



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

*PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD*

“COMPORTAMIENTO DE BIOMARCADORES DE OSTEOARTRITIS EN PACIENTES CON RECONSTRUCCIÓN DE LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

JAIME DANTE PALOS LUCIO

TUTORA DE TESIS:

DRA. ANELL OLIVOS MEZA

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN – LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DR. JAIME DANTE PALOS LUCIO
ALUMNO

DRA. ANELL OLIVOS MEZA
TUTORA DE TESIS

DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES
RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

ÍNDICE

Introducción.....	Pág. 4
Planteamiento del Problema.....	Pág. 7
Pregunta de Investigación.	Pág. 8
Justificación.	Pág. 9
Objetivos.	Pág. 11
Hipótesis.	Pág. 12
Métodos.	Pág. 13
Resultados.	Pág. 20
Discusión.	Pág. 32
Conclusiones.	Pág. 37
Bibliografía.	Pág. 38

“COMPORTAMIENTO DE BIOMARCADORES DE OSTEOARTRITIS EN PACIENTES CON RECONSTRUCCIÓN DE LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR”

Palos-Lucio J, Olivos-Meza A, Landa-Solís C, León-Hernández S, Pérez-Jiménez F, Ibarra C.

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente el 50 % de los pacientes con lesión del ligamento cruzado anterior (LCA), desarrollará osteoartritis postraumática (OAPT) en un lapso de 10 a 20 años a pesar de recibir tratamiento quirúrgico o conservador.^{1,2,3,4} La mayoría de los pacientes que presentan lesión del LCA son jóvenes deportistas o adultos en edad productiva que tendrán probablemente alguna limitación funcional o dolor, con las consecuencias físicas y laborales que esto conlleva. Se estima, que de el total de casos de osteoartritis (OA) sintomática, el 12 % corresponde a OAPT de cadera, rodilla o tobillo, y en el caso específico de OA de rodilla el 9.8% es de origen postraumático.⁵

Existe evidencia de que múltiples factores alteran la homeostasis bioquímica y biomecánica de la articulación de la rodilla posterior a la lesión de LCA. Al momento de la lesión del LCA, ya sea aislada o en combinación con alguna lesión condral, meniscal u ósea, iniciará una cascada inflamatoria y de actividad catabólica dentro de la articulación que llevará a un deterioro del cartílago articular, con la presencia de dolor, inestabilidad, limitación en el arco de movimiento, artrofibrosis y finalmente OAPT.^{6,7}

Aunque los estudios de imagen son indispensables en el diagnóstico de OAPT, no es hasta después de algunos años de la lesión, que se logran identificar cambios degenerativos, momento en el que ya se habrán establecido alteraciones bioquímicas intra-articulares, con la presencia de biomarcadores de osteoartritis (B-OA), principalmente productos de degradación del cartílago.⁷

El estudio de biomarcadores de osteoartritis B-OA, que son moléculas o fragmentos moleculares resultado del metabolismo del tejido articular, se propuso como un complemento e incluso sustituto más sensible que las técnicas de imagen actuales para detectar OA de forma temprana. Los B-OA se clasifican con las siglas BIPED (acrónimo en inglés), en 5 categorías de acuerdo al propósito que se le asigna a cada biomarcador para el estudio de OA: *Burden of Disease, Investigative, Prognosis, Efficacy of Intervention, Diagnosis*.⁸

En el año 2015, Harkey et al, realizaron una revisión sistemática incluyendo diversos B-OA, en pacientes con ruptura de LCA sometidos a tratamiento quirúrgico o conservador. Mostrando resultados inconclusos con respecto a qué biomarcadores de OA indicarán mayor progresión a OAPT, debido a la falta de estandarización en el reporte de resultados, sugiriendo apegarse a los criterios BIPED.⁹

Posteriormente, Lattermann et al, en 2018, llevaron a cabo un estudio piloto donde se midieron B-OA en pacientes con lesión de LCA, tomando *una* determinación el día de la reconstrucción de LCA (R-LCA) y correlacionando dichos valores con el estado funcional a los 2 años del post operatorio, concluyeron que niveles iniciales elevados de B-OA son predictores malos resultados funcionales y que tales cambios no son mitigados con la R-LCA.¹⁰

Actualmente no existe tratamiento alguno, incluyendo la R-LCA, que evite o retrase la presencia de OAPT posterior a la lesión del LCA, y debido a la falta de métodos de evaluación en estadios tempranos de la enfermedad, tampoco se cuenta con medidas efectivas de prevención. El estudio de B-OA posterior a la lesión y R-LCA ayudará a comprender, tratar y prevenir de manera eficaz y temprana la OAPT.

También desconocemos en que subgrupos de riesgo, que presenten ruptura del LCA tendrán mayor progresión a OAPT, con lo que la determinación de B-OA, podrá identificar en quienes se deban de establecer medidas preventivas de forma rutinaria.

A diferencia de la OA primaria, en la OAPT podemos identificar un punto de inicio de la enfermedad, que puede permitirnos realizar intervenciones tempranas además de la R-LCA, que mejoren el pronóstico de los pacientes a mediano y largo plazo.^{7,10}

En este estudio pretendemos describir, por medio del comportamiento de biomarcadores de degradación de cartílago y proteasas (CTX-II y MMP-3 respectivamente); si existirá un cambio significativo a pesar del tratamiento quirúrgico, comparando niveles basales el día de la R-LCA y a los 2 años del procedimiento; e identificar si factores como el sexo, edad, tiempo de evolución, presencia de lesión meniscal y/o condral, tienen alguna relación con el comportamiento de los B-OA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La lesión de LCA en la población joven ha demostrado ser un factor de riesgo para OAPT, con modelos de proporción estimada (IC 95%) a los 5, 10 y 20 años posteriores a la R-LCA, de 11.3% (6.4%-19.1%), 20.6% (14.9%-27.7%), and 51.6% (29.1%-73.5%) respectivamente, representando un deterioro importante en la calidad de vida y una disminución de la vida productiva.³

Esta progresión es multifactorial, sin embargo, se ha reportado mayor prevalencia cuando la lesión del LCA se presenta de manera concomitante con lesiones meniscales o de cartílago, ($r=0.72$ y $r=0.41$ respectivamente, $p=0.001$).¹¹

Aun no se cuenta en nuestro medio con ningún método de evaluación temprana posterior a la lesión de LCA por medio del cual podamos determinar qué población a pesar de ser sometida a R-LCA, se encuentra en mayor riesgo de desarrollar OAPT.

A pesar de que el objetivo primario de la cirugía es brindar estabilidad a la rodilla, no se conoce con certeza el alcance de dicho procedimiento para disminuir el riesgo de OAPT.¹² Por tal motivo es de suma importancia contar con métodos que ayuden a detectar población en riesgo, y aplicarlos en quienes aunado a la lesión de LCA cuenten con factores adicionales para desarrollar progresión e incluso determinar subgrupos de mayor riesgo de acuerdo a las características demográficas o de la lesión *per se*.

Al describir el comportamiento de B-OA (CTx-II y MMP-3) e identificar si variables como lesión meniscal, grado de lesión condral y tiempo de evolución de la lesión, permitirá establecer de acuerdo con las características del paciente, quienes se encuentran en mayor riesgo de desarrollar OAPT, y en un futuro próximo poder tomar las medidas pertinentes, antes, durante y después del tratamiento quirúrgico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Existirá un cambio significativo en el comportamiento de biomarcadores de osteoartritis (CTx-II, MMP-3) a pesar de la reconstrucción del ligamento cruzado anterior a 2 años de seguimiento?

JUSTIFICACIÓN

Aproximadamente 175,000 reconstrucciones de LCA se realizan anualmente en los Estados Unidos, y a pesar del resultado final de la reconstrucción del LCA, aproximadamente un tercio progresará a OAPT en los primeros 10 años.⁹

En el Instituto Nacional de Rehabilitación – Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INRLGII) se realizan aproximadamente 150 cirugías de reconstrucción de LCA anualmente en pacientes de 14-50 años de edad. No sabemos con certeza, cuantos de estos pacientes evolucionan de manera satisfactoria a largo plazo y cuantos desarrollarán OAPT, y de ser así, desconocemos las características demográficas y de la lesión, así como el lapso de tiempo en que presentaron síntomas o signos compatibles con OAPT.

A pesar de que existen estudios de B-OA en poblaciones similares, aún existen brechas con respecto al comportamiento de los mismos en estadios iniciales. Por ejemplo; cuáles son los más sensibles en detección de cambios tempranos, cual es la causa que realmente origina los cambios, que factores de riesgo coinciden entre los diversos estudios para perpetuar su detección y aumento, así como que rangos de concentración de los distintos biomarcadores podemos considerar para progresión a OAPT.

Realizar un estudio donde evaluamos dos biomarcadores relevantes, CTx-II como producto de la degradación de colágena tipo II en orina (U-CTx-II) y MMP-3 como producto de degradación de la matriz en suero (S-MMP-3), así como indicador de un aumento prolongado de la cascada inflamatoria, permitirá conocer el comportamiento de los mismos posterior a la R-LCA y determinar si los cambios que se presenten están asociados con alguna lesión articular además de la ruptura del LCA o si la presentación concomitante de algún factor como sexo o tiempo de evolución, acelerará la presencia de OAPT.¹³

Conocer estos datos podrá orientarnos para identificar población de riesgo y tomar las medidas pertinentes para disminuir en un futuro próximo la incidencia de OAPT.

Es posible que con un mayor número de estudios y con el reporte adecuado de los B-OA, podamos realizar de manera rutinaria la medición de ciertos biomarcadores en subgrupos de riesgo y desarrollar medidas efectivas preventivas y de tratamiento para retrasar la progresión de la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Describir el comportamiento de biomarcadores de osteoartritis (CTx-II y MMP-3) en pacientes con R-LCA a 2 años de post-operados.

Objetivo Secundario:

- Determinar si existe relación de los niveles de B-OA con la presencia de alguna lesión articular (lesión meniscal o grado de lesión condral), edad, sexo o tiempo de evolución de la lesión.

HIPÓTESIS

- Se identificará un aumento estadísticamente significativo en las concentraciones de biomarcadores de osteoartritis (CTx-II y MMP-3), en pacientes con lesión de ligamento cruzado anterior que se sometan a R-LCA, a 2 años del post-operatorio.

MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO. Es un estudio descriptivo y observacional, con seguimiento a 2 años.¹⁴

Previo a llevar a cabo el estudio, recibimos la aprobación del Comité de Ética y Comité de Investigación del INR-LGII, con número de acuerdo: AG-4 (SCA/CM/SE1/20).

CONTEXTO. El estudio se llevó a cabo en el INRLGII en la Ciudad de México, en el Servicio de Artroscopia y Lesiones Deportivas, durante el periodo de febrero del 2017 a febrero del 2020, periodo durante el cual del año 2017 al 2018 se realizó el reclutamiento de pacientes, finalizando con el seguimiento a 2 años en febrero de 2020. Los datos fueron colectados en forma prospectiva por medio de interrogatorio directo al paciente y tomando datos objetivos de su expediente clínico electrónico.

PARTICIPANTES. Se seleccionaron pacientes del Servicio de Artroscopia y Lesiones Deportivas que se ingresaron a Hospitalización para recibir tratamiento quirúrgico consistente en Reconstrucción de Ligamento Cruzado Anterior con Autoinjerto, que tuvieran diagnóstico confirmado clínicamente y por imagen de resonancia magnética compatible con ruptura completa de ligamento cruzado anterior y que cumplieran con los criterios del estudio. (Tabla 1) El seguimiento de los pacientes se realizó por consulta externa, y al cumplir los 2 años del postoperatorio se otorgó una cita formal para completar el protocolo.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
16- 45 años	Enfermedades reumáticas
Ambos sexos	Antecedente de fracturas intra-articulares
Diagnóstico clínico y por imagen de ruptura completa del ligamento cruzado anterior	Descompensación metabólica
IMC < 30	Proceso infeccioso concomitante
Valgo <9°	Post-meniscectomía
Varo <5°	

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión del estudio.

TOMA DE MUESTRAS DE SUERO Y ORINA. Previo a la toma de muestras, se les informó a los pacientes la finalidad del estudio y en caso de estar de acuerdo en participar en el mismo firmaron un consentimiento informado donde se comprometieron a cumplir con sus citas de seguimiento en tiempo y forma durante 2 años.

Para el estudio de los B-OA se tomaron muestras de sangre y orina, en el preoperatorio y a los 2 años de la cirugía de R-LCA.

Dado que los biomarcadores están relacionados con el ciclo circadiano, la muestra de orina se tomó de la primera micción, previo ayuno de al menos 8 horas, de chorro medio y con previa asepsia del área genital. Se tomó en el tubo colector indicado para muestras de orina y se pasó a centrifugado inmediato a 1000g durante 10 minutos.

Para la muestra de suero, se extrajeron 5 ml de sangre venosa de la vena mediana cubital, en tubo colector vacutainer, y se refrigeraron las muestras antes de pasar a centrifugado a 1000g durante 15 minutos.

Una vez que se contaba con ambas muestras, se almacenaron sus alícuotas en tubos Eppendorf de 1.5 ml a -20° Celsius, para su uso en determinaciones ELISA.

Para la segunda toma de muestras a los 2 años del post-quirúrgico se dio una cita formal a cada participante para presentarse en ayuno, por la mañana a un área asignada del Servicio de Artroscopia y Lesiones Deportivas para la toma de muestra de sangre y previamente se dieron indicaciones precisas para que el paciente llevara de forma estéril la muestra de orina para únicamente pasarla al tubo colector correspondiente.

Nuevamente las muestras fueron centrifugadas y se congeló la alícuota de las mismas para posteriormente ser evaluadas por medio de ELISA.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO. Los pacientes fueron sometidos a reconstrucción de LCA con técnica de portal medial con injerto autólogo de isquiotibiales.¹⁵ Durante el procedimiento se registró la presencia de lesiones meniscales y/o condrales, describiendo las características y grado de las mismas en el apartado de hallazgos de la nota post operatoria.

BIOMARCADORES DE OSTEOARTRITIS. Como lo definió Bauer et al en 2006, los biomarcadores son indicadores objetivos de un proceso biológico normal, de un proceso patogénico y de una respuesta a una intervención terapéutica. Además, su estudio ha permitido entender la patogénesis de la OA de forma clara. A pesar de diversos estudios de biomarcadores en pacientes con R-LCA, aún se sugiere estandarización en el reporte de los B-OA, apegándose a los criterios BIPED.^{8,9}

En la OAPT, la degradación de la colágena del cartílago articular, es la característica principal. En el cartílago hialino, la colágena tipo II es la más abundante, por lo cual los principales biomarcadores de recambio del cartílago, son los epítopes derivados de esta.¹⁶

En este estudio decidimos utilizar dos B-OA, el primero de ellos: CTx-II urinario (U-CTx-II), marcador de la degradación de la colágena tipo II y cuyas concentraciones permanecen elevadas por mayor tiempo en orina versus líquido sinovial y suero, y que también se encuentra en mayores concentraciones posterior al trauma de rodilla, correlacionando con mayor progresión a OAPT. También, en estudios a largo plazo se mantiene estable en pacientes que no tienen un deterioro articular y aumenta en estadios tempranos en quienes se corrobora mayor progresión.¹⁶

El otro B-OA utilizado: Metaloproteinasa 3 en suero (S-MMP-3), que es una proteasa que degrada colágena tipo II y tejido intra-articular y que inicialmente fue descrito como indicador del metabolismo del tejido sinovial. Las metaloproteinasas son reguladas por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP's), por lo cual, desbalances en esta regulación desencadenarán mayor proteólisis a nivel articular. Se sabe, que niveles elevados de MMP-3 son predictivos de pérdida de volumen de cartílago articular con seguimiento por RMN a 2 años, por lo cual podría ser útil en

subgrupos de población en los cuales la progresión a OAPT inicie de forma temprana. En seguimiento a 30 meses, niveles basales de MMP-3 son predictores de disminución del espacio articular. En general, la presencia de metaloproteinasas es consecuencia de una cascada de citocinas que promueven un estado inflamatorio.^{17,18,19,20,21}

Ambos B-OA están clasificados de acuerdo de los criterios BIPED de la siguiente forma: U-CTx-II (B, P) y S-MMP-3 (B).²²

ELISA Y REPORTE DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMARCADORES DE OSTEOARTRITIS. Los kits para la detección de CTx-II y MMP-3 por medio de ELISA se obtuvieron de Cloud-Clone Corp (EE. UU.) y se usaron de acuerdo a el protocolo del fabricante. Se analizaron por duplicado o triplicado 100 µl de cada suero, orina y estándares.²³ Después, se añadieron 100 µL de estándar o muestra a cada pocillo y se incubó 1 hora a 37 °C; a continuación, se aspiró y se añadieron 100 µL de reactivo de detección preparado A y se incubó 1 hora a 37 °C; después, cada pozo se lavó 3 veces; más tarde se añadieron 100 µL de reactivo de detección preparado B, y se incubó 30 minutos a 37 °C; cada pocillo se lavó 5 veces, se le añadieron 90 µl de solución de sustrato y se incubaron 10-20 minutos a 37 °C. Finalmente, en cada pocillo se añadieron 50 µL de solución de parada e inmediatamente en un lector de microplacas (DTX 800, Beckman Coulter), se leyó la absorbancia a 450 nm. Las muestras se diluyeron, según lo necesario, para que la absorbancia (450 nm) se encontrara dentro del rango de la curva estándar y se realizaron por triplicado.

VARIABLES. En general la OAPT es causada por una combinación de factores locales y sistémicos que determinan la progresión y severidad de la misma. Las siguientes son las variables utilizadas en el estudio. (Tabla 2)

Edad. Se incluyeron pacientes de 16-45 años, buscando una correlación entre las concentraciones de B-OA y la edad.

Sexo. Actualmente sabemos que el sexo femenino tiene mayor susceptibilidad de ruptura del LCA por cuestiones anatómicas, por ende, mayor riesgo de presentar OAPT. Por lo cual también se buscó una asociación del sexo con las concentraciones de B-OA.

Tiempo de evolución de la lesión. El retraso en la atención de una ruptura de LCA conlleva a la presencia de inestabilidad crónica de la rodilla, que puede deteriorar el cartílago articular y tejido meniscal ocasionando progresión a OAPT de forma acelerada. En estadios agudos del traumatismo podemos obtener información del comportamiento de B-OA y reconocer si las concentraciones basales tienen repercusión en la evolución posterior a la R-LCA.

Lesión meniscal. Sabemos que una buena proporción de pacientes con ruptura de LCA presentan algún tipo de lesión meniscal y que la frecuencia aumenta con el tiempo de evolución debido a la inestabilidad de la rodilla. También la distribución por edad de acuerdo al tipo de lesión se modifica, siendo las lesiones longitudinales, por lo general de origen traumático, más frecuentes en <30 años y las lesiones degenerativas más frecuentes en >40 años.¹ La progresión a OAPT en pacientes que se someten a meniscectomía parcial o total es similar a la de pacientes con ruptura de LCA, con 50% de progresión a 10 años de la cirugía versus 16% en quienes no se realizó.^{2,24} Cabe mencionar, que existen mayores consecuencias a largo plazo en el cartílago articular de quienes se realiza meniscectomía en el compartimento lateral.^{25,26}

Grado de lesión condral. De la misma forma que las lesiones meniscales se asocian a la ruptura del LCA, también existen lesiones del cartílago articular presentes al momento de la lesión y que progresan con el tiempo. El cartílago articular está conformado en un 90-95% por colágena tipo II.²⁷ Al momento de presentarse una lesión del cartílago articular en mayor o menor grado, serán liberadas moléculas de colágena tipo II, que pueden ser detectadas por medio de diversos B-OA. Keays et al, reportaron una asociación entre el desarrollo de OAPT y la presencia de lesiones condrales tanto en el compartimento tibiofemoral como patelofemoral, ($r=0.41$ y

r=0.75, respectivamente), sin embargo, en este estudio únicamente se analizó la presencia o ausencia de lesión de cartílago sin discriminar entre el grado de lesión.¹¹

VARIABLES INDEPENDIENTES	VARIABLES DEPENDIENTES
Edad	CTx-II U (mcg/mmol)
Sexo	MMP-3 S (ng/ml)
Tiempo de evolución	
Lesión meniscal	
Grado de lesión condral	

Tabla 2. Variables independientes y dependientes del estudio.

TAMAÑO MUESTRAL. Dentro de una población de aproximadamente 150 pacientes, se tomó una muestra no probabilística, consecutiva, a expensas de aceptar la participación en el estudio, de 40 pacientes (considerando utilizar el 100% de los sets de Biomarcadores para ELISA) que cumplieran con los criterios de inclusión y que aceptaran participar en el estudio durante 2 años mediante firma de consentimiento informado distinto al consentimiento del procedimiento quirúrgico.

Es importante mencionar que el tamaño de nuestra muestra se encuentra dentro del rango considerado en estudios previos, con adecuado nivel de evidencia y puntaje metodológico dentro de la revisión sistemática realizada por Harkey et al, en el estudio de biomarcadores en pacientes con lesión de LCA.^{9,28,29}

SESGO. Al realizar una muestra por conveniencia, no se puede asegurar la representatividad de la población, sin embargo, dado el propósito del estudio y los criterios de inclusión se cumple con los objetivos del mismo. Con los criterios de exclusión se trato de controlar los factores que en mayor o menor grado alteran las concentraciones de B-OA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Con el paquete estadístico SPSS V.27 se llevo acabo el análisis estadístico. Se realizó inicialmente la estadística descriptiva de la población estudiada. Posteriormente se realizaron pruebas de normalidad a ambos biomarcadores con

prueba de Shapiro-Wilks dado el tamaño muestral ($n < 50$), al comprobar la distribución anormal de ambos biomarcadores, así como de la diferencia de la primera y segunda medición, se continuo el análisis con el uso de pruebas no paramétricas principalmente estadístico de rangos de Wilcoxon y correlación de Spearman. Para analizar cada una de las variables la población total fue segmentada de acuerdo a la variable a estudiar.

RESULTADOS

PARTICIPANTES Y ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.

Obtuvimos una muestra 40 pacientes, de los cuales 27 (67.5%) fueron del sexo masculino y 13 (32.5%) del sexo femenino. La media de edad de la población fue de 26.05 años (± 8.05), así como un índice de masa corporal (IMC) promedio de 24.78 (± 3.2). El tiempo de evolución desde la lesión hasta recibir tratamiento quirúrgico fue de 1.84 años (± 1.8). Para la segunda medición se tuvo una pérdida de 8 pacientes (5 hombres y 3 mujeres), lo cual representa el 20% de la muestra, sin embargo, permanece dentro de rangos permisibles para un estudio observacional. El tiempo a la segunda medición fue de 2 años, posterior a la Reconstrucción del Ligamento Cruzado Anterior. (Tabla 3, Diagrama 1)

VARIABLE	MEDIA (DESVIACION ESTANDAR) o %
Edad	26.05 (± 8.05) años
Sexo	67.5% M, 32.5% F
IMC	24.78 (± 3.2) kg/m ²
Tiempo de evolución	1.8 (± 1.8) años
% de lesión meniscal	85%
% de lesión condral	35%

Tabla 3. Características demográficas de la población de estudio. N=40. (IMC, índice de masa corporal).

En cuanto a la presencia de lesión meniscal se presentó en un total de 85% de los pacientes, 60% (n=24) tuvo lesión de menisco medial, de los cuales 14 fueron sometidos a meniscectomía parcial y 10 fueron reparados mediante alguna técnica. La lesión de menisco lateral se presentó en 47.5% de los pacientes (n=19), de los cuales a 14 de ellos se realizó meniscectomía parcial y reparación en 5 de ellos.

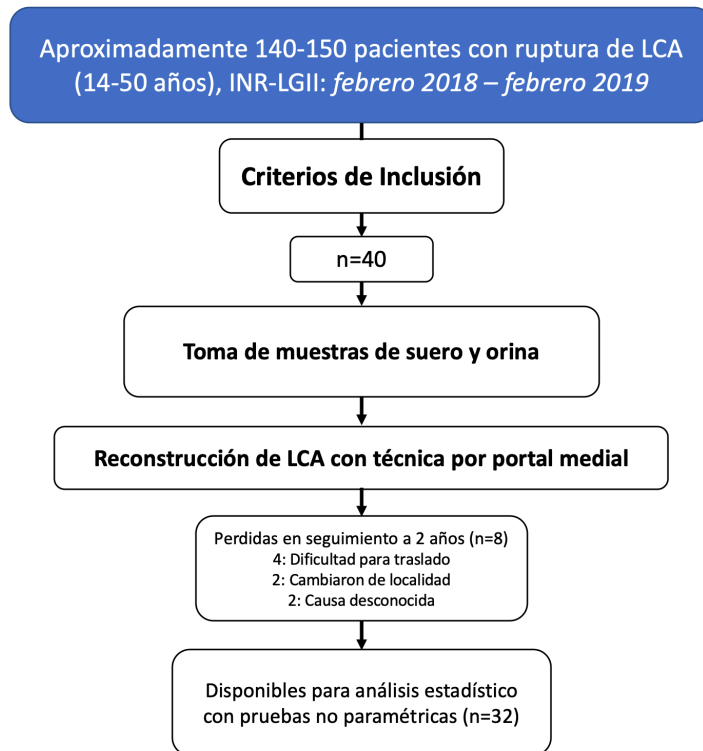


Diagrama 1. Diagrama de flujo del estudio.

Se reportó la presencia de lesiones condrales, encontrándose en 14 pacientes (35%), 7 de los cuales presentaron una lesión igual o menor a grado 2 y otros 7 con lesiones mayores a grado 2, según la clasificación del ICRS.³⁰ (Fig. 1)

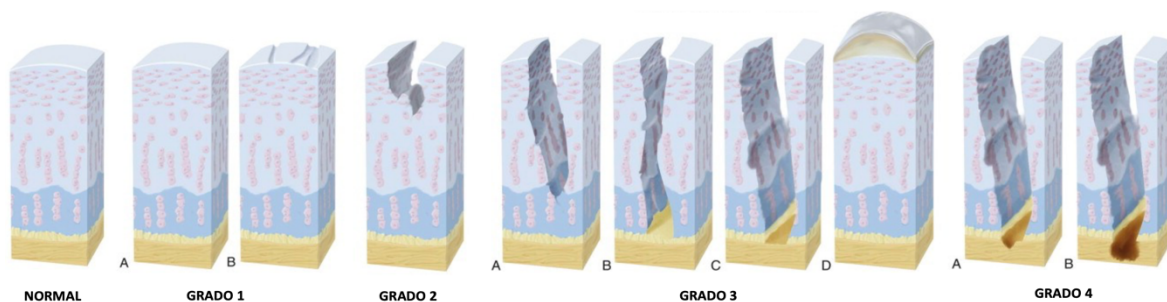


Figura 1. Clasificación de lesiones de cartílago de la ICRS (International Cartilage Regeneration and Joint Preservation Society). Grado 1A: lesión superficial o reblandecimiento. Grado 1B: Fisuras superficiales o laceraciones. Grado 2: Deshilachado, lesiones y fisuras que se extiendan menos del 50% de la profundidad del cartílago. Grado 3A: Defecto >50% pero que no llega a la capa calcificada. Grado 3B: Defecto >50% pero que llega a la capa calcificada. Grado 3C: Defecto >50% que no atravieza la capa subcondral. Grado 3D: Defecto >50% con presencia de ampollas. Grado 4A: Defecto que incluye la capa subcondral superficial. Grado 4B: Defecto que atravieza el hueso subcondral.

BIOMARCADORES.

Ambos biomarcadores y las diferencias entre la segunda y primera medición de U-CTx-II y S-MMP-3 presentaron una distribución anormal, por medio de la prueba de normalidad de Shapiro Wilks, exceptuando la segunda medición de S-MMP-3, dados los resultados que se muestran a continuación, se utilizaron pruebas no paramétricas para analizar los distintos comportamientos de los B-OA según el caso. (Tabla 4).

		1a medición CTx-II U (mcg/mmol)	2a medición CTx-II U (mcg/mmol)	Diferencia de Mediciones CTx-II U	1a Medición MMP-3 S (ng/ml)	2a Medición MMP-3 S (ng/ml)	Diferencia de Mediciones MMP-3 S
N	Válido	40	32	32	40	32	32
	Perdidos	0	8	8	0	8	8
Mediana		3.1	59.0	52.6	.00	2.8	2.5
Rango		14.0	187.6	191.3	23.7	3.1	24.8
p valor Shapiro Wilks		.02	.01	.01	.00	.41	.00

Tabla 4. Medianas y rangos de las medidas de los B-OA (U-CTx-II, S-MMP-3). Se anexa el p valor para la prueba de normalidad de Shapiro Wilks, comprobando la distribución anormal en todos los casos, excepto la 2da medición de S-MMP-3. *Se muestra la pérdida de 8 pacientes (20% de la muestra), lo cual esta en rango aceptable para el análisis de casos válidos.

De igual forma ambos B-OA tuvieron un aumento significativo de la primera a la segunda medición, por medio del estadístico de rangos de Wilcoxon. (Tabla 5, Fig 2).

Marcador	Medición (Mediana)		Rango promedio	p valor Wilcoxon
	1a	2da		
U-CTX II (mcg/mmol)	3.1	59.0	18.25	< 0.001
S-MMP3 (ng/ml)	.00	2.8	15.85	0.002

Tabla 5. Estadístico de Rangos de Wilcoxon, con aumento significativo (p valor <0.05) de la primera a la segunda medición en ambos B-OA.

De las 32/40 mediciones donde se completo el seguimiento a 2 años, en el caso de U-CTx-II, únicamente en 4 casos hubo una disminución en la medición y en 5 pacientes para S-MMP-3.

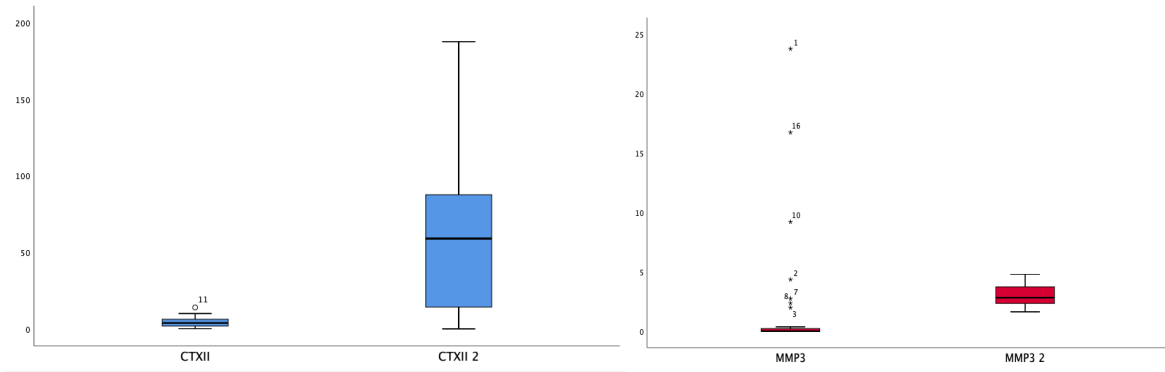


Figura 2. Aumento significativo entre mediciones, (inicial y a los 2 años de seguimiento), para ambos Biomarcadores de OA.

BIOMARCADORES Y RELACIÓN CON EDAD.

Se realizó prueba de normalidad para edad, encontrando distribución anormal por medio de la prueba de Shapiro Wilks con una $p=0.002$ y una mediana de edad de 24 años, con un rango de 27. Dado este resultado se tomó como punto de corte 24 años para comparar las diferencias entre mediciones con estadístico de Wilcoxon.

Se obtuvo una significancia estadística para >24 años en ambos B-OA, (*U-CTX-II*: $p=0.003$ y *S-MMP-3*: $p=0.001$), y para ≤ 24 años únicamente en CTx-II, (*CTX-II U*: $p=0.001$ y *S-MMP-3*: $p=0.28$); por lo cual para U-CTX-II la edad no representó un factor determinante en el aumento significativo de ambas mediciones a diferencia de MMP-3 S que fue significativo en mayores de 24 años. (Fig. 3)

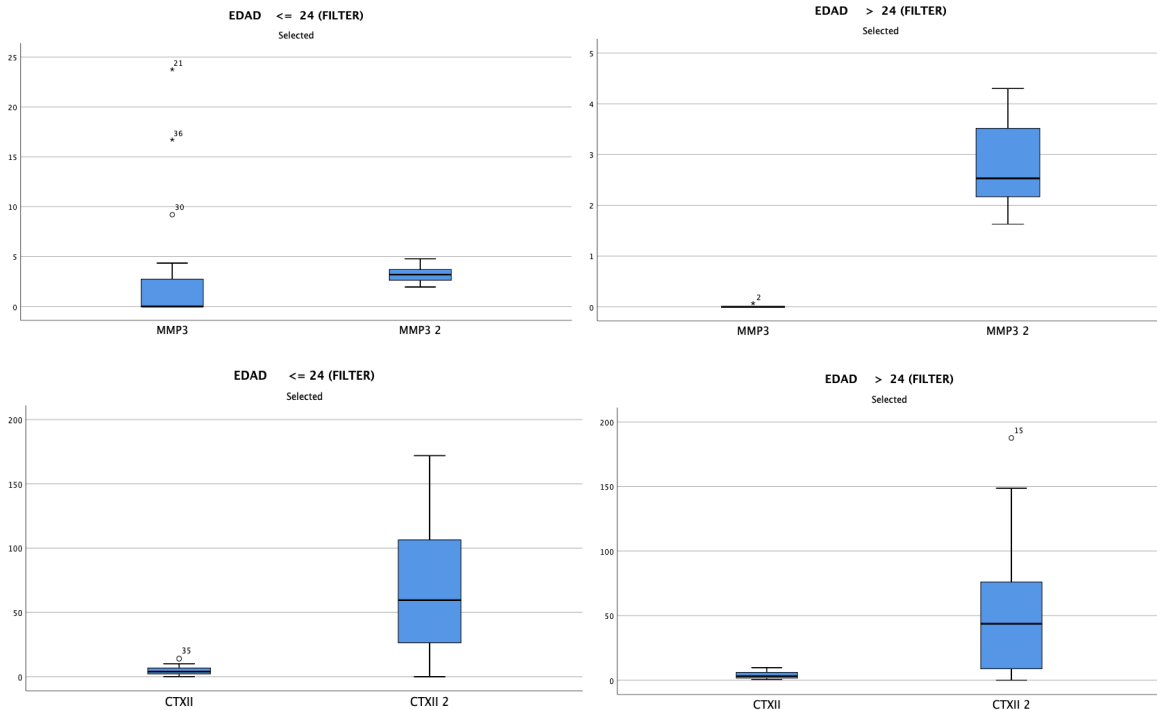


Figura 3. Dada la distribución anormal de la población por edad, se tomó la mediana de edad (24 años) como punto de corte para determinar si este factor influye en el comportamiento de alguno de los B-OA. Encontrando un aumento significativo en el caso de MMP-3 en mayores de 24 años.

BIOMARCADORES Y RELACIÓN CON SEXO.

Al dividir a la población de estudio para su análisis por sexo, por medio de prueba no paramétrica para muestras 2 relacionadas con estadístico de Wilcoxon, se encontró una diferencia significativa para las mediciones de U-CTx-II, en ambos sexos ($p=0.03$ femenino y $p=0.01$ masculino), a diferencia de MMP-3 S donde la diferencia únicamente fue significativa en el sexo masculino, ($p=0.008$). Con lo cual el aumento de ambos biomarcadores es significativo en hombres y solamente es significativo para U-CTx-II en mujeres. (Fig. 4)

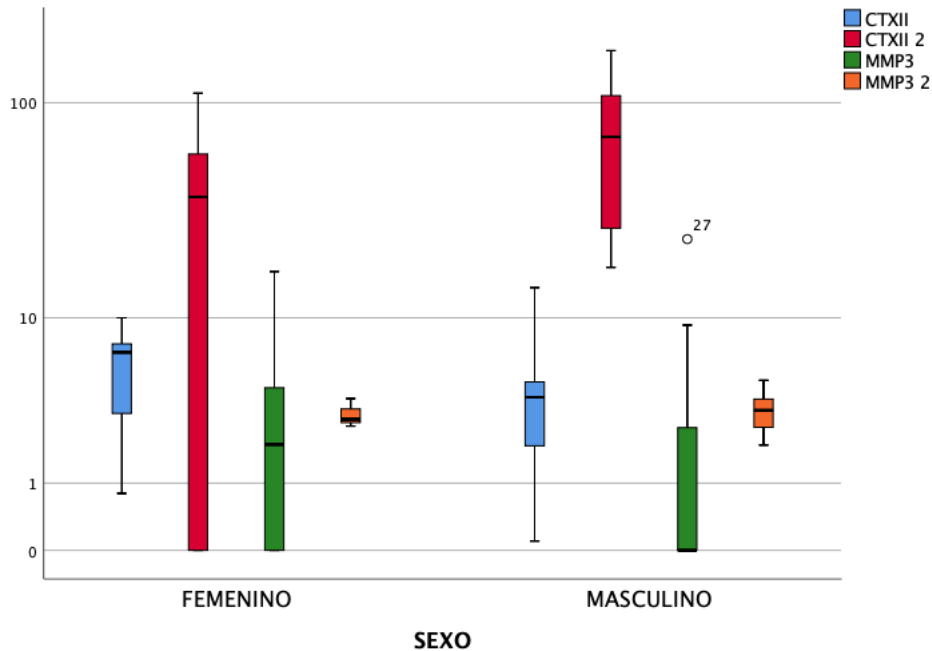


Figura 4. Por medio de estadístico de rangos de Wilcoxon de determino una diferencia significativa entre mediciones: En pacientes de sexo masculino la diferencia fue significativa en ambos B-OA y en pacientes de sexo femenino fue significativa unicamente para CTx-II U.

BIOMARCADORES Y RELACIÓN CON TIEMPO DE EVOLUCIÓN.

Para analizar el tiempo de evolución desde la lesión con las mediciones de B-OA, se realizaron correlaciones no paramétricas por medio de Rho de Spearman, encontrando una correlación significativa en pacientes de sexo femenino con relación a todas las medidas de U-CTx-II, así como la diferencia entre ambas mediciones. (Tabla 6) Dado que el coeficiente de correlación resultó negativo, podemos interpretar que en mujeres a menor tiempo de evolución de la lesión, mayores serán las concentraciones de U-CTx-II. Para pacientes de sexo masculino no se encontró ninguna correlación significativa en cuanto al tiempo de evolución de la lesión y la concentración de los B-OA.

Tiempo de evolución	1a medición CTx-II U	2a medición CTx-II U	Diferencia de Mediciones CTx-II U
Coeficiente de correlación, Rho de Spearman (r)	-0.55	-0.73	-0.67
p valor	0.04	0.01	0.03

Tabla 6. Correlación (Rho de Spearman) de tiempo de evolución de la lesión con las concentraciones de U-CTX-II en sexo femenino, así como de la diferencia entre mediciones.

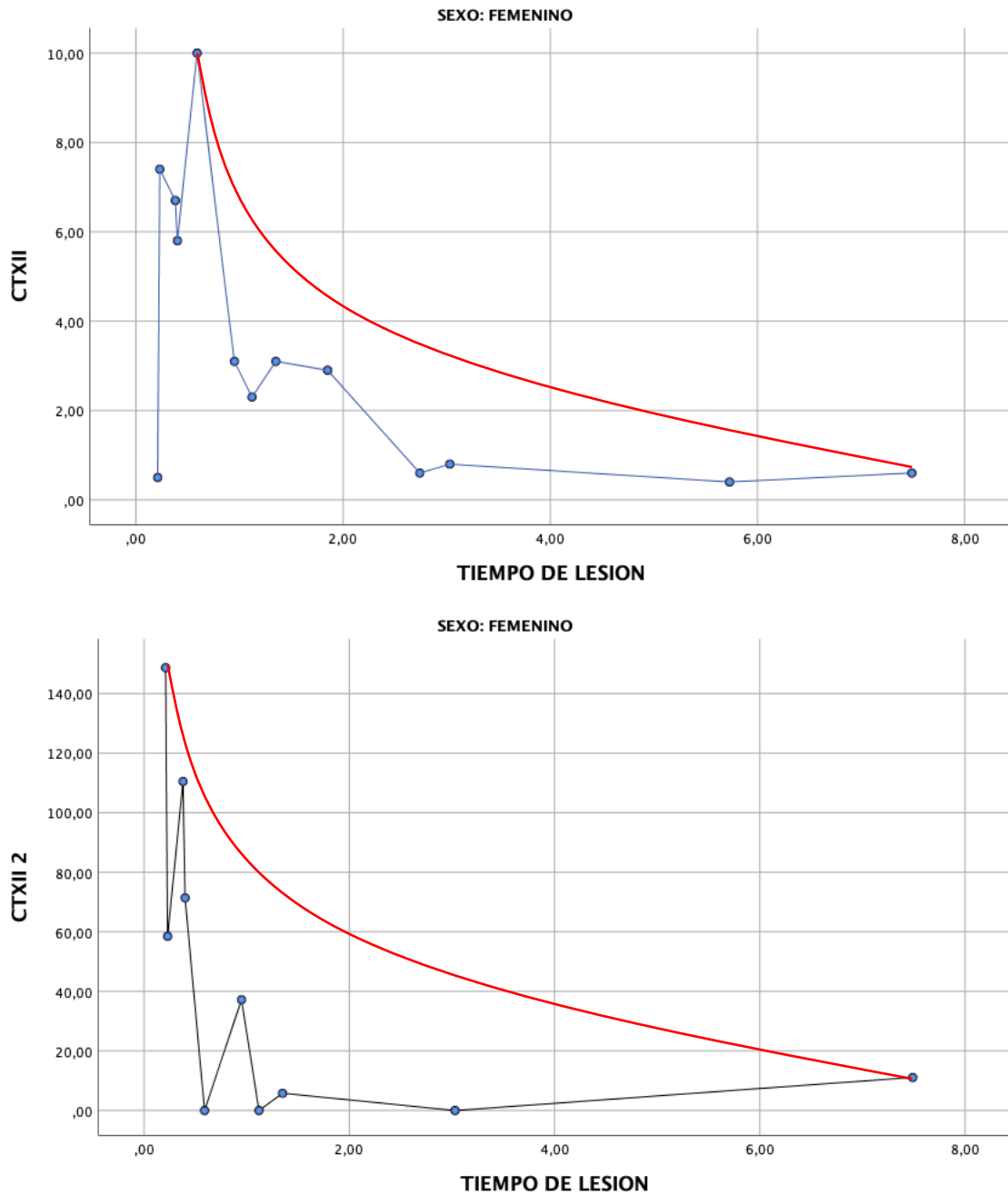


Figura 5. Diagrama de dispersión donde se muestran mayores niveles de U-CTX-II en mujeres a menor tiempo de evolución después de la lesión y reconstrucción del ligamento cruzado anterior.

BIOMARCADORES Y RELACIÓN CON PRESENCIA DE LESIÓN MENISCAL.

Se dividió a la población de estudio en 2 grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de lesión meniscal, para posteriormente analizar si hubo una diferencia significativa entre las mediciones de los biomarcadores. En el caso de U-CTX-II, hubo un rango promedio de 3 para quienes no tuvieron lesión meniscal y de 15.7 para quienes sí tuvieron lesión de menisco, en ambos escenarios hubo significancia ($p=0.043$ y $p=0.000$, respectivamente). Para S-MMP-3, el rango promedio para quienes no tuvieron lesión meniscal fue de 3.5 y de 12.87 en quienes se encontró lesión meniscal. El p valor fue significativo solo en el caso presencia de lesión meniscal con $p=0.01$.

BIOMARCADORES Y RELACIÓN CON GRADO DE LESIÓN CONDRAL.

Para analizar la diferencia de mediciones de ambos B-OA, se dividió a la población en 3 grupos de acuerdo a la presencia o no de lesión condral de la siguiente forma: Ausencia de lesión, lesión condral \leq grado 2 y lesión condral $>$ grado 2. Posteriormente se realizó la prueba no paramétrica con estadístico de rangos de Wilcoxon para determinar la significancia entre las distintas mediciones de acuerdo al grado de lesión condral.

U-CTX-II (mcg/mmol)						
Lesión Condral	Rango Promedio Población total	p valor (Wilcoxon)	Rango Promedio Sexo Femenino	p valor (Wilcoxon)	Rango Promedio Sexo Masculino	p valor (Wilcoxon)
No lesión	10.9	0.00	2.5	0.06	8.9	0.001
\leq Grado 2	4	0.04	2	0.65	2.5	0.06
$>$ Grado 2	4	0.24	3	0.71	1.5	0.18

Tabla 7. Estadístico de Rangos de Wilcoxon para determinar las diferencias entre mediciones según el grado de lesión condral. Existe significancia en quienes no tuvieron lesión condral en la población total y en el sexo masculino.

En el caso de U-CTX-II, se encontró significancia en quienes de forma inicial no tenían lesión condral ($p<0.05$) con un rango de 10.9, y de igual forma en quienes tenían lesión condral \leq grado 2 ($p=0.04$) con un rango de 4. Para quienes tuvieron

lesión condral > grado 2, no hubo diferencia significativa. Sin embargo al dividir a la población por sexo, adicionalmente al grado de lesión de cartílago, se encontró significancia en el sexo masculino que no tenía lesión de cartílago ($p=0.001$) con un rango promedio de 8.9. (Tabla 7)

Por tal motivo se decidió en el caso de U-CTx-II, observar el comportamiento de las medianas de la población total y por sexo para la 1ª y 2ª medición. Se observó que en la población total existe una disminución de la primera a la segunda medición, de acuerdo al grado de lesión condral, es decir, a mayor grado de lesión condral menor fue la diferencia de medianas. (Tabla 8, Fig 6)

Lesion Condral	U-CTx-II 1a medición (Mediana)	U-CTx-II - 2a medición (Mediana)	Diferencia de Medianas
No lesión	4.1	59.9	55.8
≤ Grado 2	2.7	53.2	50.5
> Grado 2	2.1	7.7	5.6

Tabla 8. Comparativa de medianas en la población total, de las medidas de U-CTx-II (1ª y 2ª medición, así como de la diferencia de medianas).

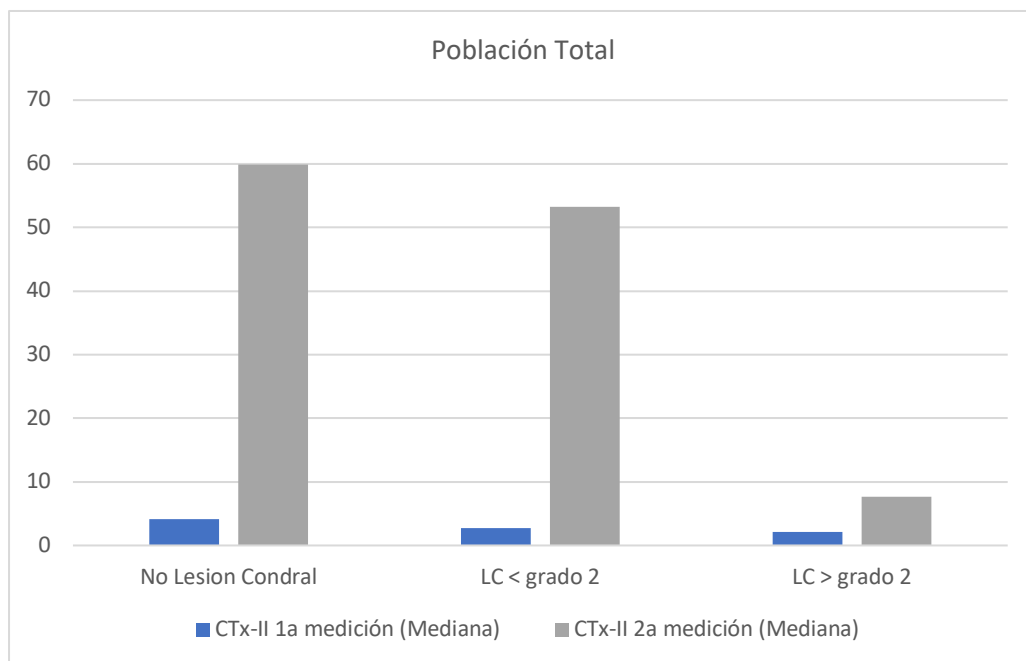


Figura 6. Representación con diagrama de barras de la mediana de CTx-II U, de acuerdo al grado de lesión condral (1ª y 2ª medición)

Al realizar la misma comparación de medianas, dividiendo a los grupos por sexo, en el caso del sexo femenino, se observó que conforme mayor es el daño condral menor será la diferencia de medianas, contrario a lo que sucedió en el grupo de sexo masculino donde la diferencia de medianas es mayor cuanto mayor es el grado de lesión condral. (Tabla 9,10. Fig 7,8.)

Sexo Femenino	CTx-II 1a medición (Mediana)	CTx-II 2a medición (Mediana)	Diferencia de Medianas
No lesión	6.2	64.9	58.7
≤ Grado 2	2.7	18	15.3
> Grado 2	1.9	2.9	1

Tabla 9. Comparativa de medianas en la población de sexo femenino, de las medidas de CTx-II U (1ª y 2ª medición, así como de la diferencia de medianas).

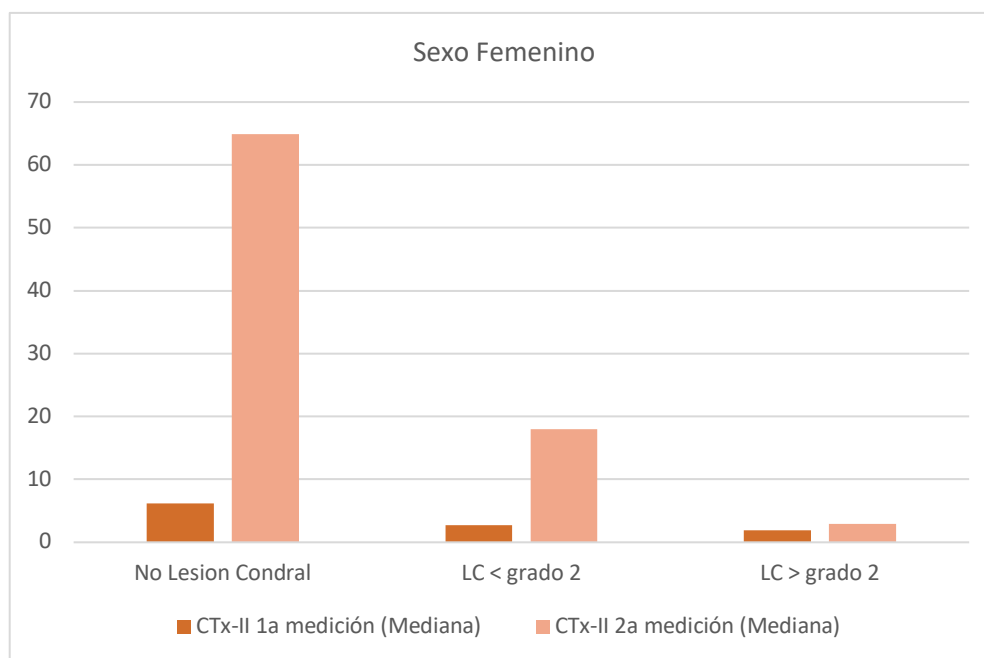


Figura 7. Representación con diagrama de barras de la mediana de CTx-II U, en sexo femenino, de acuerdo al grado de lesión condral (1ª y 2ª medición)

Sexo Masculino	CTx-II 1a medición (Mediana)	CTx-II 2a medición (Mediana)	Diferencia de Medianas
No lesión	3.9	59.9	56
≤ Grado 2	3.3	69.6	66.3
> Grado 2	3.7	98.6	94.9

Tabla 10. Comparativa de medianas en la población de sexo masculino, de las medidas de CTx-II U (1ª y 2ª medición, así como de la diferencia de medianas).

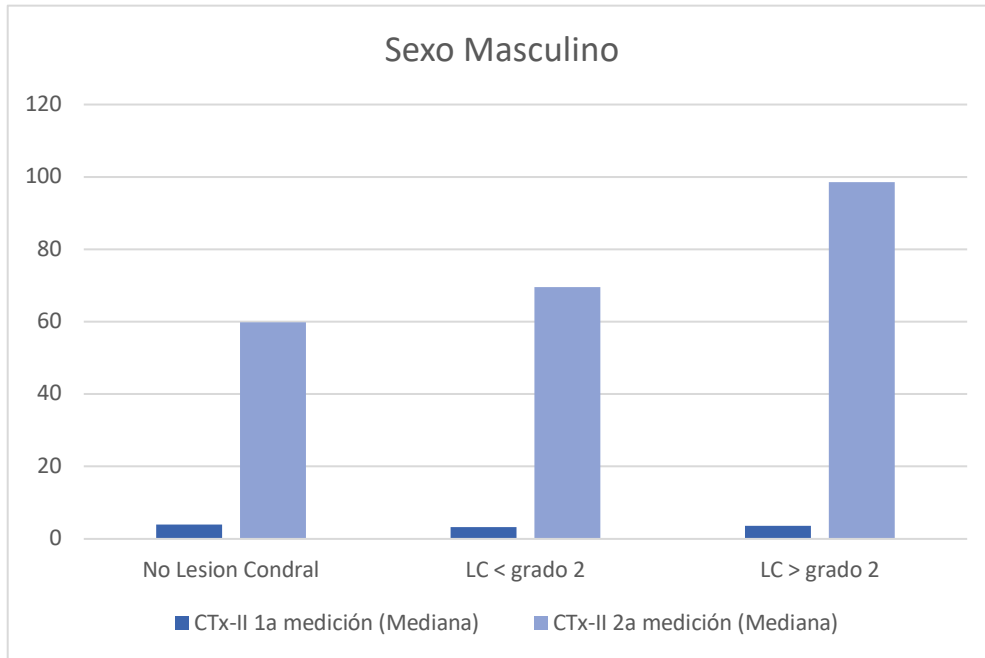


Figura 8. Representación con diagrama de barras de la mediana de CTx-II U, en sexo masculino, de acuerdo al grado de lesión condral (1ª y 2ª medición).

En cuanto a S-MMP-3 S, se encontraron diferencias significativas en la población total, en quienes no tuvieron lesión condral inicial, la cual al dividir el grupo por sexo permaneció significativa en pacientes de sexo masculino, sin encontrar un patrón claro en la diferencia de mediciones. (Tabla 11, Fig 9)

MMP-3 S						
Lesion Condral	Rango Promedio Población total	<i>p</i> valor (Wilcoxon)	Rango Promedio Sexo Femenino	<i>p</i> valor (Wilcoxon)	Rango Promedio Sexo Masculino	<i>p</i> valor (Wilcoxon)
No lesion	11	0.002	3	0.14	8.5	0.008
≤ Grado 2	2.5	0.91	1	0.65	2	0.71
> Grado 2	3.5	0.02	2.5	0.06	1.5	0.18

Tabla 11. Estadístico de Rangos de Wilcoxon para determinar las diferencias entre mediciones según el grado de lesión condral. Existe significancia en quienes no tuvieron lesión condral y con lesiones mayores a grado 2 en la población total, así como en ausencia de lesión en el sexo masculino.

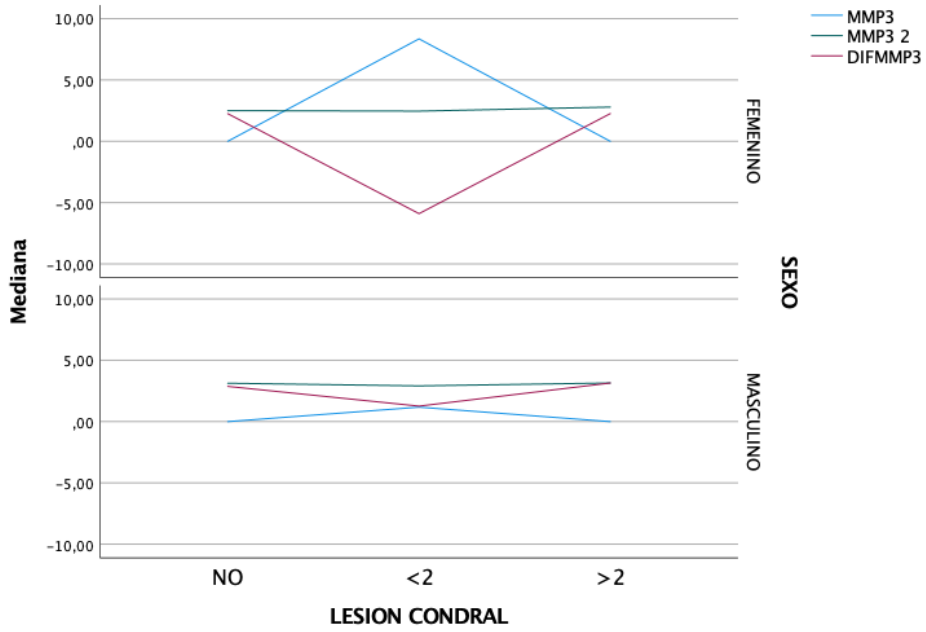


Figura 9. A pesar de que en sexo masculino y en la población total existieron diferencias significativas en quienes no tuvieron lesión condral inicial, no se determina un patrón claro en la concentración de S-MMP-3.

DISCUSIÓN

Al analizar de manera inicial ambos B-OA, se identificó una distribución anormal en ambos. En el caso de CTx-II, se ha comprobado en estudios piloto en animales que disminuye con el tiempo de evolución de la lesión y con la edad, lo cual en nuestro estudio puede estar asociado con su anormalidad. Con respecto a la anormalidad para MMP-3, al estar regulada por TIMPs (Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas), de acuerdo a lo avanzado del proceso degenerativo del cartílago articular estos reguladores no aumentan al mismo grado que las Metaloproteinasas, por lo cual permitirán mayor proteólisis del tejido articular.^{19,31}

De acuerdo a lo reportado en la literatura, a pesar de restablecer la estabilidad de la rodilla con la R-LCA, persistirá un aumento significativo en los B-OA, en este caso U-CTx-II y S-MMP-3, indicando la prevalencia de un estado inflamatorio que pudiera desencadenar en un proceso acelerado de OAPT, sin embargo es preciso reconocer que a pesar de ese aumento, no todos la desarrollarán. Este aumento en concentraciones de B-OA, así como de su diferencia entre mediciones, sugiere que el proceso degenerativo de la articulación inicia de forma temprana y que ni restableciendo la biomecánica de la articulación, habrá una eventual disminución de biomarcadores. Actualmente se sabe que en un subgrupo de pacientes (aproximadamente el 35%) con lesión de LCA, desarrollará una respuesta inflamatoria descontrolada que aparentemente no está relacionada con la severidad de la lesión, sin embargo este análisis es en base a una sola determinación de B-OA en pacientes con ruptura de LCA en agudo y no se consideró el efecto crónico que pueden tener la lesión meniscal y condral en estos pacientes.^{3,32}

En relación a la mediana de edad del estudio (24 años), se observó un aumento significativo a partir de este punto de corte para S-MMP-3, lo cual considerando publicaciones previas, concuerda con algunas de estas conclusiones. La primera, es que la presencia de MMP-3 se traduce en un estado proinflamatorio, que se

presenta de forma natural con el envejecimiento y por lo cual encontraremos mayores concentraciones conforme al incremento de edad. El otro punto es que también se reportan mayores concentraciones ante la presencia de sinovitis demostrada por medio de resonancia magnetica, y que se considera un proceso clave e inicial en el establecimiento de OAPT.^{33,34,35}

A pesar de que ambos biomarcadores tuvieron un incremento significativo, este tambien es considerable cuando se dividió a la poblacion por sexo. Se sabe el papel hormonal que tienen tanto la testosterona como los estrógenos en los niveles de B-OA y la correlación negativa que tienen con ambas hormonas. Ambos biomarcadores tuvieron incremento significativo en el sexo masculino, y en el sexo femenino únicamente fue significativo para CTx-II. En el caso de MMP-3 se corrobora lo reportado por algunos estudios, donde a pesar de que el aumento en las concentraciones correlaciona con el aumento en la edad, es mayor en el sexo masculino.³⁵ Esta regulación positiva de niveles de MMP-3 tiene relación estrecha con los niveles de adenosina liberados por el cartílago articular y que es un punto prometedor de estudio, ya que una regulación positiva de esta, aumentará el estado inflamatorio y una regulación negativa promovera la muerte celular de condrocitos.³⁶ Con esto podemos considerar a el sexo masculino una población de riesgo para mayor progresión a OAPT. En el caso del sexo femenino las concentraciones de CTx-II tienen una relación inversa con los niveles de estrógenos, que actuan como condroprotectores, es decir, a mayor edad y mayor disminución de niveles de estrogenos, menor sera el efecto protector y se esperará mayor concentración de CTx-II.³⁷ Tambien mayores niveles de CTx-II en mujeres correlacionan con una disminucion del espacio articular. Finalmente podemos decir que el sexo si es un factor determinanate en los niveles de B-OA; con respecto a MMP-3 en el sexo masculino y de CTx-II en el sexo femenino, en ambos casos, se debe prestar atención en el futuro en caso de encontrar aumento en las concentraciones de estos B-OA.

Como se menciona en el estudio de Jacobs et al, existirán alteraciones mecánicas secundarias a lesiones de menisco o cartílago, de las cuales se desconoce el efecto proinflamatorio crónico, pero que en ambos casos pueden acelerar la presencia de OAPT.³² En este estudio se demostró que ante la presencia de lesión meniscal, existirán en ambos B-OA un aumento significativo. Es esperado, que ante las alteraciones biomecánicas que se presentan posterior a una meniscectomía parcial e incluso reparación meniscal, aumenten las cargas en el compartimento afectado desencadenando un proceso inflamatorio y de degradación del cartílago articular. Por tanto, se confirma que la lesión meniscal per se, es un factor de riesgo para deterioro del cartilago articular corroborado mediante el análisis de B-OA y que progresará a OAPT a pesar de su reparación.¹

En mujeres con menor tiempo de evolución de la lesión, se detectaron mayores concentraciones de CTx-II, tanto en el prequirúrgico, como a los 2 años de seguimiento, momento en el cual dichas concentraciones fueron mayores a lo detectado de forma inicial. Esto puede sugerir que la R-LCA en forma aguda puede representar un segundo golpe o “*second hit*” con lo cual se perpetúa el proceso inflamatorio dentro de la articulación.³⁸ Este hallazgo también consistente con lo recientemente publicado por Hunt E. et al, donde incluso a pesar de la aplicación de una inyección intraarticular de Triamcinolona prequirúrgica, los niveles de B-OA presentaron un aumento significativo después de la R-LCA.³⁹ Podemos considerar que mujeres con niveles basales aumentados de CTx-II y con menor tiempo de evolución desde la lesión, pueden representar un subgrupo de riesgo al cual se deba vigilar y tratar con ciertas particularidades.

Al analizar la diferencia de B-OA de acuerdo al grado de lesión condral, se encontró un aumento significativo en quienes de forma inicial no tenían algún grado de lesión condral tanto para CTx-II como MMP-3 a 2 años de seguimiento, esto puede indicar que posterior a la R-LCA, aún en quienes no tienen daño condral, se puede desencadenar un deterioro de la articulación con el procedimiento quirúrgico.

Para la medición de CTx-II, de forma global, los niveles de la segunda medición son menores conforme mayor es el grado de lesión condral, confirmando que un “*second hit*”, puede ser incluso mayor en quienes no tenían lesión de cartílago inicial. Al dividir esta población por sexo, en el caso de CTx-II, notables diferencias existen, siendo en el sexo masculino donde ese aumento será mayor de acuerdo al grado de lesión condral a 2 años de seguimiento, a diferencia del patrón observado en el sexo femenino, donde el aumento es mayor en quienes no tenían lesión condral y menor conforme mayor es el grado de lesión.

Con esta información podemos interpretar que en el sexo masculino con lesiones condrales mayores a grado 2, existirá un mayor nivel de CTx-II a 2 años de seguimiento y que en mujeres es mayor el efecto del segundo golpe en quienes no tienen lesión de cartílago. A pesar de que ese aumento es significativo de forma global en quienes no tienen lesión condral inicial y en hombres en el caso de MMP-3, no se identificó un patrón característico al dividir a la población por sexo y grado de lesión condral.

Subgrupos de riesgo considerados en este estudio:
Pacientes > 24 años.
Mujeres con lesión aguda de LCA.
Presencia de lesión meniscal.
Hombres con lesión condral >G2 asociada.

Puntos Clave del Estudio:
La distribución de ambos B-OA es anormal.
Ambos B-OA tuvieron un aumento significativo, independientemente de la R-LCA.
Población >24 años de edad, tendrá una diferencia significativa a la segunda medición de MMP-3.
En cuanto a la diferencia de mediciones por sexo, existirá un aumento significativo en ambos B-OA en hombres y únicamente en CTx-II para mujeres.
A menor tiempo de evolución de la lesión, se encontraron mayores concentraciones de CTx-II en mujeres antes y después de 2 años de la R-LCA.
La presencia de lesión meniscal muestra un aumento significativo de ambos B-O.

Posterior a la R-LCA, quienes no tuvieron lesión condral inicial, presentaron un incremento significativo de CTx-II versus quienes tuvieron cualquier otro grado de lesión condral.

Lesiones condrales > G2, tendrán mayores concentraciones de CTx-II a 2 años en sexo masculino.

CONCLUSIONES

El estudio de B-OA es complicado, en parte por que aún no existe un sistema de estandarización en su reporte y el cual es variable de acuerdo a las distintas casas comerciales (ELISA). En este estudio corroboramos la distribución anormal de ambos B-OA que se puede deber a los distintos sistemas de regulación, así como a el comportamiento de los mismos según las variables presentes en la población de estudio. A pesar de la R-LCA existirá un aumento significativo de ambos B-OA (U-CTx-II y MMP-3), con lo cual corroboramos que la cirugía puede representar un segundo golpe que perpetua el estado inflamatorio de la rodilla y con ello acelerar la presencia de OAPT. Nuestra consideración después de observar el comportamiento de los biomarcadores estudiados, es que podemos catalogar como subgrupos de riesgo a mujeres lesión aguda y niveles elevados iniciales de CTx-II, hombres con lesiones condrales > grado 2 y población mayor de 24 años, quienes pudieran considerarse en un futuro próximo, candidatos a protocolos de estudio donde se realicen terapias adicionales a la estabilización de la articulación para disminuir el riesgo de OAPT. Por otro lado seguimos considerando a la lesión meniscal asociada como un factor de riesgo para OAPT, como ya se ha reportado en la literatura. Es de suma importancia saber que la R-LCA per se, puede desencadenar un proceso inflamatorio y de degeneración articular independientemente del estatus inicial de la articulación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lohmander LS, Englund PM, Dahl LL, Roos EM. The Long-term Consequence of Anterior Cruciate Ligament and Meniscus Injuries. *The American Journal of Sports Medicine*. 2007 Oct;35(10):1756–69.
2. Ruano JS, Sitler MR, Driban JB. Prevalence of Radiographic Knee Osteoarthritis After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction, With or Without Meniscectomy: An Evidence-Based Practice Article. *Journal of Athletic Training*. 2017 Jun 2;52(6):606–9.
3. Cinque ME, Dornan GJ, Chahla J, Moatshe G, LaPrade RF. High Rates of Osteoarthritis Develop After Anterior Cruciate Ligament Surgery: An Analysis of 4108 Patients. *The American Journal of Sports Medicine*. 2017 Oct 6;46(8):2011–9.
4. Chalmers PN, Mall NA, Moric M, Sherman SL, Paletta GP, Cole BJ, et al. Does ACL Reconstruction Alter Natural History? *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2014 Feb;96(4):292–300.
5. Brown TD, Johnston RC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. Posttraumatic Osteoarthritis: A First Estimate of Incidence, Prevalence, and Burden of Disease. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2006 Nov;20(10):739–44.
6. Madry H, Kon E, Condello V, Peretti GM, Steinwachs M, Seil R, et al. Early osteoarthritis of the knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2016 Mar 21;24(6):1753–62.
7. Lattermann C, Jacobs CA, Proffitt Bunnell M, Huston LJ, Gammon LG, Johnson DL, et al. A Multicenter Study of Early Anti-inflammatory Treatment in Patients With Acute Anterior Cruciate Ligament Tear. *The American Journal of Sports Medicine*. 2016 Oct 7;45(2):325–33.
8. Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB, Attur M, Corr M, Felson D, et al. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006 Aug;14(8):723–7.
9. Harkey MS, Luc BA, Golightly YM, Thomas AC, Driban JB, Hackney AC, et al. Osteoarthritis-related biomarkers following anterior cruciate ligament injury and reconstruction: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2015 Jan;23(1):1–12.
10. Lattermann C, Conley CE-W, Johnson DL, Reinke EK, Huston LJ, Huebner JL, et al. Select Biomarkers on the Day of Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Predict Poor Patient-Reported Outcomes at 2-Year Follow-Up: A Pilot Study. *BioMed Research International*. 2018 Jul 19;2018:1–9.
11. Keays SL, Newcombe PA, Bullock-Saxton JE, Bullock MI, Keays AC. Factors Involved in the Development of Osteoarthritis after Anterior Cruciate Ligament Surgery. *The American Journal of Sports Medicine*. 2010 Mar;38(3):455–63.
12. Luc B, Gribble PA, Pietrosimone BG. Osteoarthritis Prevalence Following Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Systematic Review and Numbers-Needed-to-Treat Analysis. *Journal of Athletic Training*. 2014 Dec;49(6):806–19.
13. Amano K, Huebner JL, Stabler TV, Tanaka M, McCulloch CE, Lobach I, et al. Synovial Fluid Profile at the Time of Anterior Cruciate Ligament Reconstruction and Its Association With Cartilage Matrix Composition 3 Years After Surgery. *The American Journal of Sports Medicine*. 2018 Jan 24;46(4):890–9.
14. Leslie Gross Portney, Watkins MP. *Foundations of clinical research : applications to practice*. Philadelphia: F.A. Davis; 2015.
15. Brown CH, Spalding T, Robb C. Medial portal technique for single-bundle anatomical Anterior Cruciate Ligament (ACL) reconstruction. *International Orthopaedics*. 2013 Jan 20;37(2):253–69.
16. Garvican ER, Vaughan-Thomas A, Innes JF, Clegg PD. Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis. *The Veterinary Journal*. 2010 Jul;185(1):36–42.
17. Garnero P, Delmas PD. Biomarkers in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. 2003 Sep;15(5):641–6.
18. Hunter DJ, Nevitt M, Losina E, Kraus V. Biomarkers for osteoarthritis: Current position and steps towards further validation. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2014 Feb;28(1):61–71.
19. Rousseau J-C, Delmas PD. Biological markers in osteoarthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2007 Jun;3(6):346–56.
20. Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, Brandi M-L, Bruyère O, Chapurlat R, et al. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013 Jul 29;72(11):1756–63.
21. Lohmander LS, Brandt KD, Mazzuca SA, Katz BP, Larsson S, Struglics A, et al. Use of the plasma stromelysin (matrix metalloproteinase 3) concentration to predict joint space narrowing in knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2005;52(10):3160–7.
22. Bay-Jensen AC, Reker D, Kjelgaard-Petersen CF, Mobasheri A, Karsdal MA, Ladel C, et al. Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016 Jan;24(1):9–20.
23. Protein, Antibody and Assay Kit by CLOUD-CLONE CORP.(CCC) [Internet]. www.cloud-clone.com. [cited 2020 Apr 28]. Available from: <http://www.cloud-clone.com>.

24. Claes S, Hermie L, Verdonk R, Bellemans J, Verdonk P. Is osteoarthritis an inevitable consequence of anterior cruciate ligament reconstruction? A meta-analysis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2012 Oct 26;21(9):1967–76.
25. Rao AJ, Erickson BJ, Cvetanovich GL, Yanke AB, Bach BR, Cole BJ. The Meniscus-Deficient Knee. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2015 Oct 12;3(10):232596711561138.
26. Spalding T, Damasena I, Lawton R. Meniscal Repair Techniques. *Clinics in Sports Medicine*. 2020 Jan;39(1):37–56.
27. Li H, Chen C, Chen S. Posttraumatic knee osteoarthritis following anterior cruciate ligament injury: Potential biochemical mediators of degenerative alteration and specific biochemical markers. *Biomedical Reports*. 2014 Dec 17;3(2):147–51.
28. Tourville TW, Johnson RJ, Slaughterbeck JR, Naud S, Beynon BD. Relationship Between Markers of Type II Collagen Metabolism and Tibiofemoral Joint Space Width Changes After ACL Injury and Reconstruction. *The American Journal of Sports Medicine*. 2013 Feb 19;41(4):779–87.
29. Svoboda SJ, Harvey TM, Owens BD, Brechue WF, Tarwater PM, Cameron KL. Changes in Serum Biomarkers of Cartilage Turnover After Anterior Cruciate Ligament Injury. *The American Journal of Sports Medicine*. 2013 Jul 5;41(9):2108–16.
30. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of Cartilage Injuries and Repair. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2003;85-A(2):58–69.
31. Brown SB, Hornyak JA, Jungels RR, Shah YY, Yarmola EG, Allen KD, et al. Characterization of Post-Traumatic Osteoarthritis in Rats Following Anterior Cruciate Ligament Rupture by Non-Invasive Knee Injury (NIKI). *Journal of Orthopaedic Research*. 2019 Oct 6;38(2):356–67.
32. Jacobs CA, Hunt ER, Conley CE-W, Johnson DL, Stone AV, Huerbner JL, Kraus VB, Latterman C. Dysregulated Inflammatory Response Related to Cartilage Degradation after ACL Injury. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2020 Mar;52(3):535–41.
33. Saberi Hosnijeh F, Bierma-Zeinstra SM, Bay-Jensen AC. Osteoarthritis year in review 2018: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2019 Mar;27(3):412–23.
34. Alonso B, Bravo B, Mediavilla L, Gortazar AR, Forriol F, Vaquero J, et al. Osteoarthritis-related biomarkers profile in chronic anterior cruciate ligament injured knee. *The Knee*. 2020 Jan;27(1):51–60.
35. Kodama R, Muraki S, Iidaka T, Oka H, Teraguchi M, Kagotani R, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase-3 and autoantibodies related to rheumatoid arthritis in the general Japanese population and their association with osteoporosis and osteoarthritis: the ROAD study. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2017 Apr 1;36(2):246–53.
36. Rodriguez K. Sex, but Not Body Mass index, Influences MMP-3 and Type II Collagen Turnover following ACL Injury and Reconstruction. In: *Osteoarthritis and Cartilage*. 2020.
37. Elsaid KA, Chichester CO. Review: Collagen markers in early arthritic diseases. *Clinica Chimica Acta*. 2006 Mar;365(1–2):68–77.
38. Larsson S, Struglics A, Lohmander LS, Frobell R. Surgical reconstruction of ruptured anterior cruciate ligament prolongs trauma-induced increase of inflammatory cytokines in synovial fluid: an exploratory analysis in the KANON trial. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2017 Sep;25(9):1443–51.
39. Hunt ER, Conley CE, Jacobs CA, Ireland ML, Johnson DL, Lattermann C. Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Reinitiates an Inflammatory and Chondrodegenerative Process in the Knee Joint. *Journal of Orthopaedic Research*. 2020 Jun 19.