de la Torre de Investigación.

2. ¿Cuál es el objetivo de esta investigación?

Identificar si el ácido úrico tiene un efecto en el proceso de la formación de hueso dentro de la articulación o si interviene en las lesiones de la articulación.

3. ¿Por qué es importante esta investigación?

La gota es una enfermedad ocasionada por la elevación del ácido úrico, es una enfermedad que se da en cuatro etapas: la hiperuricemia o elevación del ácido úrico por niveles mayores de lo normal, esta etapa no genera síntomas; si los niveles no se controlan ocasionan un depósito del ácido úrico en la articulación y genera dolor; esta fase se conoce como gota aguda; después de unos días, el dolor y la inflamación desaparecen, esta fase es conocida como etapa intercrítica, finalmente se llega a la última fase: gota crónica y es la que involucra erosión en los huesos como una complicación generando una discapacidad. Nosotros queremos conocer el papel del ácido úrico en la formación de las erosiones de los huesos, a través del efecto en las células que componen la membrana sinovial, una estructura que se encuentra en la articulación.

4. ¿Por qué he sido invitado a participar en esta investigación?

Ha sido invitado a formar parte de esta investigación, porque durante su cirugía, el doctor retira una pequeña parte de su tejido de la articulación (como parte de su procedimiento habitual), el cual es muy valioso para nosotros porque sirve para aislar las células, las cuales vamos a estudiar para ver si el ácido úrico genera una lesión, además de cumplir con las características enlistadas a continuación (criterios de inclusión):

- Hombres y mujeres de 18 a 45 años, sometidos a cirugía de los ligamentos.
- No presenta en sus análisis de sangre su ácido úrico elevado
- No tiene Usted gota
- No tiene enfermedades como la artritis reumatoide, en la que hay una inflamación en su articulación porque el cuerpo reconoce como extraña a sus propias células
- No tiene osteoartritis o degeneración de su articulación

5. ¿Estoy obligado a participar?

Su participación es **voluntaria, anónima y confidencial**; no tiene que participar forzosamente. No habrá impacto negativo alguno si decide no participar en la investigación, y **no demeritará de ninguna manera la calidad de la atención** que reciba en el Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra, en término de sus derechos como paciente.

6. ¿En qué consistirá mi participación y cuánto durará?

Su participación consistirá en que un día antes de su cirugía, personal médico especializado del Servicio de Ortopedia del Deporte y Artroscopía del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” le solicitará la donación del tejido que le retirarán en su operación para utilizar una pequeña muestra del tejido de su articulación del tamaño aproximado de 2 granos de arroz, la cual no le producirá ningún daño a la articulación, ya que se trata de un tejido que es removido para la correcta visualización de la articulación por el médico. Este tejido normalmente se desecha en la operación, en este caso si Usted está de acuerdo se recuperaría por parte de su cirujano durante la operación. Si está de acuerdo en participar, le solicitaremos que escriba su nombre y firme el formato Consentimiento Informado, del cual le entregaremos una copia para que tenga los datos de ubicación del investigador responsable.

7. ¿Cuáles son los posibles beneficios de formar parte de esta investigación?

Esta investigación no está diseñada para beneficiarle directamente ó de forma económica; sin embargo, el tejido que nos done será empleado para generar evidencia científica que sustente si el ácido úrico elevado puede influir en la erosión de las articulaciones.

8. ¿Existe alguna alternativa que pueda proporcionarme mayor beneficio de lo que me propone esta Investigación?

Ninguna. El beneficio que le pueda proporcionar a Usted el formar parte de una investigación es de forma indirecta, ya que de los resultados del estudio se derivará en una publicación científica del impacto del ácido úrico como factor de riesgo para lesiones en la articulación.

9. ¿Cuáles son los posibles riesgos de formar parte de esta investigación?

Ningún riesgo por formar parte de la investigación, sin embargo; de acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, esta investigación contempla un riesgo mayor al mínimo, pero es generado por su cirugía en sí, ya que puede tener complicaciones durante la misma, propias del procedimiento u operación, puede tener inflamación de su rodilla, dolor o una infección.

10. ¿Tendré alguna molestia durante y/o después de mi participación?

Por participar en la investigación no tendrá molestias, sin embargo; puede referir un dolor en la rodilla donde se llevó a cabo la operación, puede tener dificultad para caminar los primeros días posteriores a la operación, o entumecimiento, pero eso es ocasionado por su operación.

11. ¿Recibiré alguna compensación por mi participación?

Ninguna.

12. ¿Tendrá algún costo para mi participar en esta Investigación?

Ninguno. Los gastos relacionados con esta investigación que se originen a partir del momento en que voluntariamente acepta participar en la misma, no serán pagados por Usted. En el caso de que existan gastos adicionales originados por el desarrollo de esta investigación, serán cubiertos por el investigador responsable.

Es importante comentarle que los gastos y/o cuotas que se generen como paciente del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, que no tengan ninguna relación con la presente Investigación, deberán ser pagados por Usted.

13. Una vez que acepte participar ¿Es posible retirarme de la Investigación?

Se le informa que Usted tiene el derecho, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación de dejar de participar en la presente investigación, sin que esto disminuya la atención y calidad o se creen prejuicios para continuar con sus tratamientos y la atención que como paciente le otorga el Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Únicamente avisando a alguno de los investigadores su decisión y su muestra donada será deseada.

14. ¿En qué casos se me puede suspender de la Investigación?

El tejido donado por el participante podrá ser suspendido de la investigación si el paciente presenta otro padecimiento músculo esquelético, además de la lesión por la que fue sometido a cirugía. También si las muestras biológicas no resultan adecuadas para los estudios.

15. ¿Qué sucede cuando la Investigación termina?

Los resultados, de manera anónima, podrán ser publicados en revistas de investigación científica o podrán ser presentados en congresos. Es posible que sus muestras, datos no personales, información médica o genética puedan ser usadas para otros proyectos de investigación relacionados, previa revisión y aprobación por los Comités de Investigación y de Ética en Investigación.

16. ¿A quién puedo dirigirme si tengo alguna complicación, preocupación o problema relacionado con la Investigación?

Cualquier duda, preocupación o queja acerca de algún aspecto de la investigación o de la forma en que ha sido tratado durante el transcurso de esta, por favor contacte a los investigadores principales: Dra. Yessica Zamudio Cuevas, E-mail: yessizc@hotmail.com y Dr. Carlos Landa Solís, cls_73@hotmail.com. Al teléfono 5999-1000 extensiones 19501 y 19502 en un horario laboral 8:00 a 16:00 h.

Aclaraciones:

- a) Esta investigación ha sido revisada y aprobada por el Comité de Investigación y Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, que son independientes al grupo de investigadores, para proteger sus intereses.
- b) Su decisión de participar en la presente Investigación es **completamente voluntaria**.
- c) En el transcurso de la Investigación, usted podrá solicitar información actualizada sobre la misma, al investigador responsable.
- d) La información obtenida en esta investigación, utilizada para la identificación de cada participante será mantenida con estricta confidencialidad por **el investigador responsable del proyecto**, conforme la normatividad vigente.
- e) Se le garantiza que usted recibirá respuesta a cualquier pregunta, duda o aclaración acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios u otros asuntos relacionados con la presente investigación.
- f) Se hace de su conocimiento que existe la disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendría derecho por parte del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, solamente en el caso de sufrir daños directamente causados por la Investigación.
- g) En caso de que sea Usted padre/tutor, o representante legal de un menor de edad o de una persona incapaz de tomar la decisión o firmar este documento, sírvase firmar la presente Carta de Consentimiento Informado dando su autorización.
- h) En el caso de que el participante en la investigación se trate de un menor a partir de los 6 años, por favor de lectura al Asentimiento Informado anexo a este documento, para que el menor lo comprenda y autorice.
- i) Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado.
- j) Se le comunica que esta Carta de Consentimiento Informado se elabora y firma en dos ejemplares originales, se le entregará un original y el otro lo conservará el investigador principal

FIRMA DE CONSENTIMIENTO

Yo, _____, manifiesto que fui informado (a) del propósito, procedimientos y tiempo de participación y en pleno uso de mis facultades, es mi voluntad participar en esta investigación titulada. **Potencial osteogénico de los cristales de urato monosódico en células troncales mesenquimales de membrana sinovial**

No omito manifestar que he sido informado(a) clara, precisa y ampliamente, respecto de los procedimientos que implica esta investigación, así como de los riesgos a los que estaré expuesto ya que dicho procedimiento es considerado de **riesgo mayor mínimo**.

He leído y comprendido la información anterior, y todas mis preguntas han sido respondidas de manera clara y a mi entera satisfacción, por parte de _____.

NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE
PADRE/TUTOR O REPRESENTANTE LEGAL
(según aplique, se requiere identificaci3n)

**NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADO
PRINCIPAL**

TESTIGOS

NOMBRE Y FIRMA
PARENTESCO
DOMICILIO

NOMBRE Y FIRMA
PARENTESCO
DOMICILIO

Nota: Los datos personales contenidos en la presente Carta de Consentimiento Informado, ser3n protegidos conforme a lo dispuesto en las Leyes Federal de Transparencia y Acceso a la Informaci3n P3blica, General de Transparencia y Acceso a la Informaci3n P3blica y General de Protecci3n de Datos Personales en Posesi3n de Sujetos Obligados.