



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
SECRETARÍA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN  
Luis Guillermo Ibarra Ibarra  
ESPECIALIDAD EN:  
**REUMATOLOGÍA**

***ESTRÉS OXIDANTE INDUCIDO POR CRISTALES DE  
PIROFOSFATO DE CALCIO Y SU IMPACTO EN LA  
OSTEOARTRITIS DE RODILLA***

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN:  
**REUMATOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**  
***INDIRA XIOMARA PUERTA ESCALANTE***

PROFESOR TITULAR  
***DR. ROLANDO ESPINOSA MORALES***

DIRECTOR DE TESIS  
***DRA YESSICA E. ZAMUDIO CUEVAS***



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR-LGII) de la Secretaría de Salud y en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo contó con la aprobación del Comité de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación con número de registro 67/19.

## *Agradecimientos*

*Quiero dedicar este trabajo a mi asesora de tesis la Dra Yessica, quien estuvo siempre apoyándome y guiándome en este trabajo.*

*También quiero dar agradecimientos a mis mentores como son el Dr Espinosa y el Dr Lozada, gracias por ser unos profesionales y unos grandes maestros.*

*A mis queridos compañeros Alejandra y Carlos, por darme siempre porras en todo momento, los quiero futuros colegas.*

*Y no podía faltar agradecimiento a mi esposo, porque sin su apoyo no hubiese continuado con mi vida profesional. A mi familia que se encuentra en Colombia también quiero darles gracias, por sus palabras de ánimo cada día.*

**ESTRÉS OXIDANTE INDUCIDO POR CRISTALES DE PIROFOSFATO DE  
CALCIO Y SU IMPACTO EN LA OSTEOARTRITIS DE RODILLA**

---

**DR. ROLANDO ESPINOSA MORALES  
PROFESOR TITULAR**

---

**DRA. YESSICA ZAMUDIO CUEVAS  
DIRECTOR DE TESIS**

---

**DRA. YESSICA ZAMUDIO CUEVAS  
ASESOR DE TESIS**

**ESTRÉS OXIDANTE INDUCIDO POR CRISTALES DE PIROFOSFATO DE  
CALCIO Y SU IMPACTO EN LA OSTEOARTRITIS DE RODILLA**

---

**DRA. MATILDE L. ENRÍQUEZ SANDOVAL  
DIRECTORA DE EDUCACIÓN EN SALUD**

---

**DR. HUMBERTO VARGAS FLORES  
SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN MÉDICA**

---

**DR. ROGELIO SANDOVAL VEGA GIL  
JEFE DEL SERVICIO DE EDUCACIÓN MÉDICA DE POSGRADO**

## ÍNDICE

	Pag
GLOSARIO .....	8
RESUMEN .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. MARCO TEÓRICO .....	14
2.1 Patogénesis de los cristales de pirofosfato de calcio .....	14
2.1.1. Diagnóstico de artrosis por cristales de pirofosfato de calcio .....	15
2.2 Estrés oxidante en el daño articular.....	17
2.3 Osteoartrosis de rodilla .....	19
2.3.1 Características clínicas de la OA de rodilla .....	19
2.3.2 Clasificación de la OA de rodilla .....	20
2.3.3 Diagnóstico de la OA de rodilla .....	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	24
4. JUSTIFICACIÓN.....	25
5. HIPÓTESIS .....	25
6. OBJETIVOS .....	26
6.1 Objetivo general .....	26
6.2 Objetivos específicos.....	26
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
7.1 . Diseño del estudio .....	27
7.2 . Población de estudio .....	27
7.3 . Tamaño de la muestra.....	27
8. Criterios de inclusión .....	28

8.1. Grupo de estudio .....	28
8.2. Grupo control .....	28
8.3. Criterios de inclusión .....	28
8.4. Criterios de eliminación .....	28
8.5. Criterios de exclusión .....	28
8.6. Variables .....	29
8.6.1 Descripción de las variables .....	29
8.7. Descripción general del estudio .....	30
8.7.1 Invitación a los participantes .....	30
8.7.2 Obtención de las muestras .....	30
8.7.3 Análisis de los líquidos sinoviales .....	30
8.7.4 Detención de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en líquido sinovial .....	31
8.7.5 Análisis de ERO intracelulares .....	32
8.7.6 Análisis estadístico .....	32
9 RESULTADOS .....	33
10 DISCUSIÓN .....	43
11 CONCLUSIONES .....	46
12 BIBLIOGRAFÍA .....	47
13 ANEXOS.....	53-58

## GLOSARIO

ERO	Especies reactivas de oxígeno
OA	Osteoartrosis
LS	Líquido sinovial
CCP	Cristales de pirofosfato de calcio
EO	Estrés oxidante
KL	Escala radiográfica Kellgren-Lawrence
ATP	Adenosín trifosfato
EULAR	Liga Europea Contra el Reumatismo
ACR	Colegio Americano de Reumatología

## **RESUMEN**

### **Introducción**

El depósito de cristales de pirofosfato de calcio (CPP) se observa en la mayoría de las articulaciones afectadas por formas graves de osteoartritis (OA). Su presencia está asociada a lesiones del cartílago y son capaces de inducir directa e indirectamente un proceso inflamatorio. El estrés oxidante (EO) está relacionado con la inflamación y destrucción acelerada de las articulaciones, ya que las especies reactivas del oxígeno (ERO) son mediadoras de daño tisular en la enfermedad por depósito de CPP. Definir las características oxidantes de los CPP encontrados en OA ayudará a comprender mejor las características de estos depósitos y su influencia como potenciadores de daño o severidad.

### **Objetivo**

Identificar las características oxidantes e inflamatorias por depósitos intraarticulares de CPP y su asociación con el grado de OA de rodilla.

### **Metodología**

Se recolectaron y analizaron líquidos sinoviales (LS) con y sin CPP de pacientes con diferente grado de OA de acuerdo con la escala radiográfica Kellgren-Lawrence (KL) grado 3 (moderada) y 4 (severa). Para valorar la presencia de CPP, se realizó su búsqueda por microscopía de luz polarizada, se evaluó el estado inflamatorio realizando la cuenta total de los leucocitos en cámara de Neubauer y el EO se determinó cuantificando las ERO por ensayos fluorimétricos utilizando CellROX, y diacetato de carboxifluoresceína para  $H_2O_2$ . Se dicotomizó la variable CPP en presente o ausente y se analizó su asociación con OA moderada y severa, se estimó el riesgo de asociación con la prueba de Chi-cuadrada. Las ERO se clasificaron de acuerdo con el % de células estresadas en los LS como: bajo (0-

5%), medio (6-11%) y alto (12-21%); con respecto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también fueron clasificados de 0-10% bajo, 11-20% medio y de 21-44% alto. Todos los análisis se realizaron con el software SPSS v21.

## **Resultados**

Se analizaron 44 LS con OA, de los cuales 43.2% provenían de pacientes con KL-3 y el 56.8% como KL-4. El promedio de edad para la OA moderada fue 68.8±9.1 años y 63.7±9.3 para la severa. El 61.4% de los pacientes fueron del género femenino y 38.6% masculino. Los CPP se detectaron en 9 muestras (20.5%), de las cuales 2 (22.2%) fueron OA moderada y 7 (77.8%) OA severa. Con respecto a los leucocitos, el 81.8% del total no estaban inflamados, 11.4% moderado y 6.8% fuertemente inflamatorios; no hubo diferencias en la inflamación de los LS con y sin CPP. En el 54.5% del total de LS se identificaron ERO bajas, en el 25% medias y en el 20.5% altas. En la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el 50% de los LS totales tuvieron niveles bajos, 29.5% niveles medios, y 20.5% altos. Las ERO en niveles bajos incrementaron significativamente el riesgo de OA moderada con respecto a la OA severa (OR=1.8, IC95%=1.05 – 3.07, p=0.03); adicionalmente, la interacción de la edad con el género afecta significativamente la producción de ERO únicamente a nivel medio (OR=5.26, IC95%=0.04 – 0.88, p=0.03).

## **Conclusiones**

Los CPP fueron más frecuentes en OA severa. Los LS con CPP contienen niveles bajos de inflamación y tienden a incrementar las ERO. En la OA moderada, hubo una asociación con niveles bajos de ERO y altos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no están asociados a los cristales. La edad y el género juegan un papel importante en la modulación de ERO y por ende en el grado de OA.

## 1. INTRODUCCIÓN

La osteoartritis (OA) es la enfermedad articular crónica degenerativa más común y una de las principales causas de dolor y discapacidad. Su prevalencia es cada vez mayor y se espera que sea la mayor causa de discapacidad para el 2030, se define como una enfermedad heterogénea con varios factores de riesgo, incluidos el envejecimiento, la obesidad, el sexo, las lesiones articulares y la herencia, se han visto implicados en su desarrollo y progresión [1].

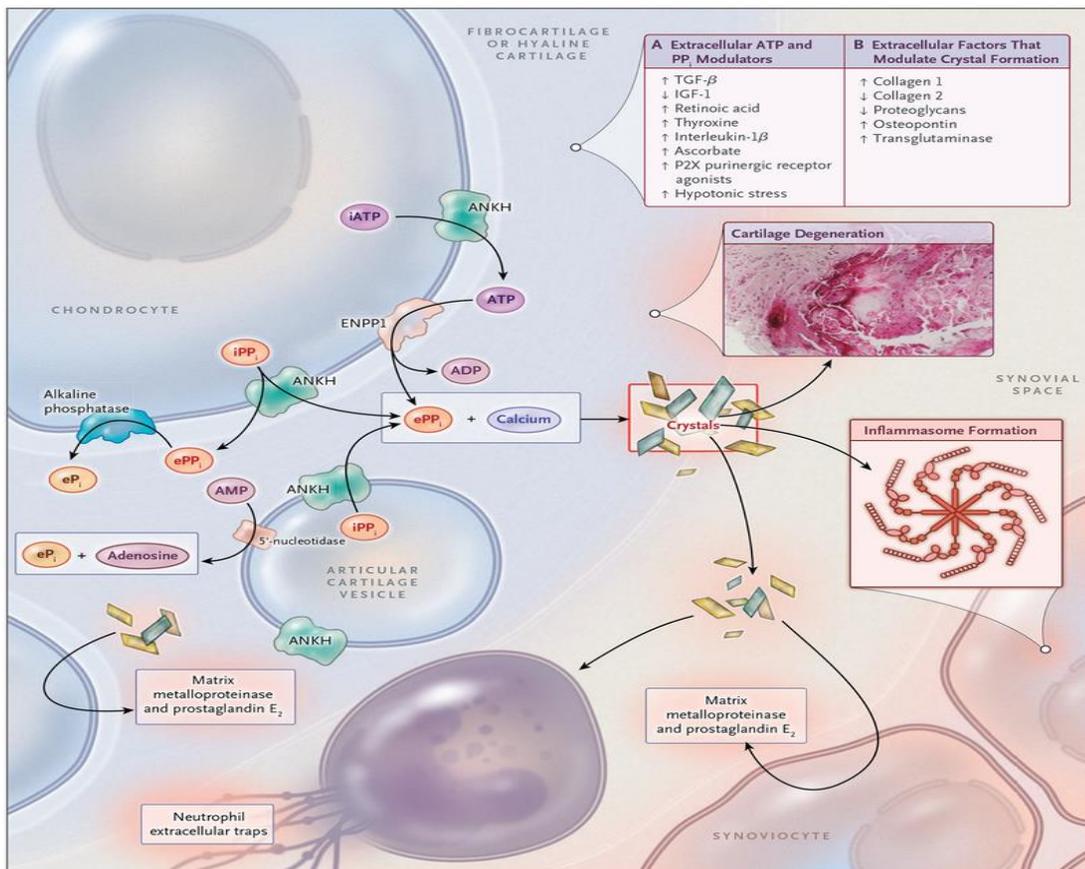
En la población general, la prevalencia de OA de rodilla oscila entre el 20 y el 30% y las sociedades occidentales invierten hasta el 2% de su PIB en los costos de la OA como resultado de la pérdida de productividad laboral y el aumento de los sistemas de atención médicos, ya que el número de cirugías de reemplazo articular como terapia definitiva para la OA severa casi se ha duplicado durante la última década [2].

El papel de la inflamación en la OA es controversial; con frecuencia se observa inflamación sinovial en las articulaciones que puede ser crucial para la patogénesis de la OA, pero en general se considera una enfermedad con inflamación leve a moderada, mostrando signos de degradación del cartílago cuando ya se acompaña de destrucción severa y función deteriorada de la articulación [3].

Los depósitos de cristales de pirofosfato de calcio (CPP) y de fosfato básico de calcio (BCP) se observan en la mayoría de las articulaciones afectadas por formas graves de OA, en el 60% de los LS de pacientes con OA que presentan derrames de rodilla y en el 60% de los LS de pacientes sometidos a artroplastía

total de rodilla. Su presencia está asociada a lesiones del cartílago y son capaces de inducir directa e indirectamente un proceso inflamatorio [4], ya que los CPP pueden interactuar con las células sinoviales y los condrocitos para producir citocinas proinflamatorias; sin embargo, la relación entre los CPP, la inflamación y la OA es aún compleja, poco clara y difícil de abordar. Existen dos hipótesis principales, que los cristales de calcio causan o empeoran la OA, y la segunda: la OA es la causante del depósito de los cristales, no obstante; la presencia de dichos cristales predice un daño radiológico severo y una progresión rápida de la OA [5].

Aunque el mecanismo fisiopatogénico exacto para el desarrollo de la enfermedad por depósito de cristales de pirofosfato de calcio (CPPD) es desconocido, se han propuesto diversos factores como la degradación del adenosín trifosfato (ATP) e incremento del pirofosfato inorgánico (PPi) en las articulaciones, factores genéticos como polimorfismos, alineación inadecuada de la rodilla, baja densidad mineral ósea, calcificación de tejidos blandos y cambios en la matriz extracelular (MEC) del cartílago (Figura 1), los cuales pueden desempeñar un papel importante en la promoción del depósito de CPP, tanto en el cartílago como en la membrana sinovial (MS) y contribuir a la degradación articular y la sinovitis en la OA [6-9].



**Figura 1. Características fisiopatológicas de la CPPD.** La formación de cristales de CPP ocurre en la matriz pericelular del cartílago articular y es facilitada por vesículas extracelulares del cartílago articular. El pirofosfato (PPi) se genera a partir de ATP extracelular y forma complejos con el calcio para formar CPP. El recuadro (A) engloba los factores que modulan los niveles de ATP y PPi extracelulares y el (B) los factores de la MEC que regulan la formación de CPP. Los CPP inducen inflamación en el espacio sinovial pero también tienen consecuencias biomecánicas adversas y efectos catabólicos directos en los tejidos articulares debido a la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> y metaloproteinasas de matriz. Estos factores finalmente producen la degeneración del cartílago. ANKH es la proteína de la anquilosis progresiva, ENPP1 es la enzima pirofosfatasa 1 de ectonucleótido, ePi es el ion fosfato extracelular, ePPi es el pirofosfato extracelular (principal inhibidor endógeno de calcificación), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), PPi

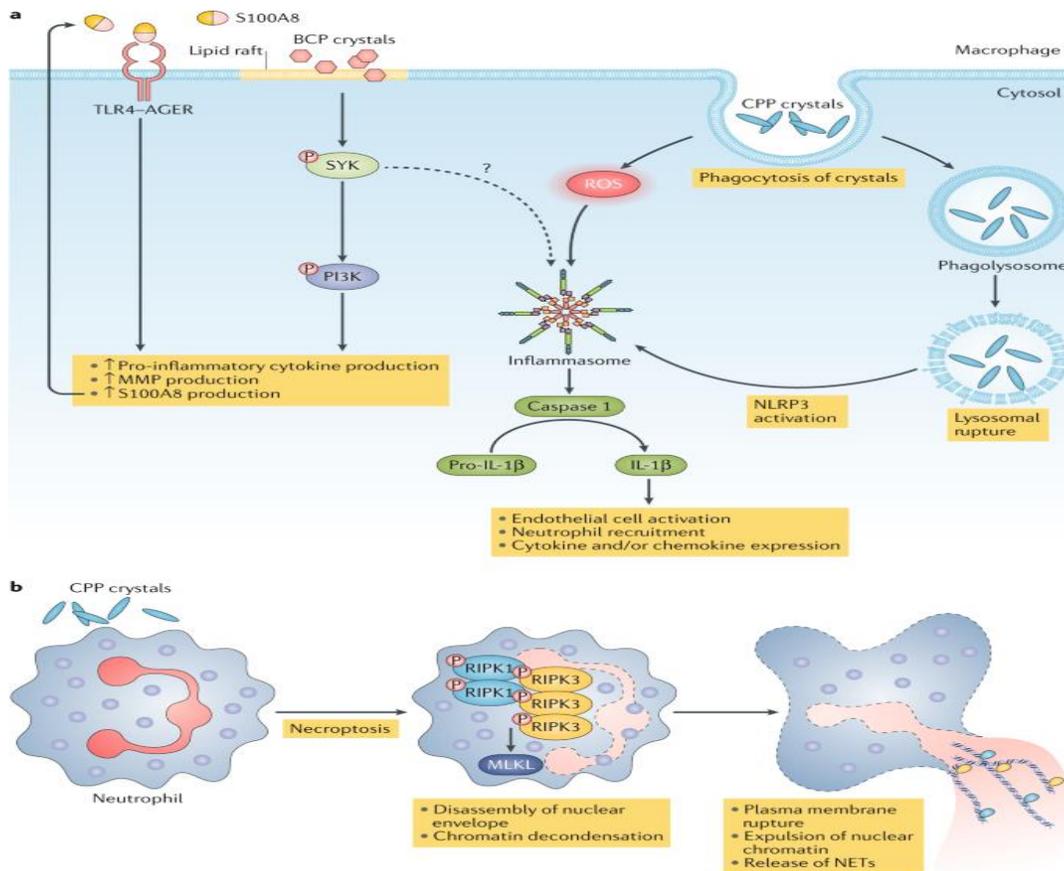
intracelular iPPi y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Imagen tomada de Rosenthal AK, Ryan LM. Calcium Pyrophosphate Deposition Disease. N Engl J Med. 2016, 30;374(26):2575-84.

En algunos estudios recientes se compararon las características de pacientes con OA grave con y sin CPP, se obtuvieron LS y se analizaron bajo microscopía de luz polarizada, se identificó la presencia de cristales de CPP en el 52.9%; sin embargo, no hubo diferencias en los pacientes con y sin cristales con respecto a la edad de inicio del dolor, sexo, dificultad para realizar las funciones diarias, historia de inflamación articular previa, utilización de ayuda para caminar y número y tipos de medicamentos que se han usado. Se encontró una alta prevalencia de CPP en pacientes sometidos a cirugía de reemplazo total de rodilla, no obstante, se desconoce si los cristales juegan un papel en la severidad de la enfermedad [10,11] o si estos desencadenan un EO que contribuya a una mayor severidad de la OA.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Patogénesis de los CPP**

En la reacción inflamatoria inducida por CPP intervienen los receptores tipo toll (TLRs), los receptores citosólicos del tipo inflammasoma (NLRP3) e interleucinas como la IL-1 $\beta$ ; (Figura 2) sin embargo, los CPP pueden estar presentes en articulaciones clínicamente no inflamadas, en personas con brotes agudos (pseudogota) y en etapas crónicas, lo que sugiere que existen mecanismos reguladores adicionales y autolimitantes de la inflamación [10,11].



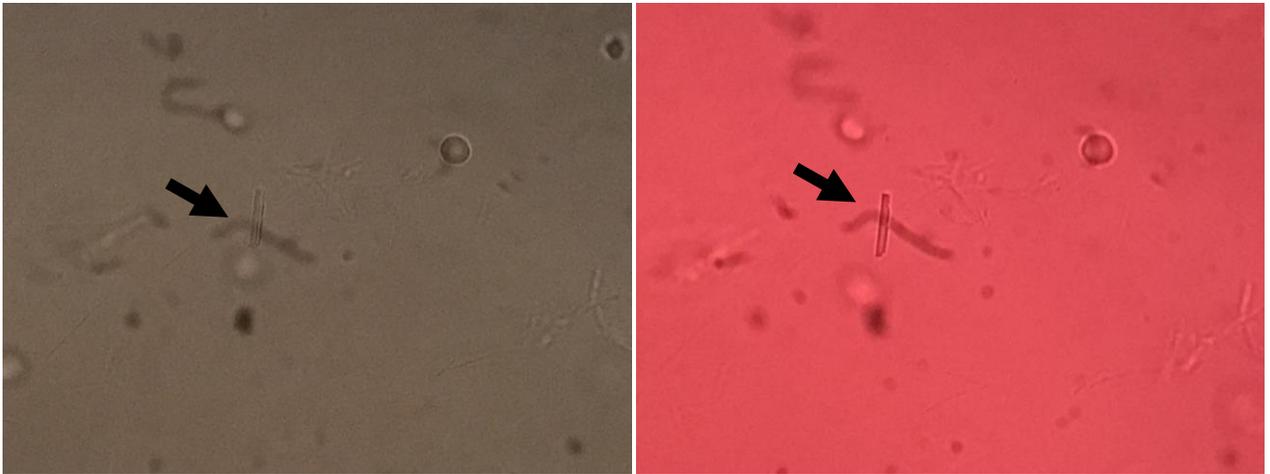
**Figura 2.** Mecanismos moleculares de reconocimiento de cristales de calcio en las células, activación de la inflamación y generación de ERO. (Imagen tomada de McCarthy y Dunne, 2018).

En artropatías cristalinas como la gota y pseudogota, la interacción entre la respuesta inmune y los cristales de urato monosódico (CUM) induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) [12].

### 2.1.2 Diagnóstico de CPP

De acuerdo con las recomendaciones de la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) para el diagnóstico de CPPD, el análisis del LS es el patrón de oro con fines diagnósticos; la identificación de los cristales de CPP se realiza con microscopia de luz polarizada y sus

características son las siguientes: forma de puro, romboidal o paralelepípedo, predominantemente intracelulares con birrefringencia positiva débil o ausente a la luz polarizada [13,14].



**Figura 3.** A) Estructura cristalina en forma de puro, observados bajo luz polarizada, birrefringencia débil. B) Cristal observado con filtro polarizado y compensador rojo de primer orden, la estructura muestra birrefringencia débil o nula. Objetivo 40x. Microscopio Axioskop 40, Carl Zeiss.

La frecuencia de CPPD es probablemente mayor a la reportada, ya que los pacientes con formas menos típicas de artritis por CPPD, y que semejan en su presentación a otras artropatías inflamatorias (pseudoreumatoide, pseudoneuropática, etc) pueden no ser correctamente identificados, dado el hábito extendido de basar el diagnóstico en datos clínicos y radiológicos, sin recurrir a la identificación de cristales en LS; por lo tanto, la ecografía es una herramienta prometedora que necesita estudios adicionales para demostrar su implicación en la evaluación de esta enfermedad [15].

Estudios recientes demostraron la utilidad de la ecografía en la identificación de los depósitos de CPP en el cartílago hialino y el fibrocartílago, definiendo las lesiones elementales [16]. Dada su similitud clínica con la gota, tradicionalmente se ha intentado aplicar la misma estrategia terapéutica, pero hasta la fecha no se conoce ningún tratamiento capaz de disolver o eliminar los CPP del LS.

## **2.2 Estrés oxidante y daño articular**

Las especies reactivas se forman durante los procesos fisiológicos y normalmente a niveles relativamente bajos en todas las células y tejidos [17], siendo su principal fuente endógena la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias [18].

La producción aerobia de la energía para los diferentes procesos celulares ocurre a través de la fosforilación oxidativa, en las que reacciones de óxido-reducción (redox) conducen a la síntesis de ATP. Durante este proceso, el  $O_2$  es el receptor final de electrones, produciendo  $H_2O$  como producto final. Algunos productos intermedios de estas reacciones redox son metabolitos del  $O_2$  altamente reactivos o ERO. Aproximadamente el 2% del  $O_2$  parcialmente reducido es capaz de dañar moléculas y estructuras celulares, particularmente proteínas, carbohidratos, lípidos de la membrana celular y ADN (19).

Las principales ERO radicales son el anión superóxido ( $O^{\cdot-}$ ), peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ ), perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y las no radicales: peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno singulete ( $O_2$ ). Las ERN incluyen al óxido nítrico ( $ON^{\cdot-}$ ), dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\cdot}$ ) y peroxinitrito ( $OONO^{\cdot}$ ). En cuanto a las especies reactivas del cloro, encontramos al ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) [20, 25], y del azufre, el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ); las cuales, están presentes en tejidos, articulación

rotuliana y en LS de pacientes con artritis reumatoide (AR), ya sea en fases agudas o crónicas de la enfermedad [26].

La sobreproducción o la eliminación inadecuada de ERO conducen a un desbalance entre la producción de radicales libres y los sistemas antioxidantes endógenos y/o exógenos conocido como “estrés oxidante” (EO), el cual, es uno de los factores clave involucrados en la patogénesis y en la fisiopatología de enfermedades como la gota y AR porque pueden activar diferentes vías de transducción de señales involucradas en la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas como la vía de señalización del factor nuclear kappa b (NFκB) [27-25], la cual se ha correlacionado positivamente con la gravedad de la AR [26].

Las ERO pueden formarse en la articulación inflamada procedente de los condrocitos, macrófagos y células polimorfonucleares de la MS y del LS inflamado, éstas células, al activarse promueven la formación de  $O^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^{\cdot-}$  y citocinas pro-inflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1- beta (IL-1 $\beta$ ) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que activan el complejo NADPH oxidasa que cataliza la conversión de  $O_2$  en radical  $O^{\cdot-}$  [23] involucrado en la progresión de la enfermedad articular [13,26-27].

Otras fuentes de ERO son las enzimáticas, como las generadas por las óxido nítrico sintasas, nitrito reductasas, las enzimas productoras de  $H_2S$ , la mieloperoxidasa (MPO) presente en las células fagocíticas y la cual produce HOCl [22], así como las generadas por la reperfusión hipóxica, la cual se produce por una elevada presión en la MS, ocasionada por una disminución de la pared articular debido a la inflamación y fibrosis de la articulación, ocasionando una

reducción de la densidad capilar y un incremento en su tasa metabólica, esta presión intraarticular elevada induce una lesión por isquemia-reperfusión en la articulación [28].

El daño oxidativo por la hipoxia y la inflamación promueve una inestabilidad genómica que conduce a alteraciones metabólicas en los sinoviocitos. La hipoxia produce un incremento de las ERO que oxidan a los ácidos grasos poliinsaturados del plasma y de las membranas mitocondriales, generando productos de peroxidación lipídica como el 4-hidroxi-2-nonenal, el cual, forma aductos covalentes con el ADN, fosfolípidos y aminoácidos [28].

El EO está relacionado con la inflamación y la destrucción acelerada de las articulaciones, ya que las ERO son mediadoras del daño tisular en algunas formas de artritis como la AR y en CPPD [29], en esta última, la calcificación patológica tanto en las articulaciones como en la pared endotelial induce a una inflamación crónica y puede aumentar significativamente el riesgo de enfermedades cardiovasculares [30].

## **2.3 Características clínicas, clasificación y diagnóstico de la OA**

### **2.3.1 Características clínicas**

Los síntomas principales de la OA son dolor en las articulaciones, rigidez y restricción locomotora. Los síntomas generalmente se presentan en solo una o algunas articulaciones en una persona de mediana edad o mayor. El dolor en la OA empeora con el uso conjunto (dolor relacionado con el uso) y se alivia con el reposo. Es el síntoma más frecuente y puede progresar a través de tres etapas:

Etapa 1: dolor agudo y predecible generalmente provocado por un insulto mecánico que eventualmente limita las actividades de alto impacto con un efecto relativamente modesto en la función.

Etapa 2: el dolor se vuelve más constante y comienza a afectar las actividades diarias. Puede haber episodios impredecibles de rigidez.

Etapa 3: dolor sordo/doloroso constante puntuado por episodios de dolor a menudo impredecible, intenso y agotador que da como resultado limitaciones severas en la función. [39]

### **2.3.2. Clasificación de osteoartrosis de rodilla**

El diagnóstico clínico de osteoartrosis se es eminentemente clínico-radiológico, se realiza con base en una historia clínica completa y exploración física dirigida. Se recomienda solicitar estudios de laboratorio y radiología de forma selectiva para investigar causas secundarias de osteoartrosis, otras causas de dolor no articular, enfermedades inflamatorias y sistémicas.

Se recomienda solicitar estudios de radiología en los pacientes con los siguientes hallazgos:

- Presencia de derrame sinovial.
- Pérdida del arco de movimiento sin alguna condición patológica existente.
- Dolor articular severo.
- Cuando después de la exploración física el dolor articular no se justifique por lesión ligamentaria o bursitis.
- Nula o pobre respuesta a tratamiento conservador.
- En todo paciente que será referido a valoración por reumatología y ortopedia.

Las proyecciones son:

- Posición anteroposterior, simple bilateral en bipedestación con carga.
- Proyección lateral con flexión de 60 grados.
- Proyección axial patelar a 30, 60 y 90°.

De acuerdo a la guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la osteoartrosis de rodilla de México, de la Secretaría de Salud, las características radiológicas para la clasificación de la OA (Kellgren y Lawrence) son:

Grado	Características
0	Normal
1	(Dudoso) Estrechamiento del espacio articular. Posibles osteofitos.
2	(Leve) Posible disminución del espacio articular. Osteofitos.
3	(Moderado) Estrechamiento del espacio articular. Osteofitos. Leve esclerosis. Posible deformidad de los extremos de los huesos.
4	(Grave) Marcada disminución del espacio articular. Osteofitos abundantes. Esclerosis grave. Deformidad de los extremos de los huesos.

Tabla 1. Clasificación Radiológica de OA por escalas de KL.

Para el diagnóstico de precisión se han descrito criterios específicos destacándolos del Colegio Americano de Reumatología ([tabla 2](#)), sin embargo, desde el punto de vista práctico estos criterios son principalmente utilizados en el desarrollo de estudios de investigación.

Historia clínica	Gonalgia, > de 50 años, rigidez < 50 min, crépitos, sensibilidad ósea, sin aumento de temperatura, aumento de volumen óseo <sup>a</sup> .
------------------	---

Exámenes de laboratorio	VHS < 40 mm/h, factor reumatoide < 1:40 <sup>b</sup> .
Estudios radiológicos	Osteofitos.

<sup>a</sup> Al menos tres criterios positivos.

<sup>b</sup> No son indispensables, sólo recomendaciones.

Es importante recordar que no existe una correlación directa entre el grado de deterioro articular radiológico y la presentación clínica de los pacientes pese a lo cual es recomendable tener un estudio básico de rayos X en todos los pacientes. Es fundamental conseguir radiografías de buena calidad técnica, recomendándose un estudio básico en proyección anteroposterior, lateral, axial de rótula y Rosenberg. Es fundamental recalcar la importancia de esta última proyección, ya que es la que tiene mejor correlación con la disminución del grosor del cartílago articular, en especial en el compartimento medial. Radiológicamente la OA de rodilla se clasifica en 5 grados según lo descrito por Kellgren-Lawrence (tabla 2), existiendo además otras clasificaciones descritas, como la de Ahlback.

**Tabla 2.**

<b>CLASIFICACIÓN</b>	<b>ESCALA KL. Característica radiográfica</b>
<b>Grado 0</b>	Sin características patológicas de la OA
<b>Grado 1 (OA dudosa)</b>	Estrechamiento sospechoso del espacio articular y posible labio óseo
<b>Grado 2 (Leve)</b>	Tejido óseo claro y posible estenosis del espacio articular
<b>Grado 3 (Moderada)</b>	Tejido óseo múltiple moderado, estrechamiento claro del espacio articular, esclerosis leve y posible deformidad de los extremos de los huesos

<b>Grado 4 (Grave)</b>	Tejido óseo grande, estrechamiento marcado del espacio articular, esclerosis severa y deformidades claras de los extremos de los huesos
----------------------------	---

Figuroa, R. M., Figuroa, C. M., Rodriguez, R. C., & Poblete, D. F. (2015). Osteoarthritis (artrosis) de rodilla. Revista Chilena de Ortopedia y Traumatología, 56(3), 45-51.



**Figura 4.** Ejemplo de la escala KL. La clasificación KL es la escala radiográfica más utilizada (Anotar la referencia).

### 2.3.3 Diagnóstico

La OA se puede diagnosticar sin el uso de radiografías y/o estudios de laboratorio en presencia de síntomas y signos típicos en el grupo de edad en riesgo.

La artrosis de rodilla se puede diagnosticar con confianza solo con motivos clínicos si se presenta lo siguiente:

- Dolor articular persistente relacionado con el uso de la articulación

- Edad  $\geq 45$  años
- Rigidez matinal  $\leq 30$  minutos

La ubicación del dolor en la OA de rodillas puede indicar el compartimento afectado. El dolor puede ser anteromedial o más generalizado en el lado medial en la artrosis de la articulación femorotibial del compartimento medial o anterior en la artrosis de la articulación femorrotuliana. El dolor de la artrosis de la articulación femorrotuliana se exagera al estar sentado durante mucho tiempo, levantarse de una silla baja y subir escaleras o pendientes (bajar suele ser más doloroso que subir). El dolor anterior de rodilla más generalizado con radiación distal sugiere OA de rodilla de moderada a grave, y el dolor nocturno persistente que interrumpe el sueño o el descanso ocurre en OA avanzada. La OA de rodilla por lo general no causa dolor en la parte posterior de la rodilla a menos que haya un quiste poplíteo (de Baker) que lo complique. Los pacientes también informan una sensación de “ceder” (especialmente con OA de la articulación femorrotuliana y/o debilidad del cuádriceps) e inestabilidad, los cuales pueden asociarse con caídas [40,41].

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los mecanismos exactos a través de los cuales el EO inducido por los CPP puede contribuir al inicio y la propagación de la inflamación local en el medio articular en la OA, particularmente en etapas tempranas, aún no se han determinado.

Ningún estudio a la fecha plantea la hipótesis que los CPP inducen un tipo de EO, el cual modula la duración e intensidad de la inflamación que determina el desarrollo y progresión de la OA de rodilla severa. Por lo anterior, nos hemos propuesto responder ¿Qué ERO se encuentran sobre expresadas en los pacientes con OA asociada a CPP comparado con pacientes con OA sin hallazgos

de CPP? Para conocer si las ERO podrían ser potenciales biomarcadores de patogénesis o como posibles predictores para OA severa de rodilla.

Nuestros antecedentes muestran la necesidad de evaluar las vías de inflamación y EO activadas en las células del LS, para asegurar, identificar y comprender la participación de los CPP como inductores moleculares de regulación de la patogénesis de la OA severa de rodilla con la intención de dilucidar blancos terapéuticos que nos permitan, mediante medicina traslacional, diseñar y/o proponer nuevas estrategias de tratamientos más específicas y eficaces.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente son escasos los estudios de asociación entre la precipitación de CPP sobre el tejido articular y los cambios degenerativos asociados al EO inducido por los CPP. Por lo tanto, nuestro objetivo en este estudio fue definir las características oxidantes de los depósitos de CPP a través del análisis de LS y en pacientes con OA asociada a CPP, para lograr una mejor comprensión de los fenómenos oxidativos fisiopatológicos que subyacen de manera espacio temporal en las articulaciones afectadas por CPP para poder identificar alternativas diagnósticas y terapéuticas.

#### **5. HIPÓTESIS**

Existe una asociación entre el depósito de CPP y la generación de EO en pacientes con OA de rodilla severa.

## **6. OBJETIVOS**

### **a. Objetivo general.**

Identificar la asociación entre las características oxidantes e inflamatorias de los depósitos intraarticulares de CPP en la severidad de la OA de rodilla.

### **b. Objetivos específicos.**

- a) Obtener un perfil de ERO inducidos por CPP en pacientes con OA grave (KL3) y severa de rodilla (KL4).
- b) Identificar el grado de inflamación entre los diferentes grupos estudio.
- c) Correlacionar las características oxidantes del LS con los grados de OA grave y severa.
- d) Identificar asociación entre la presencia de CPP con los hallazgos clínicos, microscópicos y radiográficos de los pacientes.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Diseño del estudio**

Se realizó un estudio de casos y controles. El tipo de estudio fue transversal.

### **7.2 Población de estudio**

El universo de trabajo fueron pacientes del Servicio de Reemplazo Articular del INR-LGII con diagnóstico de OA basado en los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR), con clasificación de escalas Kellgren-Lawrence (KL) grado 3 y 4. Se incluyeron hombres y mujeres de 45 a 80 años que firmaron la carta de consentimiento informado (Anexo 1) y que donaron su LS durante el procedimiento quirúrgico al que fueron sometidos. Se formaron los casos con todas aquellas muestras positivas a CPP y los controles aquellos sin CPP. Se

eliminaron muestras de pacientes contaminadas, con hemólisis e insuficientes. Se excluyeron pacientes con gota, con cristales de colesterol, con artritis reumatoide y con lupus eritematoso sistémico.

El grupo control fueron hombres y mujeres de 45 a 80 años, sometidos a cirugía de reemplazo articular por OA grado 3 o grado 4 y ausencia de CPP en el LS, que firmaron la carta de consentimiento informado.

### **7.3 Tamaño de la muestra**

Realizamos un cálculo de tamaño de muestra por diferencia de proporciones, con base en el artículo de Frallonardo et al. 2016, en el que reportaron una proporción esperada de pacientes con CPP y OA severa de 0.310, ellos estudiaron 74 pacientes con OA, de los cuales 23 pacientes encontraron de CPP. Asimismo, con base en el artículo de Ryu et al. 2014, ellos manejaron una proporción de 304 pacientes, de los cuales 79 contenían en sus LS CPP (proporción de 0.259), en 225 LS no se encontraron CPP (0.74). Tomando los valores de estas proporciones con el programa de <http://www.winepi.net/f108.php>, considerando un nivel de confianza 95% y una potencia 80%, si la proporción 31% de la muestra A es menor que la proporción 74% de la muestra B, o si 74% es mayor que 31%,

Se calculó una muestra de 16 individuos de cada grupo (grupo de OA (KL3) con CPP, grupo (KL4) con CPP, grupos OA (KL3 y 4) sin CPP como controles), en total se necesitan 64 pacientes con esas características.

## **8. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

### **8.1 Grupo de pacientes**

Hombres y mujeres de 45 a 80 años, sometidos a cirugía de reemplazo articular por OA grado 3 y 4, que firmaron la carta de consentimiento informado y donaron su LS posterior al procedimiento quirúrgico.

### **8.2 Grupo control**

Hombres y mujeres de 45 a 80 años, sometidos a cirugía de reemplazo articular por OA grado 3 y 4 y que su LS no contenga CPP, que firmen la carta de consentimiento informado y que donen su LS posterior al procedimiento quirúrgico.

### **8.3. Criterios de Inclusión**

Hombres y mujeres de 45 a 80 años, sometidos a cirugía de reemplazo articular de rodilla por OA (KL=3 y 4) definida de acuerdo con los Criterios del Colegio Americano de Reumatología para la clasificación de la OA de rodilla. El diagnóstico clínico de OA es eminentemente clínico-radiológico, se realizó con base en una historia clínica completa y exploración física dirigida. Se solicitaron estudios de laboratorio y radiología de forma selectiva para investigar causas secundarias de OA, otras causas de dolor no articular, enfermedades inflamatorias y sistémicas.

### **8.4. Criterios de eliminación**

- LS insuficientes, hemáticos y con información clínica incompleta.
- LS que se contaminaron en el transcurso del aislamiento y traslado de muestras.
- LS con cristales de urato monosódico.

## 8.5 Criterios de exclusión

-LS de pacientes hiperuricémicos, LS de pacientes con gota (definida de acuerdo con los criterios del CAR).

-LS de pacientes con diagnóstico de espondilitis anquilosante.

-LS de pacientes con desórdenes autoinmunes como AR y con lupus eritematoso sistémico.

## 8.6 Variables

### 8.6.1 Descripción de las variables de estudio, unidades de medida y escalas de medición

Tabla 3.

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	OPERACIONALIZACIÓN	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA	ESCALA DE MEDICIÓN
CPP	Catagórica	Estructuras cristalinas compuestas de pirofosfato de calcio dihidratado $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dentro y alrededor de las articulaciones, principalmente en el cartilago articular y el fibrocartilago	Cristales de CPP en forma romboide o paralelepipedo con birrefringencia positiva a la luz polarizada. El cristal exhibe color amarillo o azul según la orientación de su eje con respecto al eje del compensador del microscopio.	Cristales de CPP	Nominal	Presencia/Ausencia
Estrés Oxidante	Dependiente	Estado fisiológico en el que ocurre un incremento de ERO/ $\text{H}_2\text{O}_2$ y una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante endógeno	Determinación de ERO y $\text{H}_2\text{O}_2$ en las células del LS	Cuantificación de la fluorescencia y/o absorbancia que es capaz de emitir la célula cuando produce ERO	Nominal Bajo (0-5%) Medio (6-11%) Alto (12-21%)	0-100 (Porcentaje %)
Inflamación	Dependiente	Respuesta inmunológica de las células cuando se exponen a CPP	Mediante la cuantificación de leucocitos totales/ $\text{mm}^3$	Cuantificación de las células	Nominal No inflamatorio (< 2000/ $\text{mm}^3$ ). Moderadamente inflamatorio (2000-5000). Fuertemente inflamatorio (>5000)	0-50,000/ $\text{mm}^3$
Edad	Continua	Años de vida de los sujetos de estudio	Años	18-100 años	Razón	18-100 años
Sexo	Catagórica	Género al que pertenece el sujeto de estudio	MASCULINO FEMENINO	Hombre Mujer	Nominal	Masculino/Femenino

Diagnóstico clínico	Dependiente	Estrechamiento del espacio articular moderado o marcado, abundancia de osteofitos, esclerosis leve o grave, posible deformidad de los huesos.	OA	Escala de KL: 3 o 4	Nominal	OA grave/severa
Depósito de CPP radiológico	Categorica	Cristales de pirofosfato cálcico dihidratado en los fibrocartilagos y en el cartilago hialino articular.	Calcificación lineal bilateral en fibrocartilagos articulares de las rodillas, con la calcificación del cartilago hialino de cóndilos femorales.	Calcificación lineal bilateral en rayos X	Nominal	Sí/No

Continuación de la tabla 3.

## 8.7 Descripción general del estudio

### 8.7.1 Invitación a los participantes

Los potenciales participantes fueron invitados a participar al protocolo de investigación mediante entrevista. Se les explicó el propósito de la investigación y los resultados esperados. Además, se les indicó que su información permanecerá protegida de manera confidencial. Todos los participantes firmaron la carta de consentimiento informado. De su expediente clínico se obtuvieron las variables de sexo, edad, articulación afectada, diagnóstico y escala de clasificación KL.

### 8.7.2 Obtención de las muestras

Los LS fueron obtenidos por artrocentesis durante la cirugía de reemplazo articular, estos fueron depositados en una jeringa estéril de 5ml y de manera inmediata se transportaron al área operativa del Laboratorio de Líquido Sinovial. La jeringa fue rotulada con una etiqueta que identificó al participante con un folio.

### 8.7.3 Análisis de LS

Se realizó el análisis macroscópico y microscópico de LS del paciente participante del estudio, el análisis macroscópico incluyó: volumen recibido, color, aspecto y viscosidad y el microscópico la identificación de CPP y No. De leucocitos totales/mm<sup>3</sup>. El análisis de LS fue realizado por dos observadores

entrenados, de acuerdo con los métodos estándar para recuento total de glóbulos blancos se utilizó una cámara de conteo Neubauer (Martínez-Castillo et al. 2009). Los cristales se identificaron por morfología y birrefringencia utilizando microscopía de luz polarizada compensada. La presencia de cristales de CPP se confirmó mediante la demostración de cristales débilmente birrefringentes romboides o con forma de bastón, birrefringencia positiva a la luz compensada utilizando filtro rojo de primer orden (Martínez-Castillo et al. 2009). Con el fin de asegurar una identificación precisa de los CPP, se centrifugaron LS no inflamatorios, a baja velocidad para evitar el empaquetamiento de las células y desechos que dificultan el reconocimiento de cristales no birrefringentes.

#### **8.7.4 Detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en LS**

La detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular se realizó utilizando el kit comercial DCFH-DA (5-, 6- carboxy-2', 2', 7'-diclorofluorescein diacetato), el cual consiste en la identificación y cuantificación de la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína (DCF) cuando esta es oxidada por la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las células estresadas, emitiendo una fluorescencia verde detectada a longitudes de onda de excitación y emisión de 488/530 nm respectivamente. Los LS fueron centrifugados a 5000 rpm en una microcentrífuga y los botones celulares de los LS fueron lavados 5 min con PBS suplementado con calcio/magnesio a 37 °C, se colocó una solución de DCFH-DA (25 µM) disuelta en PBS durante 20 min a 37 °C, y protegidos de la luz. Posteriormente las células fueron lavadas cuidadosamente con PBS y se analizaron en un lector de fluorescencias utilizando la técnica de citometría basada en imagen en un equipo "Tali Image Based Cytometer (TIBC)" Invitrogen de Life Technologies.

### **8.7.5 Análisis de ERO intracelulares**

La producción de ERO intracelulares se evaluaron con el kit CellROX (Molecular Probes, Life Technologies Cat. C10422), la cual es una prueba fluorogénica diseñada para medir ERO en células vivas. El reactivo CellROX es permeable a las células, cuando este es oxidado por las ERO exhibe una fuerte señal roja fluorescente que se localiza en el citoplasma. Después de obtener las células del LS mediante centrifugación, se adicionó a las células el reactivo CellROX a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  y se incubó durante 30 minutos en PBS y a 37 °C, en la oscuridad. El amortiguador de fosfatos fue removido y se realizaron tres lavados con PBS, se documentó el % de células fluorescentes por citometría basada en imagen en un equipo “Tali Image Based Cytometer (TIBC)” Invitrogen de Life Technologies.

### **8.7.6 Análisis estadístico**

Con la información obtenida se construyó una base de datos global con la que se realizó el análisis estadístico con el software SPSS v21. Se dicotomizó la variable CPP en presente o ausente y se analizó su asociación con OA moderada y severa, se estimó el riesgo de asociación con la prueba de Chi-cuadrada. Las ERO se clasificaron de acuerdo al % de células estresadas en los LS como: bajo (0-5%), medio (6-11%) y alto (12-21%); con respecto al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , también fueron clasificados de 0-10% bajo, 11-20% medio y de 21-44% alto.

La clasificación de la variable OA se dicotomizó tomando en cuenta los grados de clasificación de la enfermedad como: grave/severa se realizó con escalas nominales. En todos estos casos, la medida de asociación fue el OR con IC95% y la prueba de hipótesis con Chi cuadrada. Se aplicó estadística descriptiva y se analizaron frecuencias y porcentajes. Un valor de  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Para un análisis bivariado, exploramos si los

cristales y los datos demográficos estaban asociados entre sí y posteriormente realizamos un análisis multivariado con el modelo de regresión logística a fin de establecer el modelo de predicción de OA severa o moderada según la presencia de CPP + los datos demográficos.

## **9.RESULTADOS**

Se excluyeron 9 pacientes por datos incompletos en su expedientes o muestras de LS hemáticas. Después de la recolección de datos pudimos incluir los resultados y datos clínicos de 44 pacientes, de los cuales 9, es decir, el 20 % de los pacientes presentaron CPP en sus LS, la mayoría de los pacientes (el 95.5 %) eran mayores de 55 años de edad, el sexo que más predominó fue el sexo femenino en un 61.4 % y un 38.6% pertenecían al masculino, el grado de osteoartrosis clasificado por KL , fue del 43,2 % para una OA grado 3 y el 56.8 % presentaron una OA grado 4 (Tabla 4).

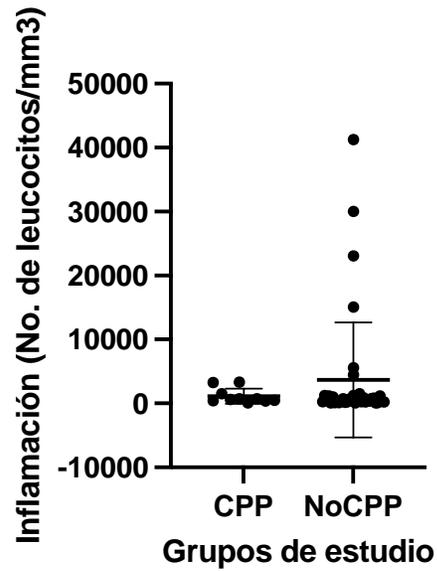
**Tabla 4.** Descripción de la población de estudio

	OA total N=44 (%)	OA moderada (%)	OA severa (%)	<i>p</i> *
<b>Edad (años)</b>	64.2 ± 9.23	64.8 ± 9.1	63.7 ± 9.3	
≤50	2 (4.5)	0 (0.0)	2 (100.0)	0.49*
>50	42 (95.5)	19 (45.2)	23 (54.8)	
<b>Género</b>				
Masculino	17 (38.6)	5 (29.4)	12 (70.6)	0.21*
Femenino	27 (61.4)	14 (51.9)	13 (48.1)	
<b>CPP</b>				
Positivo	9 (20.5)	2 (22.2)	7 (77.8)	0.26*
Negativo	35 (79.5)	17 (48.6)	18 (51.4)	
<b>K-L</b>	-	19 (43.2)	25 (56.8)	
<b>Estado inflamatorio</b>				
No inflamado	36 (81.8)	16 (44.4)	20 (55.6)	0.92
Moderado	5 (11.4)	2 (40.0)	3 (60.0)	
Fuerte	3 (6.8)	1 (33.3)	2 (66.7)	
<b>ERO</b>				
Bajo	24 (54.5)	14 (58.3)	10 (41.7)	0.08
Medio	11 (25.0)	3 (27.3)	8 (72.7)	
Alto	9 (20.5)	2 (22.2)	7 (77.8)	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>				
Bajo	22 (50.0)	9 (40.9)	13 (59.1)	0.69
Medio	13 (29.5)	5 (38.5)	8 (61.5)	
Alto	9 (20.5)	5 (55.6)	4 (44.4)	

OA, osteoartritis; CPP, cristales de pirofosfato; K-L, escala radiológica de Kellgren y Lawrence; ERO, especies reactivas de oxígeno.  $P = \chi^2$  de Pearson; \* $p$  = prueba exacta de Fisher.

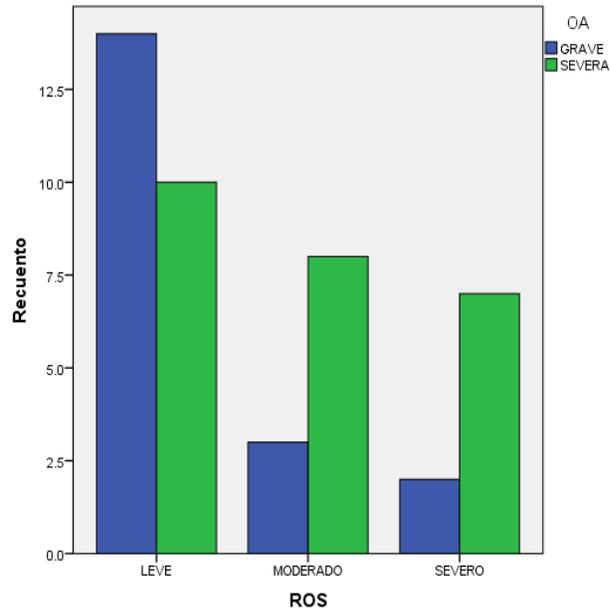
Con respecto a los leucocitos, el 81.8% del total de los LS no estaban inflamados, 11.4% estaban moderadamente inflamados y una minoría, el 6.8% fuertemente

inflamatorios; no hubo diferencias en la inflamación de los LS con y sin CPP (Figura 5).



**Figura 5.** Cuantificación del número de leucocitos totales en LS, comparación entre LS con CPP y sin cristales. Análisis de comparación de medias  $\pm$  desviación estándar, T-test (No paramétrico)  $p > 0.05$ .

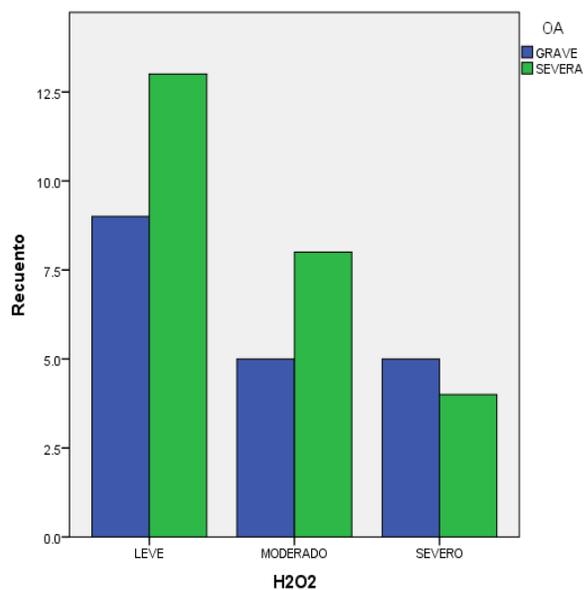
En cuanto a la cuantificación de ERO, en el 54,5 % del total de LS, se identificaron ERO bajas (leves), en el 25% de los LS medias o moderadas y en el 20.5% altas ERO ó severa (Tabla 4). En cuanto a la clasificación de ERO en bajas, moderadas y severas por grado de OA (grave o severa) se presentan los datos en la figura 6.



**Figura 6.** Cuantificación de ROS (ERO) en LS de OA grave (KL3) y OA severa (KL4). Se clasificaron los niveles de ERO en leves o bajos, moderados o medios y altas o severo de acuerdo al % de células cuantificadas con ERO en los LS.

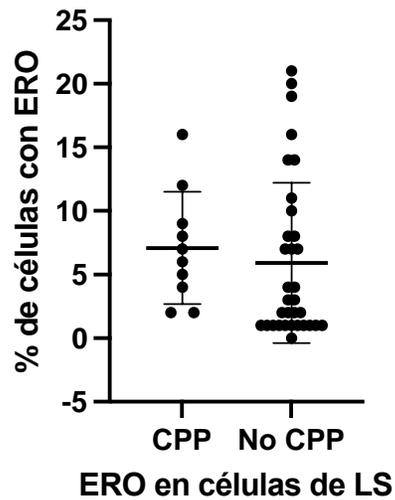
En la producción de  $H_2O_2$ , el 50% de los LS totales tuvieron niveles bajos, 29.5% niveles medios, y 20.5% de los LS presentaron niveles altos (Tabla 4).

De acuerdo al % de células con  $H_2O_2$ , los LS fueron clasificados con contenido o niveles de  $H_2O_2$  leve, moderado o medio y alto o severo y de acuerdo al grado de OA grave (KL3) y severa (KL4), estos datos son presentados en la figura 7 .



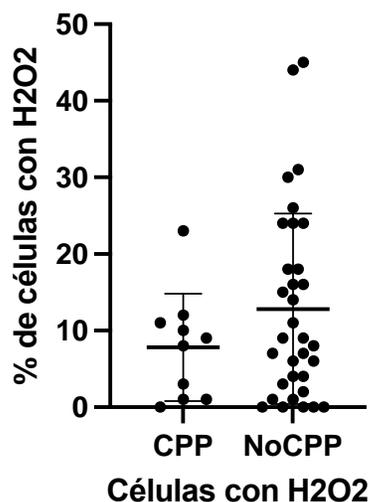
**Figura 7.** Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células de LS de OA grave (KL3) y OA severa (KL4). Clasificación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con base en el % de células fluorescentes en los LS.

La comparación de ERO entre los LS con CPP y sin CPP, resultó no ser estadísticamente significativa, ya que en aquellos LS con CPP se cuantificaron  $7.1 \pm 4.4\%$  de ERO contra  $5.9 \pm 6.3\%$  de las ERO de los LS con OA pero con ausencia de cristales (Figura 8).



**Figura 8.** Cuantificación del % de células con ERO en el LS, comparación entre células de LS con CPP y sin cristales. Análisis de comparación de medias  $\pm$  desviación estándar, T-test (No paramétrico)  $p > 0.05$ .

En la producción de  $H_2O_2$ , el 50% de los LS totales tuvieron niveles bajos, 29.5% niveles medios, y 20.5% altos (Tabla 4), no obstante, comparando entre los grupos de LS con CPP y aquellos sin CPP, encontramos que en aquellos con contenido de CPP se cuantificaron  $7.8 \pm 7.0\%$  de células con  $H_2O_2$  comparado con un  $12.8 \pm 12.4\%$  de células con  $H_2O_2$  en general, sin clasificarlo como niveles bajos, medios o altos (Figura 9).



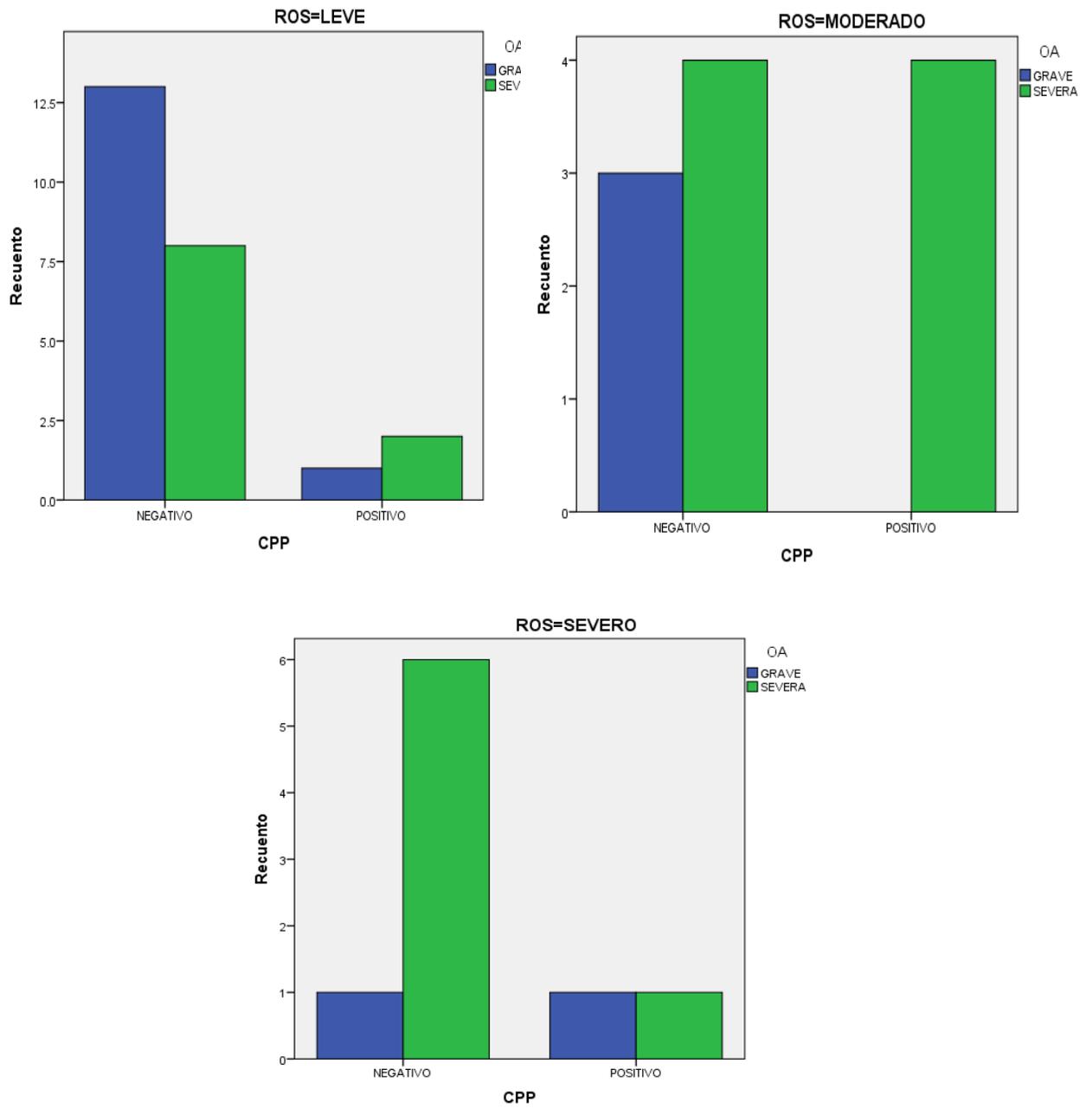
**Figura 9.** Cuantificación del % de células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el LS, comparación entre células de LS con CPP y sin cristales. Análisis de comparación de medias  $\pm$  desviación estándar, T-test (No paramétrico)  $p > 0.05$ .

En el análisis de los datos, la presencia de CPP no presentó diferencia significativa entre los grados de OA, al evaluar el riesgo de asociación de la presencia de CPP con el grado de la OA moderada (KL3) y severa (4KL) se obtuvo un OR 2.1 (IC 95% 0.61 – 7.77 )  $p= 0.26$ , sin encontrarse diferencia significativa, al realiza el análisis por valores bajos de ERO si presentó diferencia significativa respecto al grado de OA (grado moderado 58.3 %, grado severo 41.7% OR 1.8 (IC 95% 1.05 – 3.07) con  $p=0.03$  (Tabla 5) y figura 10.

**Tabla 5.** Riesgo por cristales de CPP, ERO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el grado de OA

	OA moderada (%)	OA severa (%)	OR (IC 95%)	<i>p</i> *
<b>CPP</b>				
Negativo	17 (48.6)	18 (51.4)	1.00 (referencia)	
Positivo	2 (22.2)	7 (77.8)	2.1 (0.61 – 7.77)	0.26
<b>ERO bajo</b>				
No	5 (25.0)	15 (75.0)	1.00 (referencia)	
Si	14 (58.3)	10 (41.7)	<b>1.80</b> (1.05 – 3.07)	<b>0.03</b>
<b>ERO medio</b>				
No	16 (48.5)	17 (51.5)	1.00 (referencia)	
Si	3 (27.3)	8 (72.7)	2.5 (0.56 – 11.1)	0.30
<b>ERO alto</b>				
No	17 (48.6)	18 (51.4)	1.00 (referencia)	
Si	2 (22.2)	7 (77.8)	3.3 (0.6 – 18.1)	0.26
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo</b>				
No	10 (45.5)	12 (54.5)	1.00 (referencia)	
Si	9 (40.9)	13 (59.1)	1.20 (0.36 – 3.9)	1.00
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medio</b>				
No	14 (45.2)	17 (54.8)	1.00 (referencia)	
Si	5 (38.5)	8 (61.5)	1.31 (0.35 – 4.94)	0.74
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alto</b>				
No	14 (40.0)	21 (60.0)	1.00 (referencia)	
Si	5 (55.6)	4 (44.4)	0.53 (0.12 – 2.33)	0.46

CPP, cristales de pirofosfato; ERO, especies reactivas de oxígeno; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza. \**p* = prueba exacta de Fisher. Valores en negritas denotan significancia estadística.



**Figura 10.** Niveles de ERO, en relación con la presencia o ausencia de CPP. Las ERO están clasificadas como leve (bajas), moderadas (medias) y altas o severo.

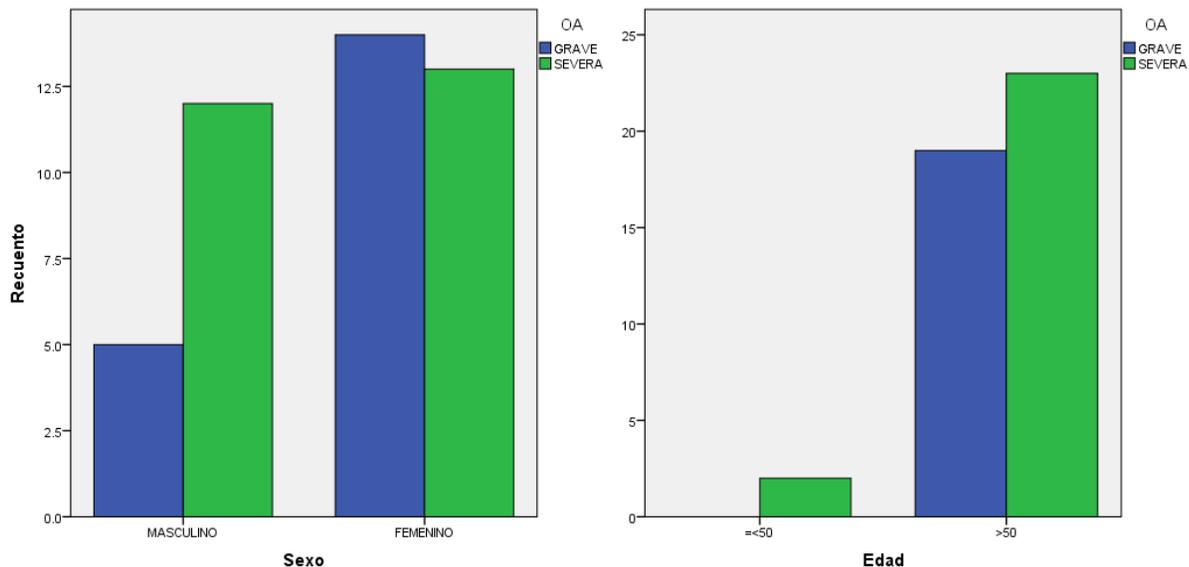
Cuando analizamos el efecto interactivo entre las variables clínicas de edad y género con la producción de ERO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podemos evidenciar que niveles medios o moderados de ERO se presentan en un 25.0% comparado con los niveles bajos y altos, 54,5% y 20.5 % respectivamente, se identificaron diferencias significativas entre los grupos obteniéndose un OR 5.26 (IC 95% 0.04 – 0.88) con una  $p= 0.03$ . En la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se identificaron diferencias significativas entre los niveles bajos, medios o moderados y altos (tabla 6), figura 10.

**Tabla 6.** Efectos interactivos entre variables clínicas y la producción de ERO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Edad x Género			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	N (%)	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Bajo	22 (50.0)	1.00 (referencia)	
Medio	13 (29.5)	1.03 (0.24 – 3.84)	0.96
Alto	9 (20.5)	6.6 (0.70 – 62.7)	0.09
<b>ERO</b>			
Bajo	24 (54.5)	1.00 (referencia)	
Medio	11 (25.0)	<b>5.26</b> (0.04 – 0.88)	<b>0.03</b>
Alto	9 (20.5)	2.39 (0.08 – 2.07)	0.28

OR, razón de momios; IC, intervalo de confianza. Valores en negritas denotan significancia estadística.

Encontramos que la interacción de la edad (> 50 años) con el género (femenino) afecta significativamente la producción de ERO únicamente a nivel medio o moderado (OR=5.26, IC95%=0.04 – 0.88,  $p=0.03$ ). Figura 11.



**Figura 11.** La presencia de ERO y su relación con el sexo y la edad. Clasificada por grados de OA (Grave KL=3) y severa (KL=4).

## 10.DISCUSIÓN

Nuestro estudio es el primero en evaluar a los CPP como inductores moleculares de regulación de la patogénesis de la OA y analizarlos como una posible causa de la severidad de esta patología.

Encontramos una baja prevalencia de CPP en los LS comparado con lo reportado en otros estudios, como en el de Frallonardo et al. 2016, ellos estudiaron 74 pacientes con OA, de los cuales en 23 pacientes encontraron de CPP (31.08%), comparado con nuestro estudio, en el que de 44 pacientes, únicamente en 9 se detectaron CPP. Asimismo, con base en el estudio de Ryu et al. 2014, ellos

manejaron una proporción de 304 pacientes, de los cuales 79 contenían CPP en sus LS (25.98%) y en 225 LS no se encontraron CPP (74.01%), en nuestro caso fue una proporción de 20.45%, creemos que esta prevalencia reportada puede deberse a nuestro tamaño de muestra reducido, debemos continuar muestreando a los pacientes e incrementar el tamaño de muestra, para conocer si las proporciones se mantienen o pueden verse modificadas.

Al realizar el análisis de las ERO, podemos identificar que tanto en el grado moderado y severo de la OA, independientemente de la presencia de CPP, se documenta la presencia de ERO a pesar de que la mayoría de los LS se encontraban con un estado inflamatorio bajo, estos niveles de inflamación son los esperados en la OA, ya que se ha considerado tradicionalmente como una artritis no inflamatoria; sin embargo, la dicotomía entre artritis inflamatoria y degenerativa se está volviendo menos clara con el reconocimiento de procesos inmunológicos dentro de la articulación [42]. Cada vez se reconoce más la presencia de sinovitis en una proporción significativa de pacientes con OA primaria; sin embargo, nuestro estudio únicamente contempló OA en grados moderados y severos, esta limitación pudiera ser la causal de los resultados que encontramos, vale la pena explorar los niveles de inflamación y de EO en LS de OA temprana como la nivel de KL1 o KL2.

Algunos estudios respaldan el posible papel de los CPP en la progresión de la OA y sugieren que promueven la inflamación a través de su interacción con varios componentes del sistema inmunitario innato. Recientemente se ha demostrado su papel para el reconocimiento de los CPP a través de los TLR y del NLRP3 en la mediación de las propiedades inflamatorias de los cristales. Los cristales de CPP fueron capaces de inducir la producción de óxido nítrico en los condrocitos de una manera dependiente de TLR2 [Liu-Bryan et al. 2005], no obstante, nuestro

estudio estuvo más centrado en evaluar *in vivo*, el efecto del CPP para la producción de ERO en la articulación y las variables biológicas que pueden estar interfiriendo en la medición de las mismas deben ser consideradas, tales como, el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la medición de las ERO, ya que se sabe las ERO tienen un tiempo de vida corto, sobre todo en solución [43], por lo tanto debemos considerar para futuros estudios valorar también el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el líquido sinovial, en el sobrenadante, y no sólo el contenido dentro de los leucocitos del LS y correlacionarlos con los niveles de expresión de citocinas proinflamatorias para tener otro panorama molecular de estos procesos.

Este estudio tenía como objetivo identificar las ERO producidas en la OA moderada y severa y valorar si existía una asociación ante la presencia de CPP en los LS, no obstante, la relación que pudimos identificar fue en la OA moderada, en la cual hubo una asociación con niveles bajos de ERO y altos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no están asociados a los CPP. Finalmente, nuestros hallazgos muestran que la edad y el género juegan un papel importante en la modulación de ERO y por ende en el grado de OA, es decir, que el tener más de 50 años y ser mujer, favorece la generación de ERO y el tener una OA moderada y severa.

Existen importantes limitaciones en nuestro estudio, como es que los datos fueron de un solo centro médico de referencia, la escasa cantidad de muestras con presencia de CPP, la cual pudiera influir en los resultados del estudio; otra limitación pudo ser que no se realizó un análisis respecto al peso e IMC (índice de masa corporal) para disminuir las posibles causas de sesgo. Tampoco se tomaron en cuenta LS procedentes de pacientes con OA en escalas de clasificación menores. Nuestras ventajas es que obtuvimos datos interesantes, novedosos con relación a la producción de ERO en esta patología, asimismo, la búsqueda e identificación de CPP en las muestras contribuye a fortalecer los

datos de prevalencia de CPP en México, aportamos datos para nuevos estudios, en los que se sugiere incrementar el número de muestras y la realización de análisis multivariados para disminuir los posibles sesgos y valorar otras posibles asociaciones.

## **11.CONCLUSIONES**

Los CPP fueron más frecuentes en la OA severa. Los LS con CPP contienen niveles bajos de inflamación y tienden a incrementar las ERO. En la OA moderada, hubo una asociación con niveles bajos de ERO y altos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero no están asociados a los CPP. La edad y el género juegan un papel importante en la modulación de ERO y por ende en el grado de OA.

## 12.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ntoumou E, Tzetis M, Braoudaki M, Lambrou G, Poulou M, Malizos K, Stefanou N, Anastasopoulou L, Tsezou A. Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. *Clin Epigenetics*. 2017; 9:127.
2. Beyer C, Zampetaki A, Lin NY, Kleyer A, Perricone C, Iagnocco A, Distler A, Langley SR, Gelse K, Sesselmann S, Lorenzini R, Niemeier A, Swoboda B, Distler JH, Santer P, Egger G, Willeit J, Mayr M, Schett G, Kiechl S. Signature of circulating microRNAs in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015; 74(3): e18.
3. Rosenthal AK. Crystals, inflammation, and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23: 170–173.
4. Liu YZ, Jackson AP, Cosgrove SD. Contribution of calcium containing crystals to cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009; 17:1333-40.
5. Abhishek A, Doherty M. Update on calcium pyrophosphate deposition. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34 (4 Suppl 98):32-8.
6. Frallonardo P, Oliviero F, Peruzzo L, Leonardo T, Scanu A, Galozzi P, Roberta R, Punzi L. Detection of calcium crystals in knee osteoarthritis synovial fluid a comparison between polarized light and scanning electron microscopy. *J Clin Rheumatol*. 2016; 22:369-71.
7. Chang CC, Tsai YH, Liu Y, Lin SY, Liang YC. Calcium-containing crystals enhance receptor activator of nuclear factor Kb ligand/macrophage colony stimulating factor mediated osteoclastogenesis via extracellular-signal-regulated kinase and p38 pathways. *Rheumatology (Oxford)*. 2015; 54(10):1913-22.

8. Corr EM, Cunningham CC, Helbert L, McCarthy GM, Dunne A. Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals activate membrane proximal kinases in human innate immune cells. *Arthritis Res Ther*. 2017; 19:23.
9. Cunningham CC, Corr EM, McCarthy GM, Dunne A. Intra-articular basic calcium phosphate and monosodium urate crystals inhibit anti-osteoclastogenic cytokine signaling. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016; 24:2141-52.
10. Rosales-Alexander JL, Balsalobre Aznar J, Magro-Checa C. Calcium pyrophosphate crystal deposition disease: diagnosis and treatment. *Open Access Rheumatol*. 2014; 6: 39–47.
11. Zhang W, Doherty M, Pascual E, Barskova V, Guerne PA, Jansen TL, Leeb BF, Perez-Ruiz F, Pimentao J, Punzi L, Richette P, Sivera F, Uhlig T, Watt I, Bardin T. EULAR recommendations for calcium pyrophosphate deposition. Part II: Management. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70:571–75.
12. Zamudio-Cuevas YE, Martínez-Flores K, Fernández-Torres J, Loissell-Baltazar YA, Medina-Luna D, López Macay A, Camacho-Galindo J, Hernández-Díaz C, Santamaría-Olmedo MG, López-Villegas EO, Oliviero F, Scanu A, Cerna-Cortés JF, Gutiérrez M, Pineda C, López-Reyes A. Monosodium urate crystals induce oxidative stress in human synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2016, 21;18(1):117.
13. Chang CC, Tsai YH, Liu Y, Lin SY, Liang YC. Calcium containing crystals enhance receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand/macrophage colony-stimulating factor-mediated osteoclastogenesis via extracellular-signal-regulated kinase and p38 pathways. *Rheumatology* (Oxford). 2015; 54(10):1913-22;
14. Maravic M, Ea HK. Hospital burden of gout, pseudogout and other crystal arthropathies in France. *Joint Bone Spine*. 2015; 82 (5): 326-9. Doi: 10.1016/j.jbspin.2015.01.011

15. Rosenthal AK. Crystals, inflammation, and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23(2): 170–173. doi:10.1097/BOR.0b013e3283432d1f
16. Filippou Definition and Reliability Assessment of Elementary Ultrasonographic Findings in Calcium Pyrophosphate Deposition Disease: A Study by the OMERACT Calcium Pyrophosphate Deposition Disease Ultrasound Subtask Force. *J Rheumatol*. 2017 pii: jrheum.161057. doi: 10.3899/jrheum.161057
17. Seven A, Güzel S, Aslan M, Hamuryudan V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem*, 2008;41(7-8):538-543.
18. Feijóo M, Túnez I, Ruiz A, Tasset I, Muñoz E, Collantes E. Biomarcadores de estrés oxidativo como indicadores de actividad en la enfermedad articular inflamatoria crónica [Oxidative stress biomarkers as indicator of chronic inflammatory joint diseases stage]. *Reumatol Clin*, 2010;6(2):91-94.
19. García-González A, Gaxiola-Robles R, Zenteno-Savín T. Oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Rev Invest Clin*, 2015;67(1):46-53.
20. Khojah HM, Ahmed S, Abdel-Rahman MS, Hamza AB. Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 2016;97:285-291.
21. Quiñonez-Flores CM, González-Chávez SA, Del Río Nájera D, Pacheco-Tena C. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Biomed Res Int*, 2016:6097417.
22. Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med*, 2018; 125:3-14.
23. Bala A, Mondal C, Haldar PK, Khandelwal B. Oxidative stress in inflammatory cells of patient with rheumatoid arthritis: clinical efficacy of dietary antioxidants. *Inflammopharmacology*, 2017; 25(6):595-607.

24. Meng J, Yu P, Jiang H, Yuan T, Liu N, Tong J, Chen H, Bao N, Zhao J. Molecular hydrogen decelerates rheumatoid arthritis progression through inhibition of oxidative stress. *Am J Transl Res*, 2016;8(10):4472-4477.
25. Phull AR, Nasir B, Haq IU, Kim SJ. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chem Biol Interact*, 2018;281:121-136.
26. Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PloS ONE*, 2016, 11(4): e0152925.
27. Mateen S, Moin S, Zafar A, Khan AQ. Redox signaling in rheumatoid arthritis and the preventive role of polyphenols. *Clin Chim Acta*, 2016;463:4-10.
28. Balogh E, Veale DJ, McGarry T, et al. Oxidative stress impairs energy metabolism in primary cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2018;20(1):95.
29. Mititelu RR, Pădureanu R, Băcănoiu M, et al. Inflammatory and Oxidative Stress Markers-Mirror Tools in Rheumatoid Arthritis. *Biomedicines*, 2020;8(5):125.
30. Novikova A.M. Calcium pyrophosphate crystal deposition disease as a risk factor for cardiovascular diseases. *Rheumatology Science and Practice*, 2020;58(1):80-86.
31. Oliviero F, Zamudio-Cuevas Y, Belluzzi E, Andretto L, Scanu A, Favero M, Punzi L. Polydatin and Resveratrol Inhibit the Inflammatory Process Induced by Urate and Pyrophosphate Crystals in THP-1 Cells. *Foods*, 2019, 8(11), 560.
32. Oliviero F, Galozzi P, Scanu A, Galuppini F, Lazzarin V, Brocco S, Ravagnan G, Sfriso P, Ramonda R, Spinella P, Punzi L, Pennelli G, Luisetto R. Polydatin Prevents Calcium Pyrophosphate Crystal-Induced Arthritis in Mice. *Nutrients*. 2021 Mar 13;13(3):929.
33. Chang CC, Tsai YH, Liu Y, Lin SY, Liang YC. Calcium containing crystals enhance receptor activator of nuclear factor K $\beta$  ligand/macrophage colony-

stimulating factor-mediated osteoclastogenesis via extracellular-signal-regulated kinase and p38 pathways. *Rheumatology* (Oxford). 2015; 54(10):1913-22.

34. Maravic M, Ea HK. Hospital burden of gout, pseudogout and other crystal arthropathies in France. *Joint Bone Spine*. 2015; 82 (5): 326-9.
35. Rosenthal AK. Crystals, inflammation, and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 2011; 23(2): 170–173.
36. Filippou G, Scirè CA, Damjanov N, Adinolfi A, Carrara G, Picerno V, Toscano C, Bruyn GA, D'Agostino MA, Delle Sedie A, Filippucci E, Gutierrez M, Micu M, Möller I, Naredo E, Pineda C, Porta F, Schmidt WA, Terslev L, Vlad V, Zufferey P, Iagnocco A. Definition and Reliability Assessment of Elementary Ultrasonographic Findings in Calcium Pyrophosphate Deposition Disease: A Study by the OMERACT Calcium Pyrophosphate Deposition Disease Ultrasound Subtask Force. *J Rheumatol*, 2017 pii: jrheum.161057.
37. Figueroa, R. M., Figueroa, C. M., Rodriguez, R. C., & Poblete, D. F. Osteoarthritis (artrosis) de rodilla. *Revista Chilena de Ortopedia y Traumatología*, 2015 56(3), 45-51.
38. Ryu K, Iriuchishima T, Oshida M, Kato Y, Saito A, Imada M, Aizawa S, Tokuhashi Y, Ryu J. The prevalence of and factors related to calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition in the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014 Jul;22(7):975-9.
39. Hawker GA, Stewart L, French MR, et al. Understanding the pain experience in hip and knee osteoarthritis—an OARSI/OMERACT initiative. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16:415.
40. Wood LR, Peat G, Thomas E, Duncan R. Knee osteoarthritis in community-dwelling older adults: are there characteristic patterns of pain location? *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15:615.

41. Zhang W, Doherty M, Peat G, et al. EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:483.
42. Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013 Apr;5(2):77-94. doi: 10.1177/1759720X12467868
- Katerina Krumova and Gonzalo Cosa, Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species , in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1*, 2016, pp. 1-21 DOI: 10.1039/9781782622208-00001 eISBN: 978-1-78262-220-8)

## ANEXOS.

**ANEXO 1.** instrumentos de recolección de la información e instructivos para recolectar información.

Ciudad de México, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20\_\_

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de la Investigación: **Estrés oxidante inducido por cristales de pirofosfato de calcio y su impacto en la severidad de la osteoartritis de rodilla**

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

Nombre \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ participante:

Teléfono de contacto: \_\_\_\_\_

A través de este documento que forma parte del proceso para la obtención del consentimiento informado, me gustaría invitarlo a participar en la investigación titulada: **Estrés oxidante inducido por cristales de pirofosfato de calcio y su impacto en la severidad de la osteoartritis de rodilla.** Antes de decidir, necesita entender por qué se está realizando esta investigación y en qué consistirá su participación. Por favor tómese el tiempo que usted necesite para leer la siguiente información cuidadosamente y pregunte cualquier cosa que no comprenda. Si usted lo desea puede consultar con personas de su confianza (Familiar y/o Médico tratante) sobre la presente investigación.

#### 1. ¿Dónde se llevará a cabo esta investigación?

Esta investigación se llevará a cabo en varios servicios de las instalaciones del Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra, específicamente en el de Reconstrucción Articular de Cadera y Rodilla; ubicado en el segundo piso de la Torre de Ortopedia y el Laboratorio de Líquido Sinovial ubicado en el cuarto piso de la Torre de Investigación.

#### 2. ¿Cuál es el objetivo de esta investigación?

Identificar si los cristales de calcio tienen un efecto en la generación de estrés en la articulación que impacte en severidad de la osteoartritis de rodilla.

#### 3. ¿Por qué es importante esta investigación?

La osteoartritis (OA) es una enfermedad crónica degenerativa muy común y es ocasionada por la pérdida del cartílago de su articulación, tiene muchas causas, como la herencia, la obesidad, traumatismos ó lesiones previas y ambientales como por ejemplo la presencia de cristales de calcio, los cuales podrían ocasionar una inflamación y estrés en la articulación. Por lo tanto, queremos investigar si los cristales generan un estrés que influye en la gravedad de la enfermedad.

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

Ha sido invitado a formar parte de esta investigación, porque durante el procedimiento al que va a ser sometido, el doctor retirará el líquido de su rodilla (como parte del procedimiento habitual quirúrgico), el cual es muy valioso para nosotros porque sirve para estudiar las células que lo conforman, el cual vamos a estudiar para ver si contiene cristales de calcio y si éstos generan estrés en su articulación, además de cumplir con las características enlistadas a continuación (criterios de inclusión):

- Hombres y mujeres de 45 a 75 años años, sometidos a cirugía de reemplazo total de rodilla,
- No presenta en sus análisis ácido úrico elevado
- No tiene gota
- No tiene enfermedades como la artritis reumatoide, en la que hay una inflamación en su articulación porque el cuerpo reconoce como extraña a sus propias células.

#### **5. ¿Estoy obligado a participar?**

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

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

Su participación consistirá en autorizar a personal médico del Servicio de Reemplazo Articular de Cadera y Rodilla el uso del líquido que recubre su articulación, el cual es obtenido durante el procedimiento quirúrgico por los médicos como parte de su rutina, esta acción no le producirá ningún daño extra a la articulación, ya que se trata de un líquido que será removido para la correcta visualización de la articulación por el médico. Este es normalmente desechado en el procedimiento, en este caso si Usted esta de acuerdo se recuperaría por parte de su médico, ya que se donaría al personal de investigación para desarrollar el estudio de la búsqueda de cristales y asociarlos al estrés y la severidad de la enfermedad. Si está de acuerdo en participar, le solicitaremos que escriba su nombre y firme el formato de Consentimiento Informado, del cual le entregaremos una copia para que tenga los datos de ubicación del investigador responsable.

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

Esta investigación no está diseñada para beneficiarle directamente o de forma económica; sin embargo, el líquido que nos done será empleado para generar evidencia científica que sustente si el cristal de calcio puede influir en el estrés oxidante de las articulaciones.

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

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

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

De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, esta investigación contempla un riesgo mayor al mínimo, pero este es generado por el procedimiento en sí de la operación, ya que puede tener complicaciones durante el desarrollo de la cirugía, puede tener inflamación de su rodilla, dolor o una infección.

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

Por participar en la investigación no tendrá molestias, sin embargo; puede referir un dolor en la rodilla donde se llevó a cabo el procedimiento de su cirugía de la rodilla, puede tener dificultad para caminar los primeros días posteriores a la operación, o entumecimiento, pero eso es ocasionado por su operación, no por haber donado su líquido, puede tener molestias, dolor o infección por la cirugía a la fue sometido no por la extracción del líquido de su rodilla.

**11. ¿Recibiré alguna compensación por mi participación?**

Ninguna compensación económica; sin embargo, si Usted está de acuerdo puede conocer los resultados del análisis de su líquido de la rodilla, en el que reportaremos si se observaron cristales de calcio o algún otro cristal, si se encontraba inflamado, etc.

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

Ninguno. Los gastos relacionados con esta investigación que se originen a partir del momento en que voluntariamente acepta participar en la misma, no serán pagados por Usted. En el caso de que existan gastos adicionales originados por el desarrollo de esta investigación, serán cubiertos por el investigador responsable. Es importante comentarle que los gastos y/o cuotas que se generen como paciente del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, que no tengan ninguna relación con la presente Investigación, deberán ser pagados por Usted.

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

Se le informa que Usted tiene el derecho, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación de dejar de participar en la presente investigación, sin que esto disminuya la atención y calidad o se generen prejuicios para continuar con sus tratamientos y la atención

que como paciente le otorga el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra. Únicamente avisando a alguno de los investigadores su decisión y su muestra donada del líquido será desechada como residuo biológico.

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

El participante podrá ser suspendido de la investigación si presenta otro padecimiento músculo esquelético además de la lesión por la que fue sometido a cirugía. También si las muestras biológicas no resultan adecuadas para los estudios se suspende su utilización.

#### **15. ¿Qué sucede cuando la Investigación termina?**

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

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

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

#### **Aclaraciones:**

- a) Esta investigación ha sido revisada y aprobada por el Comité de Investigación y Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, que son independientes al grupo de investigadores, para proteger sus intereses.
- b) Su decisión de participar en la presente Investigación es **completamente voluntaria**.
- c) En el transcurso de la Investigación, usted podrá solicitar información actualizada sobre la misma, al investigador responsable.
- d) La información obtenida en esta investigación, utilizada para la identificación de cada participante será mantenida con estricta confidencialidad por **el investigador responsable del proyecto**, conforme la normatividad vigente.
- e) Se le garantiza que usted recibirá respuesta a cualquier pregunta, duda o aclaración acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios u otros asuntos relacionados con la presente investigación.
- f) Se hace de su conocimiento que existe la disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendría derecho por parte del Instituto Nacional de

Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, solamente en el caso de sufrir daños directamente causados por la Investigación.

- g) En caso de que sea Usted padre/tutor, o representante legal de un menor de edad o de una persona incapaz de tomar la decisión o firmar este documento, sírvase firmar la presente Carta de Consentimiento Informado dando su autorización. **N/A**
- h) En el caso de que el participante en la investigación se trate de un menor a partir de los 6 años, por favor de lectura al Asentimiento Informado anexo a este documento, para que el menor lo comprenda y autorice. **N/A**
- i) Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado.
- j) Se le comunica que esta Carta de Consentimiento Informado se elabora y firma en dos ejemplares originales, se le entregará un original y el otro lo conservará el investigador principal.

### FIRMA DE CONSENTIMIENTO

Yo, \_\_\_\_\_, manifiesto que fui informado (a) del propósito, procedimientos y tiempo de participación y en pleno uso de mis facultades, es mi voluntad participar en esta investigación titulada **Estrés oxidante inducido por cristales de pirofosfato de calcio y su impacto en la severidad de la osteoartritis de rodilla.**

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

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

\_\_\_\_\_  
**NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANT**  
PADRE/TUTOR O REPRESENTANTE LE  
(según aplique, se requiere  
identificación)

\_\_\_\_\_  
**NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGAD**  
**PRINCIPAL**

### TESTIGOS

\_\_\_\_\_  
**NOMBRE Y FIRMA**  
PARENTESCO  
DOMICILIO

\_\_\_\_\_  
**NOMBRE Y FIRMA**  
PARENTESCO  
DOMICILIO

**Nota:** Los datos personales contenidos en la presente Carta de Consentimiento Informado, serán protegidos conforme a lo dispuesto en las Leyes Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública, General de Transparencia y Acceso a la Información Pública y General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados.

**ANEXO 2.** Instrumentos de recolección de la información e instructivos para recolectar información.

Ciudad de México a \_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_  
Folio: \_\_\_\_\_ (Este debe ser asignado por el Investigador responsable).

**Solicitud de Análisis de Líquido Sinovial**  
(Debe ser llenada por los médicos que realizan la artrocentesis)

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

Número de Expediente: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_

Género: \_\_\_\_\_

**Muestra de Líquido Sinovial**

Volumen extraído: \_\_\_\_\_

Articulación estudiada: \_\_\_\_\_ Izquierda \_\_\_\_\_ Derecha \_\_\_\_\_

Depósito radiológico de cristales: Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Sospecha de cristales por Ultrasonido Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Infiltración previa \_\_\_\_\_ Medicamento utilizado: \_\_\_\_\_

Viscosuplementación \_\_\_\_\_ Medicamento utilizado: \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

	NO	SI	Medicamento	Dosis	Vía	Frecuencia de administración
Anestésicos						
Analgésicos						
Sedantes						
Antibióticos						
Otros.						

Médico responsable  
Nombre completo y firma

\_\_\_\_\_

