



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de la inflamación y la producción de IL-20 e IL-17^a en membrana sinovial en pacientes con osteoartritis de rodilla

María Isabel Narvaez Reyes

Médico Internista, Residente de Reumatología

Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Unidad de Reumatología - Departamento de Medicina
Área de conocimiento: Ciencias de la salud

Bogotá, D.C.

2020

Evaluación de la inflamación y la producción de IL-20 e IL-17^a en membrana sinovial en pacientes con osteoartritis de rodilla

María Isabel Narvaez Reyes

Médico Internista, Residente de Reumatología
Universidad Nacional de Colombia

Director:

Federico Rondón Herrera, MD.

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

Codirector:

Angela Patricia Rojas Rojas MSc, P.hD.

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

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Unidad de Reumatología - Departamento de Medicina
Área de conocimiento: Ciencias de la salud
Bogotá, D.C.
2020

Resumen

El objetivo de este estudio es cuantificar y clasificar la gravedad de la inflamación en la sinovial de pacientes con osteoartritis de rodilla (OA) por escala cuantitativa a través de un estudio observacional descriptivo de series de casos. No se estimará el tamaño de la muestra para este estudio, todos los pacientes que tienen Se incluirá una indicación médica de un reemplazo de rodilla durante el período comprendido entre mayo de 2019 y julio de 2019. La presente serie de casos consta de 9 pacientes con un diagnóstico de artrosis de rodilla e indicación de reemplazo de articulación realizado entre mayo de 2018 y junio de 2019, con una edad promedio de 62.7 años (SD 16) al momento de la cirugía y el muestreo, la mayoría de los casos son mujeres 8 (88.9%), el peso promedio fue de 66.1 Kilos (SD 10.9) y un IMC de 27.8 (SD 4.8). Las principales comorbilidades incluyen presión arterial alta en 3 pacientes (33.3%), diabetes mellitus tipo 2 en dos casos (22%), casos de hipotiroidismo 3, casos de osteoporosis 2, osteoporosis 2 y un paciente (11%) con autoinmunidad debido a espondilitis anquilosante y uveítis; El número de pacientes con dos o más comorbilidades fue de 3 (33%).

Demuestra un importante proceso inflamatorio asociado con la osteoartritis documentada histopatológicamente. La presencia de IL 20 e IL-17A es evidente en pacientes con osteoartritis que permite la cuantificación.

Palabras clave: osteoartritis, membrana sinovial, rodilla, interleucina 17 (IL-17), interleucina 20 (IL-20)

Abstract

The Objective of this study is Quantify and classify the severity of inflammation in the synovium of patients with knee osteoarthritis (OA) by quantitative scale through an observational, descriptive case series study A sample size will not be estimated for this study, all patients who have a medical indication of a knee replacement during the period from May 2019 to July 2019 will be included The present case series consists of 9 patients with a diagnosis of knee OA and indication of joint replacement performed between May 2018 and June 2019, with an average age of 62.7 years (SD 16) at the time of surgery and sampling, the majority of the cases are female 8 (88.9%), average weight was 66.1 Kilos (SD 10.9) and BMI of 27.8 (SD 4.8). The main comorbidities include high blood pressure in 3 patients (33.3%), type 2 diabetes mellitus in two cases (22%), hypothyroidism 3 cases, osteoporosis 2 cases, osteoporosis 2 and one patient (11%) with autoimmunity due to ankylosing spondylitis and uveitis; The number of patients with two or more comorbidities was 3 (33%).

It demonstrates an important inflammatory process associated with histopathologically documented osteoarthritis The presence of IL 20 and IL-17A is evident in patients with Osteoarthritis allowing quantification.

Keywords: Osteoarthritis, synovial membrane, knee, Interleukin 17 (IL-17), Interleukin 20 (IL-20)

Contenido

	Pág.
Resumen y Abstract	V
Introducción	1
1. Objetivos	3
1.1 Objetivo General	3
1.2 Objetivos específicos	3
2. Hipótesis	5
3. Marco teórico	7
3.1 Características histopatológicas de la sinovitis por OA	7
3.1.1 Inflamación, IL-17 y OA	8
3.1.2 Inflamación, IL-20 y OA	10
4. Metodología	13
4.1 Tipo de estudio	13
4.2 Área de estudio.....	13
4.3 Tamaño de muestra.....	13
4.4 Criterios de inclusión.....	13
4.5 Criterios de exclusión.....	14
4.6 Selección de pacientes	14
4.7 Toma de biopsias.....	16
4.8 Transporte de muestras	16
4.9 Procesamiento de las muestras	16
4.9.1 Evaluación del Score de sinovitis	16
4.9.2 Técnica empleada para la identificación de IL-17 ^a e IL-20 mediante inmunohistoquímica y cultivo de sinoviocitos para valoración cuantitativa de IL-20 ..	20
4.9.3 Cultivo de sinoviocitos de membrana sinovial, fibroblastos de piel y medición de IL-20 en sobrenadantes de cultivo.....	24
5. Análisis estadístico	27
6. Consideraciones éticas	29
7. Resultados	31
8. Discusión	37
Bibliografía	39

Introducción

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular de origen desconocido, frecuente en personas de mediana y tercera edad, con prevalencias que han venido en aumento. Causa dolor, rigidez, hinchazón y destrucción de la articulación con reducción de la amplitud de movimiento generando un serio impacto en la calidad de vida de los pacientes(1). Fue considerada como un simple proceso "de desgaste" como enfermedad degenerativa de las articulaciones. Sin embargo, la patogenia de la OA es mucho más compleja que el desgaste, en el término "osteoartritis" el sufijo "-itis" es indicativo de una existencia de un proceso inflamatorio, siendo probablemente aproximación más correcta a la cual se la ha dado una importancia en la última década (2).

Cada vez se determina su inicio en pacientes jóvenes en edades por debajo de los 40 años, no es exclusiva de pacientes mayores, con una variedad de factores que desempeñan un papel importante en la patogénesis de la OA: genéticos, biomecánicos y mediadores pro-inflamatorios (proteasas). Estos definen en la actualidad dos formas de OA que se confunden en su papel etiológico: una forma primaria, donde el factor precipitante es la alteración bioquímica del cartílago por factores genéticos y la forma secundaria donde se identifican factores más precisos de alteración biomecánicos seguidos al trauma o estrés mecánico de la articulación. La identificación de los factores claves involucrados en este proceso, ha llevado a proponer nuevos objetivos terapéuticos, dirigidos a frenar o detener la progresión de OA más allá del simple alivio sintomático (3).

La evaluación del daño articular se basa en imágenes radiológicas, estableciendo el diagnóstico y compromiso en etapas tardías e irreversibles de la enfermedad. Esta situación clínica ha dado pie a la búsqueda de medios diagnósticos que puedan identificar la enfermedad en etapas tempranas planteándose la posibilidad de utilizar alguna intervención terapéutica ya utilizada en otras patologías reumáticas inflamatorias, con la esperanza de intervenir en la historia natural de la OA. Citoquinas como IL1beta y

TNF alfa, han sido ya descritas en este proceso inflamatorio en la Artritis Reumatoidea, sin establecerse su clara participación en la OA.

La familia de IL17 son un grupo de citoquinas con efecto inflamatorio, que atrae cada vez más la atención de los investigadores por su participación en la patogénesis de la OA (4)(5)(6)(7)(3)(8)(9)(10). La evidencia actual no es concluyente en los pocos estudios clínicos respecto a si este mediador inflamatorio esta elevado en algunas de las formas clínicas de OA. De igual forma IL-20 es una citoquina que promueve la inflamación, la angiogénesis y la quimiotaxis, de la cual se ha documentado en la literatura un papel etiopatogénico en condiciones como la psoriasis, artritis reumatoide, aterosclerosis, insuficiencia renal aguda y crónica, cáncer de próstata, cáncer de seno, asma y enfermedad inflamatoria intestinal, pero con evidencia científica muy débil hasta ahora en la fisiopatología de la OA, probablemente debido a falta de estudios dirigidos, dado sus mecanismos inductores de la respuesta inflamatoria y amplificación de la misma (11),(12),(13),(14). Se sabe poco sobre la función de IL-17 e IL-20 en la patogénesis y la evolución de OA.

El presente estudio forma la primera parte del proyecto de investigación “**Evaluación de la inflamación y la producción de IL-20 e IL-17^a en membrana sinovial en pacientes con osteoartritis de rodilla**”, en el cual se busca establecer la existencia de un compromiso inflamatorio en la membrana sinovial de pacientes con OA de rodilla, con posterior medición de IL-20 e IL-17A como un método de estratificación cuantitativo para evaluar el compromiso inflamatorio que sirva de ayuda al patólogo y al clínico en su interpretación de la severidad y progresión de la OA.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar la presencia de inflamación histológica y bioquímica en muestra de tejido sinovial en pacientes con OA de rodilla.

1.2 Objetivos específicos

- Cuantificar y clasificar la severidad de la inflamación en la sinovial de los pacientes con OA de rodilla mediante escala cuantitativa.
- Determinar la presencia de IL-17 e IL-20 en tejido sinovial de pacientes con osteoartritis primaria o secundaria de rodillas, en cualquier fase de la enfermedad.

2.Hipótesis

Existe directa correlación entre la severidad de la OA con los hallazgos inflamatorios y niveles de IL-17A e IL-20, permitiendo cuantificar de manera objetiva los hallazgos cualitativos y la subjetividad clínica de la OA.

3.Marco teórico

3.1 Características histopatológicas de la sinovitis por OA

Los cambios histológicos que ocurren en la o sinovial Incluyen hipertrofia e hiperplasia con un aumento en el número de células de revestimiento sinovial. Estos cambios son a menudo acompañados por la infiltración de los tejidos subyacentes con focos dispersos de células mononucleares (linfocitos y macrófagos). La infiltración de mononucleares por células en la sinovial y el espesor de la capa sinovial parecen estar estrechamente correlacionada. Los pacientes con OA de todos los grados experimentan un engrosamiento de la capa de la capa sinovial, aumento de la vascularidad e infiltración de células inflamatorias de las membranas sinoviales, con cambios más marcados en OA avanzada. Estudios realizados de los cambios en la sinovial que se producen en varias etapas de la OA revelan que la cantidad de fibrina depositada en la membrana sinovial y el grado de infiltración de leucocitos están correlacionados con la severidad de la enfermedad: aunque la deposición de fibrina parece ocurrir principalmente en la inflamación crónica es observable que está presente desde el inicio del proceso de la enfermedad y podría exacerbar el daño del cartílago.

En contraste con la inflamación sinovial observada en la AR, la inflamación sinovial en la OA no es un proceso difuso: su distribución es irregular y confinada a áreas adyacentes a los sitios de la condropatía sin embargo su apariencia microscópica puede ser indistinguible de lo observado en AR, especialmente en casos de OA tardía que implica neovascularización e infiltración por fibroblastos y macrófagos. Aunque estas características patológicas de la sinovial son patente de la OA avanzada, también se encuentran en estadios tempranos o cuando el daño del cartílago es menos extenso. Lo que sugiere que la sinovial está involucrada en la fase temprana de la enfermedad. La sinovitis se ha documentado sólo en los sitios adyacentes al cartílago degenerativo en los

pacientes con OA, pero el cartílago degenerativo no siempre está completamente ligado a la sinovitis. Este hallazgo sugiere que la inflamación es causada por los productos de degeneración del cartílago en OA avanzada(19) .

3.1.1 Inflamación, IL-17 y OA

Cada vez más se resalta la importancia del proceso inflamatorio dentro de la fisiopatología de la OA. Estudios recientes han intentado dilucidar los eventos en las cascadas de la inflamación que llevan a prolongar la destrucción del cartílago articular por las agregasas y colagenasas. Las Citoquinas que clásicamente se han asociado con este proceso son la IL-1 y el TNF- α , estos mediadores de la inflamación son sintetizados intracelularmente en formas precursoras y convertidas a sus formas activas mediante clivaje proteolítico por las caspasas, se ha visto que la expresión de dichas caspasas está aumentada en pacientes con OA (1,17).

La familia de la IL-17 se compone de seis miembros (IL-17 A-F) que pueden interactuar a través de cinco tipos de receptores (IL-17 RA-E) (15). La fuente de IL-17 son principalmente las células T CD4 + estimuladas y los mastocitos que infiltran la membrana sinovial y toda la articulación a través de los vasos sanguíneos. Las células principales de la articulación que están afectadas por IL-17 son los condrocitos y los sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS) que exhiben la expresión del receptor IL-17R en su superficie (2). La IL-17 puede inducir la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 a partir de cartílago, sinoviocitos, macrófagos y células óseas, y actuar sobre condrocitos mediante la activación de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), ciclooxigenasa (COX) -2 que afectan negativamente al cartílago (10). Se ha demostrado que IL-17 inhibe la síntesis de proteoglicanos por los condrocitos y promueve la producción de enzimas del grupo MMP (Colagenasas). El efecto de la IL-17 sobre la secreción de VEGF (Factor de crecimiento endotelial y vascular) tanto por los condrocitos como por el FLS es también característico; favorece el desarrollo excesivo de la red de vasos sanguíneos dentro de la membrana sinovial, conduciendo a su hipertrofia (15). Por lo expuesto se propone un papel fundamental de la IL-17 en la fisiopatología de la OA.

En un estudio experimental se aislaron fibroblastos sinoviales y condrocitos de pacientes con OA de rodilla y cadera los cuales fueron estimulados in vitro con IL-17, IL-1 β O TNF

– α con resultados que sugirieron que la IL-17 podría contribuir a la descomposición del cartílago y a la infiltración sinovial en la OA induciendo tanto la liberación de quimioquinas por condrocitos como fibroblastos sinoviales y en menor grado, la síntesis de IL-1 β por los condrocitos(3) . De forma similar a partir de especímenes de cartílago de 26 pacientes con OA de rodillas que fueron sometidos a trasplante total, se extrajeron y cultivaron condrocitos, los cuales a su vez fueron expuestos a los efectos pro inflamatorios de la IL- 17 e IL-1 β demostrando que se indujo la producción de colagenasa-3 (MMP-13) por estos, responsable de la degradación del colágeno en el cartílago patológico (5). En un escenario similar a partir de tejido sinovial obtenido en cirugía de rodillas de 32 pacientes con OA, se realizó una evaluación macroscópica de la inflamación que permitió separar las áreas inflamadas y no inflamadas. Se tomaron muestras de las áreas identificadas y se incubaron para obtener medios acondicionados en los tejidos. La expresión cuantitativa de ARNm de mediadores pro inflamatorios se analizó mediante RT-PCR (PCR en tiempo real) y los niveles de proteína se determinaron mediante ELISA y zimografía de gelatina encontrando que las áreas inflamadas se asociaron con una mayor expresión de IL-17 e IL-22 (7). De esta suma de experimentos in vitro, dada la presencia frecuente o la evidente respuesta a la estimulación con IL-17 en el tejido sinovial se presume su papel fisiopatológico en la OA, no obstante es importante resaltar que los análisis se hicieron concomitante con la medición o estimulación de otros mediadores inflamatorios, que no permite dilucidar entre un aporte individual o en conjunto de cada uno de ellos.

Ya en el ámbito de estudios in vivo varios estudios en su mayoría de población china han revelado niveles elevados de la IL-17 en líquido sinovial y algunos en suero de los pacientes, tal es el caso del estudio de corte transversal que incluyó a 152 pacientes con OA de rodillas y cadera en estadio final sometidos a reemplazo de articulación, donde se obtuvo muestra de líquido sinovial en la mañana del procedimiento quirúrgico y se midieron los niveles de IL-17 entre otras interleuquinas, la cual estuvo presente en 14 muestras (9,2%), a su vez se asoció con altos niveles de varias otras adipocinas pro inflamatorias, citoquinas, quimiocinas, demostrando además un patrón radiográfico diferente de OA, con pacientes que tendían a ser más jóvenes, más a menudo mujeres y obesos grado II(4) . Otros estudios previos, de tipo retrospectivo tomaron muestras de suero y líquido sinovial de pacientes con osteoartritis de rodilla primaria apareados con sujetos sanos por edad y sexo se encontró que el nivel de IL-17 medido en el suero y el

líquido sinovial de los pacientes fue más elevado comparado con los controles evidenciando una correlación directa con las alteraciones radiográficas más severas según el sistema de clasificación de Kellgren y Lawrence (KL).(6) También en población china un análisis de 226 pacientes con OA de rodilla y 106 controles apareados por edad, sexo e IMC, evidencio que los niveles en líquido sinovial de IL-17 fueron significativamente mayores en los pacientes en comparación con los controles ($P < 0,01$), y se correlacionaron negativamente con la gravedad de OA medida por índices de dolor, funcionalidad e índice radiográfico de de Kellgren y Lawrence.(8)

De lo anterior podemos concluir que es clara la presencia local y sistémica de niveles detectables de IL-17 en pacientes con OA principalmente de rodilla en la población oriental, sin disponer de información en otras razas o zonas geográficas, así mismo no hay evidencia de una alteración genética predisponente o asociada a la enfermedad en las zonas codificantes para la IL-17.

3.1.2 Inflamación, IL-20 y OA

La interleucina-10 (IL-10) es una citocina pleiotrópica que Inhibe la inmunidad mediada por células mientras que aumenta la inmunidad humoral. Se estableció la familia de IL-10 recientemente a partir del descubrimiento de varias citosinas relacionadas, tales como IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, e IL-26. Aunque estas IL-10 familias, comparten una homología primaria y estructural sus actividades biológicas son muy diferentes(16). La IL-20 actúa sobre múltiples tipos de células activando un complejo heterodímero receptor de IL-20R1-IL-20R2 o IL-22R1-IL-20R2(17). La IL-20 es una citoquina que promueve la inflamación, la angiogénesis y la quimiotaxis(12). La IL-20 también regula la diferenciación de los osteoclastos alterando el activador del receptor del eje NF-kB (RANK) y del ligando RANK (RANKL)(17).

Aunque varios tipos de células expresa IL-20, se expresa predominantemente por monocitos y en la piel por queratinocitos, también se ha encontrado en concentraciones en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Otros estudios también han sugerido un papel potencial para la IL-20 en la aterosclerosis y angiogénesis, Insuficiencia renal aguda y crónica, cáncer de próstata, cáncer de seno, asma y enfermedad inflamatoria intestinal(11),(12),(13). Anteriormente se ha demostrado que la IL-20 indujo a fibroblastos sinoviales (RASf) en AR a la producción de proteína

quimioatrayente monocítica-1, IL-6 e IL-8, y también aumentó la quimiotaxis de neutrófilos. Además, el tratamiento con anticuerpo monoclonal anti - IL - 20 (7E) o electroporación Soluble IL-20R1 en ratas con artritis inducida por colágeno (CIA) redujo la gravedad de la artritis, lo que sugirió que IL-0 podría ser el objetivo terapéutico en la AR y la osteoartritis. Sin embargo, se sabe poco sobre la función de IL-20 en la patogénesis de OA. Solamente se dispone de un estudio donde se utilizó tinción inmunohistoquímica para detectar la IL-20 y sus receptores en tejido sinovial y cartílago de pacientes con OA, y en fibroblastos sinoviales OA(OASF) y condrocitos (OACC) de roedores con OA inducida cirugía, donde se encontró que la IL-20 y sus receptores se expresaron en OASFs y OACCs. La IL-20 indujo la expresión del TNF- α , IL-1 β , MMP-1, y MMP-13 mediante la activación de ERK-1/2 y señales JNK (Janus Kinasa) en OASFs. Así mismo la IL-20 no sólo aumentó la expresión de MCP-1, IL-6, MMP-1 y MMP-13, sino también reguló a la baja el agregan, el colágeno tipo 2, TGF- β en OACCs. La gravedad de la artritis fue significativamente menor en las ratas con OA tratadas con 7E (Anticuerpo monoclonal Inhibidor de IL-20), sugiriendo que estos hallazgos proporcionan evidencia de que IL-20 es un nuevo objetivo terapéutico potencial en OA(14).

4. Metodología

4.1 Tipo de estudio

Estudio observacional, descriptivo tipo serie de casos

4.2 Área de estudio

Consulta de los servicios de Ortopedia y Reumatología de la Subred Centro Oriente de la ciudad de Bogotá y un consultorio particular durante el período comprendido entre el mes de Mayo de 2019 a Julio de 2019

4.3 Tamaño de muestra

No se estimará un tamaño de muestra para el presente estudio, se incluirán todo los pacientes que tengan sospecha clínica OA de rodilla y que cumplan con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para OA de rodilla durante el período comprendido entre el mes de Marzo de 2019 a mayo de 2019.

4.4 Criterios de inclusión

1. Pacientes masculinos o femeninos colombianos
2. Pacientes mayores de 18 años
3. Pacientes procedentes de la consulta externa de los servicios de Ortopedia o Reumatología de la Subred Centro Oriente/ Consultorio particular que tengan sospecha clínica OA de rodilla y que cumplan con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para OA de rodilla (Mayores de 45 años, Dolor articular que se intensifica con la actividad, sin rigidez matutina o de presentarla se encontrará por menos de 30 minutos) que sean refractarios a las medidas

farmacológicas (Analgésicos no esteroideos AINES tópicos y sistémicos, uso de corticoides intra-articulares) y medidas no farmacológicas (Fisioterapia, educación del paciente y reducción de peso) persistiendo con dolor intenso, rigidez articular y reducción de la funcionalidad articular con impacto importante en la calidad de vida.

4. Pacientes con síntomas clínicos antes mencionados y que por lo anterior requieran de reemplazo de rodilla
5. Pacientes con los síntomas antes mencionados con cambios inflamatorios mono-articulares, con compromiso de rodilla dada por edema y sinovitis localizada, que requieran estudio de líquido sinovial, con biopsia percutánea con aguja de membrana sinovial PARKER PEARSON para diagnóstico diferencial de la artropatía con una puntuación a la radiografía simple de rodilla de 0 a 4, en escala radiológica de severidad de Kellgren y Lawrence (K/L)
6. Deseo de participar en el estudio, si durante el procedimiento se documentan cambios inflamatorios de OA previa explicación y firma del consentimiento informado.

4.5 Criterios de exclusión

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

4.6 Selección de pacientes

Se realizará una selección de manera prospectiva pacientes que consulten a la consulta externa de los servicios de Ortopedia y Reumatología de la Subred Centro Oriente de la

ciudad de Bogotá, así como de la consulta particular de Reumatología, que tengan sospecha clínica OA de rodilla y que cumplan con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para OA de rodilla (Mayores de 45 años, Dolor articular que se intensifica con la actividad, sin rigidez matutina o de presentarla se encontrará por menos de 30 minutos) que sean refractarios a las medidas farmacológicas (Analgésicos no esteroideos AINES tópicos y sistémicos, uso de corticoides intra-articulares) y medidas no farmacológicas (Fisioterapia, educación del paciente y reducción de peso) persistiendo con dolor intenso, rigidez articular y reducción de la funcionalidad articular con impacto importante en la calidad de vida.

Los pacientes que serán incluidos en el estudio deberán tener indicación médica para la realización de reemplazo de rodilla por los síntomas antes descritos.

Se llevarán a toma de biopsia sinovial percutánea a los pacientes con los síntomas antes mencionados que presenten sinovitis o edema mono-articular con el fin de realizar un estudio de líquido sinovial y realizar un diagnóstico diferencial de otras artropatías inflamatorias.

Éstos procedimientos serán realizados por el médico ortopedista y/o Reumatólogo tratante los cuales cuenta con la experiencia en reemplazo articular y en la toma de muestra de membrana sinovial.

Es importante anotar además, que el procedimiento de la biopsia percutánea con aguja es un procedimiento de rutina que se realiza en pacientes específicos los cuales tienen una indicación precisa para el diagnóstico diferencial de las artropatías inflamatorias cuando por clínica no logra establecerse.

El día en que se realice el reemplazo de rodilla o biopsia percutánea con aguja por parte de médico tratante, se solicitará que posterior a la toma de muestra, esta no se descarte y sea almacenada para trasladarla a la Universidad Nacional de Colombia para así realizarle los análisis planteados para el presente estudio.

Teniendo en cuenta que se tomará una muestra biológica del paciente, se le solicitará la firma de consentimiento informado, para de esta manera explicarle al paciente los

objetivos del estudio y obtener la autorización de procesar la muestra extraída por su médico tratante con el fin de realizar el diagnóstico diferencial.

4.7 Toma de biopsias

De la muestra extraída durante procedimiento quirúrgico (reemplazo de rodilla) programada por el médico tratante, el grupo de investigadores le solicitará a este, un fragmento de membrana sinovial extraído para el estudio en mención.

4.8 Transporte de muestras

Las muestras serán transportadas de acuerdo con los lineamientos y especificaciones de las normas técnicas colombianas y el manual de bioseguridad de la OMS, cuyo manejo corresponde a categoría B: Transporte de tejidos biológicos no infecciosos.

4.9 Procesamiento de las muestras

Las muestras que sean suministradas por el médico tratante posterior a su análisis, serán almacenadas y procesadas en los laboratorios de investigación del Departamento de Farmacia y el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina, debidamente acreditados, propios de la Universidad Nacional de Colombia.

La evaluación histopatológica de la membrana sinovial por parte del servicio de patología consiste en la cuantificación del score de sinovitis y posteriormente la medición de IL-17A e IL-20 mediante inmunohistoquímica.

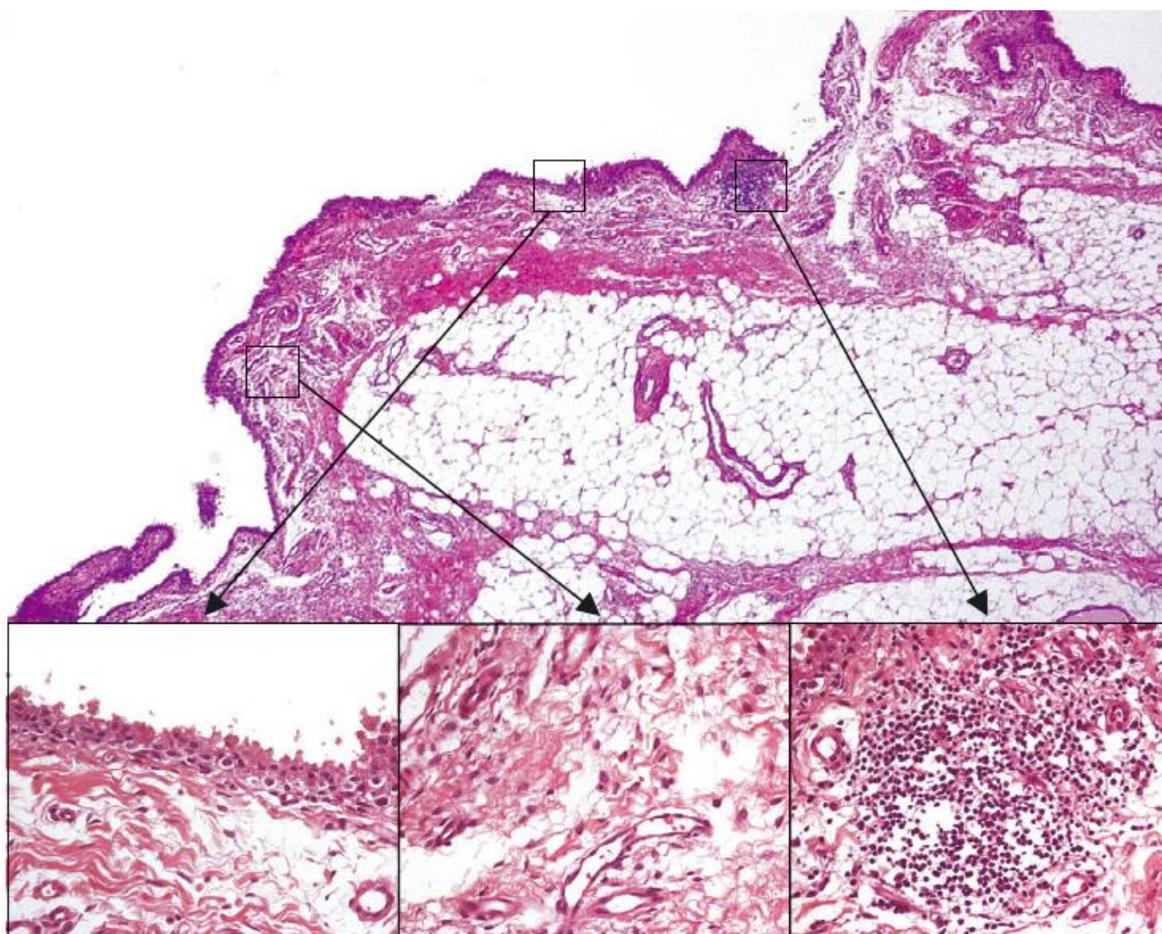
4.9.1 Evaluación del Score de sinovitis

A las muestras de membrana sinovial se les practicará la coloración básica en cortes histológicos procesados con parafina mediante la aplicación de la técnica de Hematoxilina y Eosina de Harris, procedimiento adoptado por el laboratorio de patología de la Universidad Nacional de Colombia y aceptado por la comunidad científica internacional y nacional, normalizado y editado en textos científicos de Histotecnología. El procedimiento secuencial se realizará de la siguiente manera:

-
- Desparafinar e hidratar (pasar por Alcohol y Xilol tres veces)
 - Teñir con hematoxilina de Harris filtrada recientemente durante 6 a 15 minutos
 - Lavar en agua corriente de 2 a 5 minutos
 - Diferenciar en alcohol ácido al 1% por 5 a 30 segundos (control al microscopio)
 - Azular en agua corriente durante 5 segundos
 - Las láminas posteriormente se colocarán en una solución débil de agua amoniacal o en una solución saturada de Carbonato de Litio hasta que las secciones se vean de color azul brillante
 - Lavar con agua corriente durante un minuto
 - Se tiñe con eosina-floxina recientemente filtrada durante 30 segundos a un minuto
 - Lavar en agua corriente (en etanol al 70% si es eosina alcohólica) hasta obtener la intensidad deseada de coloración por 10 minutos
 - Deshidratar, aclarar y montar
 - Tratamiento de los cortes tras la coloración: Después de completar la coloración, los cortes deben ser deshidratados y aclarados nuevamente para conseguir la conservación definitiva. La deshidratación se realiza a través de baños sucesivos de alcohol etílico de reciente gradación (80, 96 y 100%). El aclaramiento se realiza mediante el uso de tres baños consecutivos de xileno (xilol) de un minuto cada uno, después de uno de acetona al 100%.
 - Montar en medio resinoso

- El producto de trabajo finalmente es revisado por el director de calidad o quien haga sus veces (formato de evaluación de calidad).

La estratificación cuantitativa o Score de sinovitis evalúa los cambios inmunológicos e inflamatorios de forma graduada (método aditivo): Se cuantifica las capas de células del revestimiento sinovial (método cuantitativo), densidad de células estromales e infiltrado inflamatorio (método semicuantitativo). Para cada variable se le asigna un puntaje según la severidad del compromiso y su sumatoria finalmente resulta en el score de sinovitis.



En la imagen superior se muestra una histología de tejido sinovial 4X, de izquierda a derecha encontramos el revestimiento sinovial, la densidad de células estromales y el infiltrado inflamatorio. Tomado de: Krenn V., Morawietz L., Burmester G., Kinne R., Mueller-Ladner U., Muller B., Haupl T. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis, *Histopathology*, 49, págs. 348 (2006).

Puntaje de Sinovitis (“Synovitis Score”)		
Capas de células del revestimiento sinovial	Una sola capa	0 Puntos
	2 a 3 capas	1 Punto
	4 a 5 capas con o sin presencia de células multinucleadas presentes	2 Puntos
	Mas de 5 capas con ulceras y presencia de células multinucleadas	3 Puntos
Densidad de células estromales	Normal	0 Puntos
	Ligero aumento	1 Punto
	Moderado aumento con o sin células multinucleadas	2 Puntos
	Bastante aumentado con células multinucleadas gigantes o formación de granulomas reumatoides	3 Puntos
Infiltrado inflamatorio	No hay presencia de infiltrado	0 Puntos
	Pocos linfocitos o células plasmáticas de predominio perivascular	1 Punto
	Numerosos linfocitos o células plasmáticas formando agregados foliculares	2 Puntos
	Denso infiltrado en forma de banda o numerosos agregados foliculares grandes	3 Puntos

Un score de 0-1 indica que no hay evidencia histopatológica de sinovitis, 2-4: sugiere sinovitis de bajo grado y de 5-9 sugiere sinovitis de alto grado (27)

4.9.2 Técnica empleada para la identificación de IL-17^a e IL-20 mediante inmunohistoquímica y cultivo de sinoviocitos para valoración cuantitativa de IL-20

4.9.2.1 Inmunohistoquímica básica para la evaluación de IL-17^a e IL-20

El proceso para la inmunohistoquímica consiste en realizar manualmente los procesos de marcación de antígenos tisulares en láminas histológicas de tejido parafinado y de revelado de reacción positiva con sustancias cromógenas. La técnica se desarrollará de la siguiente manera:

- El histotecnólogo de turno realiza cortes de 4 a 5 micras de espesor del tejido incluido en parafina, los traslada al baño de flotación y los “pesca” con lámina preparada con adhesivo (histogrip) montando uno o dos cortes por lámina según sea solicitado
- Desparafinar las láminas colocándolas en la incubadora a 60°C durante 12 a 18 horas
- Continuar la desparafinación pasando las láminas por xilol dos a tres veces durante tres minutos cada una
- Hidratar los cortes pasando por etanol en concentraciones descendentes (absoluto, 90% y 80%) durante tres minutos en cada paso
- Lavar con agua corriente durante un par de minutos, dejando circular el agua. Luego enjuagar con agua destilada
- Disponer las láminas en vaso de Coplin y adicione la solución de peróxido de hidrógeno al 3%. Tal solución se logra mezclando 5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% con 45 mL de metanol (absoluto). Incubar durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente
- Lavar con agua corriente y enjuagar con agua destilada

-
- Disponer las láminas en vaso de Coplin y adicione la solución de recuperación de antígenos (solución buffer citrato ph 6, ph 7 y ph 9). Tape el vaso con papel aluminio. Ubique el vaso en la olla vaporera, por un tiempo de 20 a 40 minutos según el caso. Si se cuenta con olla de presión y microondas se puede cambiar éste paso por el siguiente: Ubicar las láminas en canastilla portaláminas; llene la olla con 1000 cc de solución de Citrato, disponer la canastilla con las láminas en la olla y caliente el microondas durante 16 minutos hasta que pite; dejarla pitar durante un minuto y diez segundos exacto
 - Dejar enfriar durante 15 a 20 minutos, lavar las láminas tres veces con agua destilada y deposítelas en vaso Coplin con buffer Tris y dejar reposar por 10 minutos
 - Preparar las diluciones con los anticuerpos primarios en Eppendorf debidamente rotulados y ubicarlos en una gradilla. La cantidad de reactivo a preparar es de 50 microlitros para fragmentos pequeños de tejido y para grandes fragmentos de hasta 100 microlitros; esta cantidad se incrementa proporcionalmente y se realiza simultáneamente el mismo proceso para varios casos diferentes
 - Sacar las láminas del búffer, elimine el exceso de humedad con papel absorbente y con lápiz hidrófobo marcar un círculo alrededor del tejido para evitar el escurrimiento de los reactivos por toda la lámina
 - Adicionar la cantidad necesaria de Power Block (BioGenex HK085-5K) por diez minutos y luego adicionar la dilución del anticuerpo primario acorde al tamaño del tejido. Disponer las láminas en la cámara húmeda
 - Incubar a temperatura ambiente durante una hora o durante toda la noche a 4 grados centígrados
 - Lavar tres veces con buffer Tris las láminas y depositar en vaso Coplin con buffer Tris durante cinco minutos
 - Sacar las láminas del buffer, eliminar el exceso de líquido con papel absorbente sin desecar el tejido y agregar el anticuerpo secundario en la misma cantidad del

primario. Incubar durante 15 a 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente

- Nuevamente lavar tres veces con buffer Tris las láminas y depositar en vaso Coplin con buffer Tris durante cinco minutos
- Sacar las láminas del buffer, eliminar el exceso de líquido con papel absorbente y cubra el tejido de acuerdo a su tamaño con Super Enhancer (BioGenex HK 518-YAK) e incubar por 20 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente
- Nuevamente lavar tres veces con buffer Tris las láminas y depositar en vaso Coplin con buffer Tris durante cinco minutos
- Sacar las láminas del buffer, eliminar el exceso de líquido con papel absorbente y cubrir el tejido de acuerdo a su tamaño con Polyp-HRP (BioGenex HK 519-YAK) e incubar por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente
- Preparar el reactivo de DAB (BioGenex HK 520-YAK) mezclando 1 mL de buffer peróxido con una gota de solución matriz de Diaminobencidina en un Eppendorf. Realizar este procedimiento bajo campana de extracción de gases. Evitar inhalar en vapor de la DAB
- Centrifugar esta solución a 11000 rpm durante 3 minutos
- Nuevamente lavar tres veces con buffer Tris las láminas y depositar en vaso Coplin con buffer Tris durante cinco minutos
- Secar las láminas con papel absorbente evitando desecar el tejido. Bajo campana de extracción de gases aplicar la cantidad necesaria de reactivo diluido DAB sobre el tejido
- Observar al microscopio la aparición del color café y deje actuar el cromógeno aproximadamente por dos minutos o hasta obtener la coloración deseada.

- Introducir la lámina en agua corriente para detener la reacción de la DAB. Completado el proceso con todas las láminas ubíquelas en canastilla portaláminas y llévelas a un recipiente con agua corriente y lávelas exhaustivamente.
- Eliminar las impurezas del recipiente de Hematoxilina con papel absorbente.
- Contraste con Hematoxilina de Harris por 5 segundos. Realice azulamiento con agua amoniacal.
- Lavar con Tween 20 diluido para eliminar la coloración de fondo y la inespecificidad
- Deshidratar el tejido con etanol en concentraciones ascendentes con pases de tres minutos por cada paso
- Aclarar las láminas con tres pasos por Xilol de tres minutos cada uno
- Sacar las láminas del Xilol y limpie su exceso. Agregue una gota de Citoresina con un toque de Xilol a la lámina y cubra con laminilla
- Rotular las láminas, embáelas y entréguelas para su distribución.

La interpretación del resultado del proceso de inclusión de tejidos es una valoración subjetiva realizada por el personal profesional a cargo del procedimiento, y se basa en su experiencia y conocimiento. El desenlace óptimo del procedimiento se traduce en una apariencia “sui generis” de las láminas que se describen brevemente a continuación:

- Láminas montadas con laminillas sin exceso de medio de montaje es las que se identifica claramente el número de caso y reactivo.
- Láminas visualizadas al microscopio de luz con escasa o nula reactividad de fondo y reactividad adecuada en áreas claramente definidas con patrón citoplasmático o de membrana. Dicha reactividad genera un color café.

Estas características mencionadas, se traducen en la consecuencia de una adecuada acción de los técnicos y profesionales, al ejecutar los pasos que dependen de su pericia con respecto del procedimiento, de los reactivos utilizados y el buen estado de los dispositivos. Si en la ejecución del proceso existieron fallas, se pueden observar características como: Láminas con escasa o nula reactividad o excesiva reactividad de fondo que haga imposible una interpretación adecuada del tejido.

4.9.3 Cultivo de sinoviocitos de membrana sinovial, fibroblastos de piel y medición de IL-20 en sobrenadantes de cultivo

4.9.3.1 Estandarización de cultivos primarios de sinoviocitos

- La membrana sinovial (MS) es recolectada en medio RPMI 1640 conteniendo penicilina-estreptomicina (100 u/ml penicilina y 100 ug/ml estreptomicina) (Gibco) y suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) al 5%
- El tejido será digerido empleando Colagenasa tipo II, 0,2 % por 4h en incubadora a 37C y 5% CO₂ en medio RPMI 1640 conteniendo penicilina-estreptomicina (100 u/ml penicilina y 100 ug/ml estreptomicina) (Gibco)
- Luego de la digestión enzimática, el tejido será centrifugado por 10 min a 1.500 rpm.
- El sobrenadante producto de la centrifugación, será pasado por membrana de nylon para coleccionar todo el material particulado
- Luego se realizará recuento celular y medición de viabilidad empleando azul tripán (1:1) tomando una alícuota del sobrenadante
- Posteriormente, éste será colocado en botellas de cultivo de 25 cm² en medio RPMI 1640 conteniendo penicilina-estreptomicina (100 u/ml penicilina y 100 ug/ml estreptomicina) (Gibco) y suplementado con suero fetal bovino (SFB)(Gibco) al 20%
- El sobrenadante conteniendo las células adherentes (sinoviocitos) será cultivado en a 37 C y 5 % de CO₂ hasta que las células lleguen a confluencia (5-7 días).

- Durante este tiempo, se harán cambios con medio RPMI 1640 conteniendo penicilina-estreptomicina (100 u/ml penicilina y 100 ug/ml estreptomicina) (Gibco), para mantener el cultivo en condiciones óptimas y retirar las células no adherentes
- El cultivo primario, será tratado con Tripsina /EDTA al 0,25 % y los sinoviocitos se cultivarán a una concentración celular de 1×10^5 células/ml de RPMI con SBF en placa de 24 pozos
- Posteriormente los sinoviocitos serán estimulados con TNF- alfa 10 ng/ml (BIOLEGEND) por 24h, para estimular la producción de citoquinas
- Luego de este tiempo, el sobrenadante de cultivo será tomado para evaluar la secreción de IL-20 empleando un kit de ELISA (Thermofisher-Invitrogen).(23,24,25,26).

4.9.3.2 Medición de citoquinas por ELISA

IL-20 será medida en sobrenadantes de cultivo, luego de estímulo con TNF alfa, de acuerdo con el protocolo establecido en el numeral 2.1, empleando un kit comercial. (Invitrogen). El proceso se llevará a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

5. Análisis estadístico

El análisis de la información se realizará utilizando un Software estadístico Stata (13.0). Las variables cuantitativas se presentarán en forma de medidas de resumen y dispersión, según su distribución estadística, la cual será evaluada con la prueba Shapiro-Wilks. Las variables cualitativas se presentarán en forma de frecuencias absolutas y relativas.

6. Consideraciones éticas

La participación de los individuos del estudio fue completamente voluntaria, se solicitó la firma del consentimiento informado donde se encuentra consignada la información necesaria del proyecto, los objetivos, los riesgos de la participación, expresados en lenguaje cotidiano. Adicionalmente se informa que el grupo de investigadores no realizará intervención alguna sobre su ser, sino que solicitará al médico tratante un pequeño fragmento de la muestra extraída para poder ser analizada en la Universidad Nacional de Colombia, para objeto de esta investigación.

El presente estudio cumple con los requisitos para la investigación en humanos según la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud. De acuerdo al artículo 11 de la misma resolución se pueden identificar una categoría de riesgo mínimo para el presente estudio, dado que se analizarán los fragmentos de los pacientes con indicación clínica **y terapéutica durante procedimiento programado por el servicio de ortopedia y reumatología.**

El estudio no pretende evaluar recursos profilácticos, tampoco terapéuticos en el tratamiento de la Osteoartritis. Los pacientes continuaron con el esquema de tratamiento sin modificaciones por el grupo de investigación.

7.Resultados

La presente serie de casos consta de 9 pacientes con diagnóstico de OA de rodilla e indicación de reemplazo articular realizada entre mayo 2018 y junio de 2019, con edad promedio de 62.7 años (SD 16) al momento quirúrgico y toma de la muestra, la mayoría de los casos son de sexo femenino 8 (88.9%), peso promedio fue de 66.1 Kilos (SD 10.9) e IMC de 27.8 (SD 4.8). Entre las principales comorbilidades destacan hipertensión arterial en 3 pacientes (33.3%), diabetes mellitus tipo 2 en dos casos (22%), hipotiroidismo 3 casos, osteoporosis 2 casos, osteoporosis 2 y un paciente (11%) con autoinmunidad dada por espondilitis anquilosante y uveítis; el número de pacientes con dos o más comorbilidades fue de 3 (33%).

La mediana de tiempo en meses desde el inicio de los síntomas articulares en rodilla hasta el reemplazo articular fue de 21 meses (RIC 11.5 - 72), Entre las modalidades de manejo usadas previo a la cirugía fueron, terapia física en 7 pacientes (77.8%), corticoides orales y/o infiltraciones en 4 (44.4%), opioides en 5 pacientes (55.6%) y AINES en el 100% de los pacientes; 8 (88.9%) requiriendo manejo farmacológico multimodal .

Tabla 1. Características demográficas

Variable	
Edad al reemplazo articular (años) (SD)	62.7 (16)
Sexo femenino No (%)	8 (88.9)
Peso (Kilos) (SD)	66.1 (10.9)
IMC (SD)	27.3 (4.8)
Antecedentes No (%)	
HTA	3 (33.3)
DM	2 (22.2)
Hipotiroidismo	3 (33.3)
Osteoporosis	2 (22.2)
Manejo previo a Cirugía No (%)	
Fisioterapia	7 (77.8)
Corticoides*	4 (44.4)
AINES	9 (100)
Opioides	5 (55.6)

Tiempo desde síntomas a cirugía (meses) Mediana (RIC)	21 (11.5 - 72)
Puntaje de sinovitis*	2.11 (2.2)

***Corticoides orales y/o inyectados**

SD Desviación estándar para variables con distribución normal

RIC: Rango intercuartil en distribución no normal

***Puntaje de inflamación de sinovitis, mínimo 0: sin inflamación, máximo 9 a mayor grado de inflamación.**

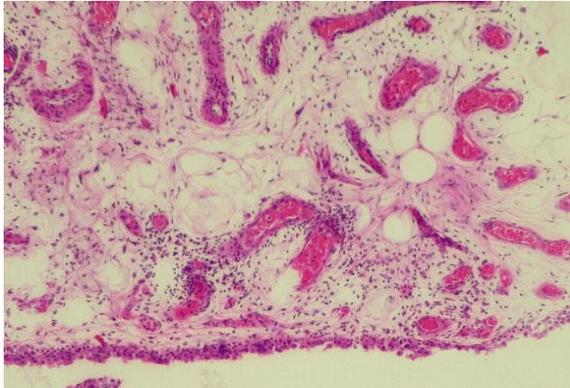
El puntaje de sinovitis medio fue de 2.11 (DS 2.2), 5 casos con puntaje 0-1 sin evidencia de sinovitis (55.6%), 3 casos con puntaje 2-4 para sinovitis de bajo grado (22%) y 1 caso con puntaje 5-9 para sinovitis de alto grado (11%), sin correlación alguna con sus comorbilidades.

Tabla 2. Características individuales de cada paciente

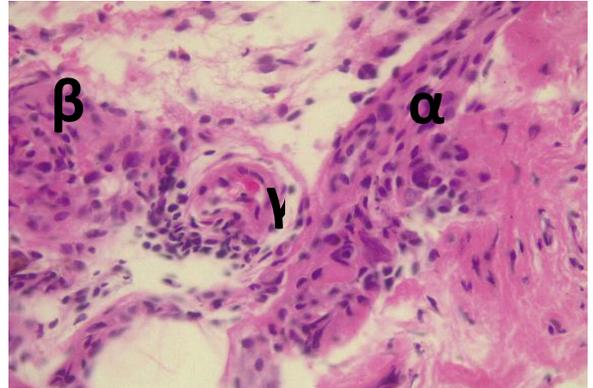
Caso	Edad	Sexo	IMC	Comorbilidades	Manejo previo	Tiempo a cirugía	Puntaje de Sinovitis
1	55	F	23,3	No	Fisioterapia/ AINES	14	0
2	30	F	24,3	No	Fisioterapia/ AINES / Opioides	7	0
3	52	M	29,5	Espondilitis/Uveítis	Fisioterapia/ Corticoides / AINES	11	1
4	69	F	30,4	Hipotiroidismo	Fisioterapia/ Corticoides / AINES	36	0
5	84	F	23,6	Hipotiroidismo	Corticoides / AINES / Opioides	24	6
6	60	F	23,4	Osteoporosis	Fisioterapia/ AINES / Opioides	12	1
7	65	F	38,0	HTA / DM2	AINES / Opioides	21	4
8	71	F	28,6	HTA / DM2 / Osteoporosis	Fisioterapia/ AINES	204	4
9	78	F	29	HTA / Osteoporosis	Corticoides / AINES / Opioides	108	3

HTA: Hipertensión arterial, DM2: Diabetes mellitus Tipo 2,

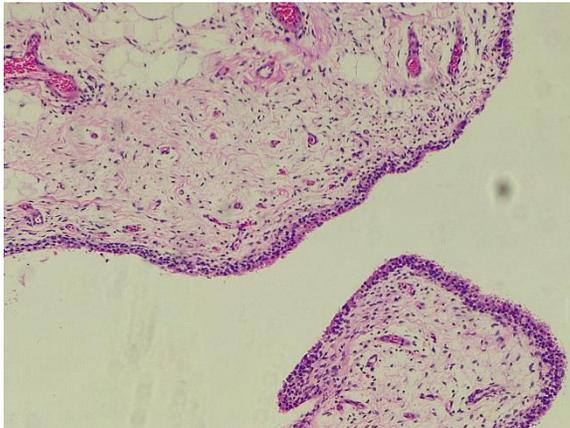
En la imagen podemos evidenciar las diferencias histológicas encontradas en los casos 7, 5 y 4, con puntajes representantes los diferentes grados de sinovitis, se logra identificar claramente la diferencia de la celularidad:



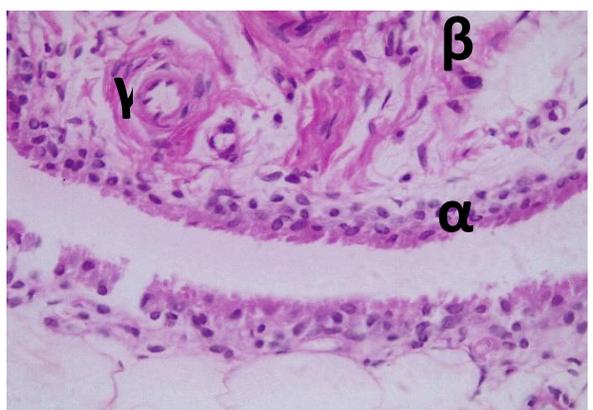
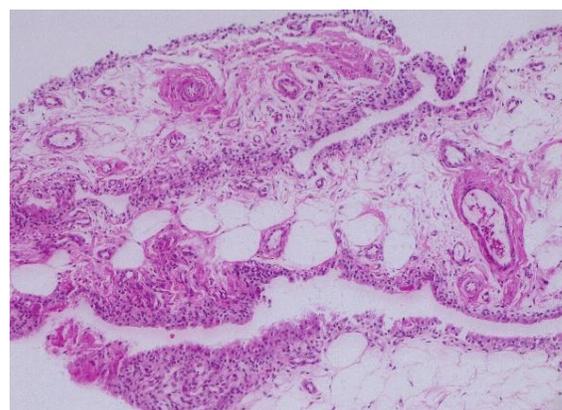
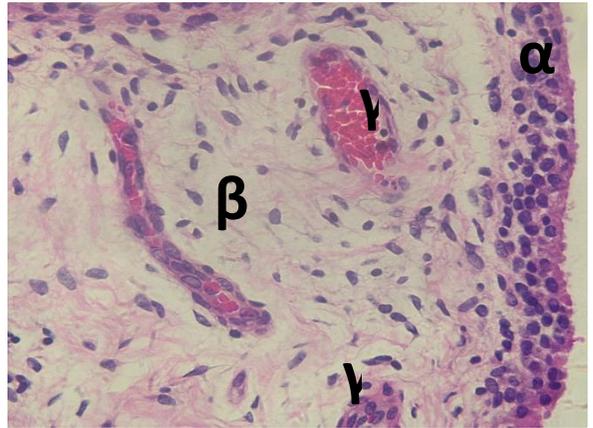
Caso 4, puntaje 0



Caso 5, puntaje 6



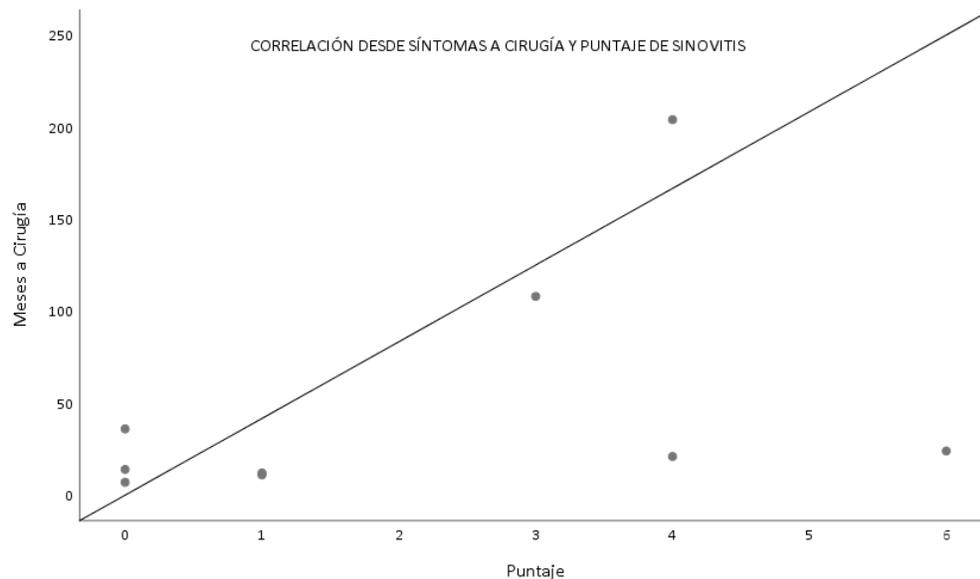
Caso 7, puntaje 4



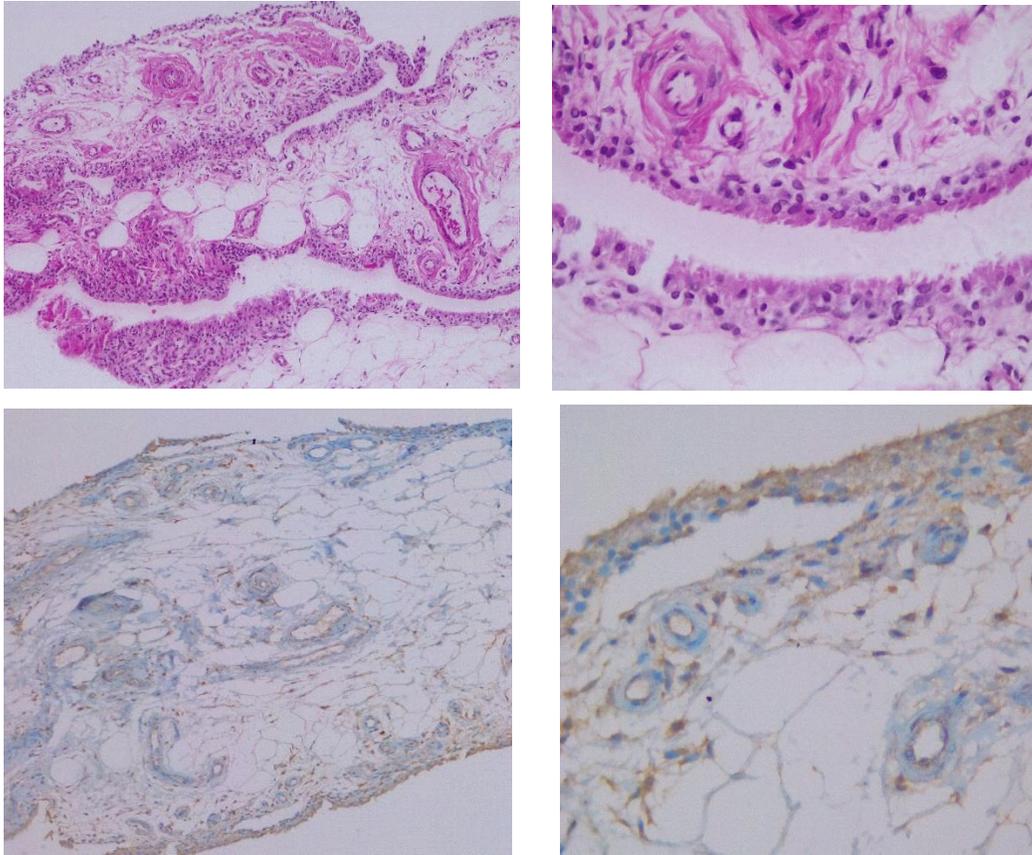
Revestimiento sinovial (α), densidad estromal (β) e infiltrado inflamatorio (γ).

Al evaluar la correlación entre el grado de sinovitis al momento quirúrgico (severidad) y el tiempo desde el inicio de los síntomas (progresión) no se halló adecuada correlación ($r=0.48$, $p = 0.18$) (Grafica 1), tampoco se halló asociación estadística para con el uso o no de AINES y/o corticoides con mayor o menor grado de inflamación ($p>0.05$ para todas las pruebas)

Grafica 1. Correlación en tiempo a manejo quirúrgico e inflamación por sinovitis



Como parte del protocolo del proyecto se evaluó la marcación de IL-17A e IL20 mediante inmunohistoquímica de las primeras 4 muestras, para su valoración cualitativa, encontrando que pese a tener un puntaje de sinovitis 0 (cero), considerado sin compromiso infalatorio histológico (sin “*sinov-itis*”) se evidencian agregados citoplasmáticos de IL-17A mediante el color café y los núcleos de perfil redondeado en coloración azul como se muestra en este ejemplo del caso número 4.



En el revestimiento sinovial se observa una fuerte señal citoplasmática, los núcleos presentan una tinción azul que se distingue con facilidad

8. Discusión

Esta serie de casos compone el estudio inicial del proyecto **“Evaluación de la inflamación y la producción de IL-20 e IL-17^a en membrana sinovial en pacientes con osteoartritis de rodilla”**, en la cual se busca establecer la existencia de un compromiso inflamatorio en la membrana sinovial y su relación con la severidad y progresión de la OA, se compone de 9 casos con distribución similar a estudios previos, predominio de mujeres (88.9%), de edad variable (30 a 84 años en la serie) con tendencia al sobrepeso (IMC medio 27.3) (4)(10). Pese a ser una pequeña muestra presenta distribución similar justificando su análisis inicial para el proyecto, además no se disponen de estudios in vivo, para el análisis bioquímico (IL-17A, IL-20).

Entendiendo la OA como una patología inflamatoria el puntaje de sinovitis permite la cuantificación de un patrón cualitativo mediante estándares descritos y validados, donde el puntaje para la sinovitis en la OA va de 0 a 6 puntos, al igual que lo encontrado en esta serie, entendiendo el mayor puntaje según el grado de progresión y severidad (22),(27). En esta serie no se halló ninguna relación entre el tiempo de progresión, la severidad o terapéutica de la OA que se correlacionara con el puntaje de sinovitis, pese a contar con estadios severos de la enfermedad que condicionaron el manejo quirúrgico, con una media de duración en meses de 21, superior a los estudios descritos (22),(27). Esto puede ser atribuible a la heterogeneidad de la enfermedad, al distinguirse como un proceso inflamatorio de distribución irregular y confinada a áreas adyacentes a los sitios de la condropatía, con hallazgos histológicos variables según la zona tomada para la histología (19). Así mismo la descripción de dos formas distintas de la enfermedad, una primada por un componente pro-inflamatorio de características genéticas, y otra asociada al estrés constante de la articulación (3). Otro punto a considerar es el pequeño tamaño de la muestra no suficiente para demostrar alguna relación en cualquiera de los dos escenarios.

En un estudio previo del mismo proyecto sobre la IL-20 en OA se identificó la marcación de IL-20 mediante inmunohistoquímica en la patología de las biopsias iniciales, así mismo con un puntaje de 0 del puntaje de sinovitis, sin evidencia de mayor patrón inflamatorio, hallazgo que puede suponer la evidencia de citoquinas como la IL-20 y potencialmente IL-17A como biomarcadores iniciales de la OA previo al compromiso inflamatorio de la enfermedad, considerando la pertinencia de continuar el proyecto para la cualificación de la IL-20 como un marcador objetivo en la OA (28).

En conclusión se demuestra de un proceso inflamatorio importante asociado con Osteoartritis documentado histopatológicamente.

Se evidencia presencia de IL 20 e IL-17^a en los pacientes con Osteoartrosis permitiendo su cuantificación.

Bibliografía

1. Egloff C, Hügle T, Valderrabano V. Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. *Swiss Med Wkly*. 2012;142(July):1–14.
2. Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2015;11(1):35–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25266449>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4374654>
3. Honorati MC, Bovara M, Cattini L, Piacentini A, Facchini A. Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2002;10(10):799–807.
4. A. L, S. B, G.J. P, D. S, A. F, C. G. Presence of interleukin-17 in osteoarthritis: Does it indicate a different osteoarthritis phenotype. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2015;23(2015):A321. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=71907078>
5. Benderdour M, Tardif G, Pelletier JP, Di Battista JA, Reboul P, Ranger P, et al. Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: Differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1?? *J Rheumatol*. 2002;29(6):1262–72.
6. Chen B, Deng Y, Tan Y, Qin J, Chen L-B. Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations. *J Int Med Res* [Internet]. 2014;42(1):138–44. Available from: <http://imr.sagepub.com/content/42/1/138.full>
7. Deligne C, Casulli S, Pigenet A, Bougault C, Campillo-Gimenez L, Nourissat G, et al. Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. *Osteoarthr Cartil*. 2015;23(11):1843–52.
8. Liu Y, Peng H, Meng Z, Wei M. Correlation of IL-17 Level in Synovia and Severity of Knee

- Osteoarthritis. *Med Sci Monit* [Internet]. 2015;21:1732–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26076201>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4480114>
9. Southam L, Heath O, Chapman K, Loughlin J. Association analysis of the interleukin 17 genes IL17A and IL17F as potential osteoarthritis susceptibility loci. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2006;65(4):556–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1798089&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 10. Wang K, Xu J, Cai J, Zheng S, Yang X, Ding C. Serum levels of resistin and interleukin-17 are associated with increased cartilage defects and bone marrow lesions in patients with knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol* [Internet]. 2016;7595(July):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27400438>
 11. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(5):1108–11.
 12. Wei CC, Hsu YH, Li HH, Wang YC, Hsieh MY, Chen WY, et al. IL-20: Biological functions and clinical implications. *J Biomed Sci*. 2006;13(5):601–12.
 13. Leng R-X, Pan H-F, Tao J-H, Ye D-Q. IL-19, IL-20 and IL-24: potential therapeutic targets for autoimmune diseases. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2011;15(2):119–26. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-78651375087&partnerID=tZOtx3y1>
 14. Hsu Y-H, Yang Y-Y, Hwang M-H, Weng Y-H, Jou I-M, Wu P-T, et al. Anti-IL-20 monoclonal antibody inhibited inflammation and protected against cartilage destruction in murine models of osteoarthritis. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(4):e0175802. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28426699>
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0175802>
 15. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.
 16. Xu W. Interleukin-20. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(5):627–33.
 17. Hsu Y, Chang M. Review The Therapeutic Potential of Anti-Interleukin-20 Monoclonal Antibody. 2014;23(3):631–9.
 18. Hsu YH, Li HH, Hsieh MY, Liu MF, Huang KY, Chin LS, et al. Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis.

- Arthritis Rheum. 2006;54(9):2722–33.
19. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2010;6(11):625–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20924410>
 20. Miller M-C, Manning HB, Jain A, Troeberg L, Dudhia J, Essex D, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2009;60(3):686–97. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2819053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 21. Gualco G, Prodanov A y cols. Papel de la biopsia sinovial en reumatología. Análisis de 80 casos. *Rev Med Uruguay* 2000; 16: 14-17
 22. Krenn V, et al. 15 years of the histopathological synovitis score, further development and review: A diagnostic score for rheumatology and orthopaedics, *Pathol. – Res. Pract* 2017
 23. Natsuko Kusunoki, Ryuta Yamazaki and Shinichi Kawai. *Arthritis and Rheumatism*.2002. Induction of apoptosis in rheumatoid synovial fibroblasts by celecoxib, but not by other selective cyclooxygenase 2 inhibitors. <https://doi.org/10.1002/art.10692>
 24. Hiroshi Sato, et al. *Arthritis Research & Therapy*.2017. Resistin upregulates chemokine production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1472-0>.
 25. Takashi Emori. *J Immunol*. 2018. Integrin $\alpha 9$ Augments Self-Directed Hyperplastic and Proinflammatory Properties of Fibroblast-like Synoviocytes of Rheumatoid Arthritis. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700941>.
 26. Elke Kunisch, et al. 2009. *The Journal of Rheumatology*. Prostaglandin E2 Differentially Modulates Proinflammatory/Prodestructive Effects of TNF- α on Synovial Fibroblasts via Specific E Prostanoid Receptors/cAMP. DOI: 10.4049/jimmunol.0900801.
 27. Krenn V., Morawietz L., Burmester G., Kinne R., Mueller-Ladner U., Muller B., Haupl T. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis, *Histopathology*, 49, págs. 348 (2006).
 28. Silva D., Rojas A. Estudio de Interleuquina-20 (IL-20) en Osteoartritis. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Bogotá D.C., Colombia