

---

**Perfil de biomarcadores  
en suero y membrana sinovial  
en la lesión del ligamento  
cruzado anterior**

---

**Guisasola Zulueta M.C.  
Mediavilla Santos L. | Chana Rodriguez F.  
Vaquero Martín J .**

**Ayudas a la investigación 2011**

## **Equipo de trabajo:**

### **Guisasola Zulueta MC**

Laboratorio de Biología de la Inflamación.  
Unidad de Medicina y Cirugía Experimental.  
Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón  
Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid

### **Mediavilla Santos L**

Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología.  
Hospital General Universitario "Gregorio Marañón".

### **Chana Rodriguez F**

Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología.  
Hospital General Universitario "Gregorio Marañón".

### **Vaquero Martín J**

Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.  
Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología.  
Hospital General Universitario "Gregorio Marañón".

# Índice

	Página
RESUMEN/SUMMARY	
1. INTRODUCCIÓN	5
2. MATERIAL Y MÉTODOS	6
2.1. Recogida de las muestras	6
2.2. Cuantificación de biomarcadores	6
2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Cuantitativa (q-RT-PCR)	6
2.4. Análisis estadístico	7
3. RESULTADOS	7
3.1. Características de la población estudiada	7
3.2. Clasificación de la superficie articular y tiempo de evolución de las lesiones	7
3.3. Proteína C Reactiva (PCR)	7
3.4. Citoquinas, quimocinas y factores de crecimiento	7
3.5. MMP3 y TIMP1	8
3.6. HSPA1A	10
3.7. Expresión génica en muestras de membrana sinovial	10
4. DISCUSIÓN	11
5. CONCLUSIONES	13
6. AGRADECIMIENTOS	13
7. BIBLIOGRAFÍA	13

## RESUMEN

**Objetivo:** Cuantificar niveles séricos de biomarcadores inflamatorios, citoprotectores y tejidos-específicos y su expresión génica en membrana sinovial en pacientes con rotura del LCA con el fin de identificar factores pronósticos de riesgo de evolución a osteoartritis (OA).

**Material:** se reclutaron 26 pacientes de forma consecutiva que precisaban reconstrucción del LCA, y estaban en fase crónica (> 3 meses desde la lesión) y estable.

**Métodos:** Se cuantificó la concentración sérica de las citoquinas IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , las quimocinas CXCL8, CXCL10 y CCL5, los factores de crecimiento G-CSF, GM-CSF; MMP3, TIMP1, y HSPA1A por ELISA. Se analizó su expresión génica en muestras de membrana sinovial por PCR a tiempo real cuantitativa.

**Resultados:** durante la artroscopia, se detectaron lesiones meniscales asociadas en 12 pacientes (grupo control positivo) y 14 fueron casos con rotura aislada del LCA (grupo problema). Los pacientes con doble lesión ligamentaria y meniscal presentaron valores significativamente superiores de IL-6 y TNF- $\alpha$  que no se acompañaron de diferencias en la cuantificación relativa de los mRNAs. Igualmente se objetivó disminución significativa de concentración sérica de TIMP-1 y HSPA1A, así como de su expresión génica, con respecto a la rotura aislada de LCA.

**Conclusión:** Dado el carácter antiinflamatorio y citoprotector de TIMP-1 y HSPA1A, los pacientes con doble lesión de LCA y menisco presentarían un ambiente más proinflamatorio en las rodillas que favorecería el desarrollo de OA con el tiempo. Se propone la consideración de la cuantificación sérica de TIMP-1 y de HSPA1A como biomarcadores de riesgo evolutivo hacia OA.

**Palabras clave:** LCA, osteoartritis, citoquinas, quimocinas, proteínas de choque térmico, biomarcadores.

## SUMMARY

**Objective:** To quantify the levels of serum concentrations of inflammatory, cytoprotective and tissue-specific biomarkers and their gene expression in synovial membrane samples of patients with anterior cruciate ligament (ACL) injury with the aim to identify prognostic risk factors of evolution to osteoarthritis (OA).

**Material:** 26 patients undergoing a reconstruction of ACL, in a chronic and stable phase have been recruited.

**Methods:** Serum concentrations of cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , chemokines CXCL8, IP-10 CXCL10 and CCL5; growth factors G-CSF, GM-CSF; MMP3, TIMP1, and HSPA1A have been quantified by ELISA. Their gene expression in synovial membrane samples have been analyzed by Quantitative Real-Time PCR.

**Results:** During the arthroscopy, meniscal tears concomitant have been observed in 12 patients (positive control group) and in 14 cases isolated ACL injury (problem group) was discovered. Patients with double lesion of ligament and meniscus, have shown significantly higher serum concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$ , but the relative quantification of their mRNAs have not presented relevant differences. Likewise, a significant decrease in serum levels and gene expression of TIMP-1 and HSPA1A has been observed in comparison with patients with isolated tear of ACL.

**Conclusions:** Given the anti-inflammatory and cytoprotective properties of TIMP-1 and HSPA1A, patients with double lesion of ACL and meniscus could present a more pro-inflammatory environment in their knees which leads to the development of OA in the future. Consideration of serum quantification of TIMP1 and HSPA1A as evolutive biomarkers straight on OA is proposed.

## 1. INTRODUCCION

El ligamento cruzado anterior (LCA) de la rodilla es una de las estructuras articulares que con más frecuencia se lesiona y representa la cuarta parte de todas las lesiones de la rodilla. Su incidencia anual verificada por Resonancia Magnética (RM), es de 0,81/1000 habitantes de 10 a 64 años, lo que se traduce en más de 246.000 traumatismos del LCA y más de 175.000 reconstrucciones anuales en los Estados Unidos [1, 2]. En España, un estudio de 2001 estimó en 16.821 el número de plastias de LCA anuales, lo que representaría una prevalencia de 4 casos por cada 1000 habitantes al año, si todas las roturas se hubieran operado. Una de cada 5 artroscopias de rodilla realizadas en nuestro país tendría como objetivo la reconstrucción de un LCA roto [3].

La lesión aguda del LCA ha demostrado ser un factor de riesgo mayor para el desarrollo de osteoartritis (OA), con una probabilidad de desarrollar una OA sintomática entre los 10 y los 20 años posteriores a su reparación post-lesional del 50% [4]. La lesión de la rodilla es la causa más importante de OA en gente joven, teniendo las mujeres jóvenes entre 3 y 5 veces mayor riesgo de padecer una rotura del LCA que los varones [5]. Un estudio prospectivo entre adultos jóvenes puso de manifiesto que la incidencia acumulativa de OA de rodilla sintomática era del 14% a los 65 años entre los que tuvieron una lesión de rodilla durante su adolescencia o primera juventud, frente al 6% de incidencia entre los que no tenían antecedentes de daño en la articulación [6]. Se calcula que la OA post-traumática afecta a 5,6 millones de sujetos al año y constituye el 12% del total de las OA sintomáticas en Estados Unidos, lo que supuso en 2006 un coste estimado de 3,06 billones de dólares, esto es el 0,15% del gasto total sanitario directo. Además, los pacientes con afectación ligamentosa de la rodilla y OA post-traumática son, en promedio, de 15 a 20 años más jóvenes que los pacientes con OA primaria, cuando ambos se hacen sintomáticos [7].

La recuperación de la estabilidad de la articulación de la rodilla mediante la reconstrucción del LCA no reduce la incidencia de OA post-traumática. Estudios epidemiológicos indican que el 50-60% de pacientes con rodillas reconstruidas por daño del LCA tienen signos radiográficos de OA después de cinco años. (8). Ello sugiere que las alteraciones biomecánicas no son los únicos factores determinantes de OA. Otros factores diferentes, o añadidos a las alteraciones biomecánicas, serían los responsables de los cambios osteoartroticos que se producen tras la rotura del LCA, y esos factores deben ser de naturaleza biológica. Se ha observado que en las primeras 24 horas tras la rotura del LCA, se produce un rápido incremento de los niveles de citoquinas intraarticulares, especialmente IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), IP-10 y el Factor Estimulante de Colonias Granulocito-Macrocito (GM-CSF), niveles que se mantienen ele-

vados durante la primera semana para disminuir posteriormente [9,10]. Las citoquinas aumentan el catabolismo de los condrocitos lo que conlleva el desarrollo de lesiones condrales, y promueven la inflamación sinovial. Estas citoquinas provocan la degradación del cartílago induciendo la síntesis y liberación de proteasas degradantes de la matriz, tales como las metaloproteasas de la matriz (MMPs) [11]. Se han demostrado citoquinas proinflamatorias, quimocinas y MMPs en el líquido y el tejido sinovial de pacientes tanto con OA primaria como en sujetos con rotura de LCA, especialmente las MMP-1 y MMP-3, así como el inhibidor tisular de metaloproteasa, TIMP-1, lo que ha llevado a algunos autores a sugerir que tanto las citoquinas como las MMPs serían las responsables de la destrucción del cartílago a largo plazo [12].

Pero la OA no es simplemente una enfermedad del cartílago articular, sino de toda la articulación incluyendo cartílago, hueso, sinovial y meniscos. Los sujetos con roturas de menisco no sometidos a intervención quirúrgica, desarrollan OA radiológica en un porcentaje significativamente superior que aquellos que no tienen lesiones meniscales, lo que sugiere que la rotura de menisco es, por si misma, un potente factor de riesgo para el desarrollo de OA radiológica [13]. Además de los factores propiamente mecánicos, se han involucrado también a factores biológicos; si bien se conoce poco de los mecanismos metabólicos por los cuales la rotura de menisco conduce a OA de rodilla, se ha demostrado que se produce una variación en la expresión génica de sus células, con incremento de expresión de las citoquinas proinflamatorias y la metaloproteasa MMP-13 [14], incremento que se potencia cuando existe rotura de LCA concomitante [15].

Las denominadas proteínas de choque térmico (Heat-shock proteins, Hsps) o proteínas de estrés constituyen una parte esencial de la respuesta celular a la agresión. Ante la acción de diferentes estímulos tales como la inflamación, los traumatismos, infecciones, estrés oxidativo, isquemia-reperusión...etc, las células regulan al alza la expresión de los genes *hsps* para incrementar la síntesis de estas proteínas de incuestionable papel citoprotector [16]. Dentro de la superfamilia de las Hsps, la Hsp70, actualmente denominada HSPA1A [17], es la más ampliamente estudiada. Posee actividades antiinflamatorias y antiapoptóticas [18] y está implicada en enfermedades como la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la esquizofrenia, o el cáncer.

Planteamos la hipótesis de que los pacientes con rotura del LCA que presenten niveles elevados de interleuquinas y quimocinas proinflamatorias y metaloproteasas, y concentraciones bajas de la proteína citoprotectora HSPA1A, estarán más predispuestos a desarrollar una osteoartrosis de rodilla, y que dichos mediadores estarán aún más incrementados y la HSPA1A más disminuida, si existe lesión meniscal asociada. En el presente trabajo se han

analizado los niveles séricos de biomarcadores inflamatorios, citoprotectores y tejido-específicos y su expresión génica en la membrana sinovial de la rodilla de pacientes con rotura aislada de LCA sometidos a reconstrucción por artroscopia, y en pacientes con rotura de LCA y lesión meniscal concomitante.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se reclutaron 26 pacientes de forma consecutiva que se encontraban en lista de espera para la reconstrucción del LCA, con edades entre 18 y 53 años (media  $30.35 \pm 9.61$ ). Los criterios de inclusión fueron: pacientes cuyas rodillas tuvieran una movilidad completa y clínicamente se encontraran en la fase crónica (> 3 meses) y estable de la recuperación tras la rotura del LCA. Todos ellos se sometieron a un examen ortopédico específico para excluir una potencial osteoartritis en otras articulaciones fuera de la rodilla y a una encuesta para establecer la fecha de la lesión y la de la aparición de los síntomas. Los criterios de exclusión comprendieron pacientes con fracturas, enfermedades óseas metabólicas, artritis reumatoide y otras artritis inflamatorias, disfunción renal, historia de tratamientos osteoanabólicos, tratamientos intraarticulares o cirugías en los tres meses previos a la intervención. En todos los casos la anestesia fue regional. Como controles negativos se incluyeron 5 voluntarios sanos, de 20 a 38 años, sin historia previa de traumatismos o lesiones articulares.

Todos los participantes firmaron el consentimiento informado y los protocolos fueron aprobados por la Comisión de Investigación y la Comisión de Ética de la Investigación Clínica de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón.

### 2.1. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Se extrajeron 10 ml de sangre por venopunción en tubo seco antes de la anestesia y en brazo contralateral al portador de una vía de acceso intravenoso; tras su centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min, se tomó el suero que se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Durante la cirugía artroscópica se tomaron varios fragmentos de membrana sinovial del fondo de saco de la rodilla con una pinza de biopsia. Inmediatamente tras la extracción, las biopsias se introdujeron en un tubo seco en condiciones de esterilidad que se sumergió inmediatamente en Nitrógeno líquido para su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se pesaron las muestras (no superiores a 0.5 cm de tamaño) y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### 2.2. CUANTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES

Se cuantificaron simultáneamente las siguientes citoquinas, quimocinas y factores de crecimiento: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-8 (CXCL8), IP-10 (*interferón inducible protein-10*, también identificada como CXCL10) y RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*, o CCL5), mediante el *Human Inflammation ELISA Strip for Profiling 8 Cytokines*, de VITRO, siguiendo las indicaciones del fabricante. En paralelo, se montó una segunda placa con concentraciones progresivas de cada una de las 8 citoquinas elaboradas a partir de estándares purificados (*Protein Standards for Human Inflammation ELISA Strip*, catalog EA-1032). Tras desarrollar el ensayo, se obtuvo una curva patrón de cada citoquina. La absorbancia de cada muestra y de cada citoquina se interpoló en la correspondiente curva patrón para obtener la concentración exacta de cada citoquina de cada muestra.

Las cuantificaciones de la concentración sérica de IL-6, MMP3 y TIMP-1 y Proteína C Reactiva, se realizaron utilizando kits de ELISA comercial (BioNova Científica, s.l., Madrid, España).

Se cuantificó HSPA1A en muestras de suero diluidas 1:5 mediante el kit de ELISA EKS-715 (Assay-Designs-Stressgen, Ann Arbor, Michigan, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit reconoce la HSPA1A nativa y recombinante, pero no tiene reactividad cruzada con HSPA8 (Hsp70 constitutiva) o HSPD1 (Hsp60). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayos fueron < 10%. La linealidad fue de 0.34-6.25 ng/mL y la sensibilidad de 0.30ng/mL.

### 2.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL CUANTITATIVA (Q-RT-PCR)

Previo a la extracción de RNA de las muestras de membrana sinovial, se enfrió una alícuota de RNAlater-ICE (Ambion, Life Technologies) a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente incubarla con la muestra en una proporción de 10 volúmenes de RNAlater-ICE en relación al peso de la muestra, durante al menos 16 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El RNA total se extrajo de las muestras de cápsula sinovial de al menos 30 mg de tamaño, mediante el *RNeasy Fibrous Tissue Mini kit* (Qiagen) tratado con DNasa-I. Se cuantificó en un espectrofotómetro NanoPhotometer (Implen, Munchen, Germany) y guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . 1  $\mu\text{g}$  de RNA total se retrotranscribió a DNA complementario (cDNA) mediante el *Quantitect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) en una reacción de 20  $\mu\text{L}$  a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 15 min, utilizando cebadores aleatorios y Quantiscript reverso-trascriptasa.

Para determinar los niveles de expresión de los mRNA en las muestras de membrana sinovial, se diseñaron dos placas con los *primers* para IL-1 $\alpha$ , IL-6, , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , HSPA1A; MMP3, TIMP-1, CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF) y CSF3 (G-CSF) (Roche Applied Science). Los genes de referencia fueron Ciclofi-

lina (PPIA) y el RNA ribosomal 18S. La mezcla de la reacción para la PCR en tiempo real se realizó utilizando el *LightCycler 480 Probes Master kit* (Roche Applied Science), y las condiciones fueron las siguientes: activación a 95°C durante 10 minutos, desnaturalización a 95°C 15 segundos, amplificación a 60°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 30 segundos durante 40 ciclos, con una extensión final a 72°C durante 10 min.

Al valor de  $C_T$  de cada marcador, se restó el valor del  $C_T$  de Ciclofilina para obtener el valor de  $\Delta C_T$ . La expresión normalizada de cada gen se calculó como  $2^{-\Delta C_T}$  [19].

### 2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para examinar la distribución de los datos, se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov. Los grupos de pacientes se compararon mediante test no paramétricos: U Mann Whitney para dos muestras independientes y el test de Kruskal-Wallis para tres muestras independientes. El análisis de la correlación de la concentración de las citoquinas entre sí o con otras variables cuantitativas se realizó mediante el test de correlación de Spearman's. Todos los valores de probabilidad se derivaron de análisis bilaterales y un valor de p inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo, mientras valores de p entre 0.05 y 0.1, se consideraron indicativos de tendencia.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 18.0 para Windows. software (SPSS Inc, Chicago).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

De los 31 sujetos incluidos en el estudio, 26 fueron varones con una edad media de  $29,15 \pm 8,70$  años y 5 mujeres con una edad media de  $31,8 \pm 13,21$  años.

Tras la exploración de la articulación durante la artroscopia, se detectaron lesiones meniscales asociadas en 12 pacientes que pasaron a integrar el denominado grupo control positivo, 14 fueron casos con rotura aislada del LCA y constituyó el grupo problema.

### 3.2. CLASIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE ARTICULAR DEL COMPARTIMENTO AFECTADO Y TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LAS LESIONES.

Siguiendo la clasificación de Outerbridge, 5 pacientes con rotura de LCA y lesión meniscal asociada y 11 con rotura aislada de LCA se catalogaron como grado 0, 6 controles positivos y 2 casos problema como grado 1 y sólo 1 paciente con ambas lesiones tuvo una puntuación de 2.

El tiempo de evolución de la lesión, desde el día que se produjo hasta el de la intervención quirúrgica fue de  $24,25 \pm 32,67$  meses para los pacientes con doble lesión y de  $30,08 \pm 35,79$  para los que tenían sólo rotura del LCA.

### 3.3. PROTEÍNA C REACTIVA (PCR)

Los pacientes con rotura del LCA y lesión meniscal asociada, presentaron las mayores cifras de PCR ( $4,39 \pm 0,99$  mg/mL), que mostraron tendencia a la significación estadística con respecto a los individuos con rotura aislada y sin lesión meniscal ( $2,37 \pm 0,51$ ) ( $p < 0.1$ , test de Mann-Whitney). Ambos grupos presentaron concentraciones significativamente superiores que los sujetos controles negativos ( $0,58 \pm 0,31$ ) ( $p < 0.05$ , test de Mann-Whitney).

La concentración de PCR no se relacionó con el tiempo de evolución de las lesiones, el grado de afectación condral, los niveles de citoquinas, MMP3, TIMP1 o HSPA1A en ninguno de los grupos estudiados.

### 3.4. CITOQUINAS, QUIMOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Se cuantificaron las concentraciones séricas de los biomarcadores en 8 sujetos problema, 5 controles positivos y 5 controles negativos. Todas ellas siguieron una distribución normal ( $p > 0.05$ ).

Los valores de IL-1 $\alpha$ , IL-8, IFN- $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF y MMP3 no mostraron diferencias significativas entre los grupos estudiados. Los pacientes del grupo control positivo presentaron concentraciones de IL-6 y TNF- $\alpha$  significativamente superiores a los del grupo problema. Los pacientes con rotura aislada de LCA presentaron las mayores cifras de IP-10 y RANTES (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones séricas de citoquinas en la población estudiada, segmentada según el grupo.

pg/mL	IL-6 (X $\pm$ SEM)	IL-1 $\alpha$ (X $\pm$ SEM)	IL-8 (X $\pm$ SEM)	TNF- $\alpha$ (X $\pm$ SEM)	IFN-r (X $\pm$ SEM)	G-CSF (X $\pm$ SEM)	GMCSF (X $\pm$ SEM)	IP-10 (X $\pm$ SEM)	RANTES (X $\pm$ SEM)
<b>CONTROLES POSITIVOS N=5</b>	5.77 $\pm$ 0.88	0.11 $\pm$ 0.059	0.075 $\pm$ 0.007	0.29 $\pm$ 0.13	0.14 $\pm$ 0.14	0.27 $\pm$ 0.06	2.40 $\pm$ 1.57	0.16 $\pm$ 0.02	2.65 $\pm$ 0.08
<b>CASOS N=8</b>	3.68 $\pm$ 0.36	0.097 $\pm$ 0.05	0.069 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.11	0.15 $\pm$ 0.04	1.51 $\pm$ 0.5	0.32 $\pm$ 0.04	3.26 $\pm$ 0.23
<b>CONTROLES NEGATIVOS N=5</b>	I	I	I	I	I	I	I	0.04 $\pm$ 0.005	2.49 $\pm$ 0.021
<b>P*</b>					—	0.018	0.033	0.006	0.040
<b>P**</b>	0.045	NS	NS	0.045	NS	0.095	NS	0.03	0.045
<b>P***</b>	—	—	—	—	—	—	—	0.012	0.048

Resultados expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (X $\pm$ SEM) (ng/mL).

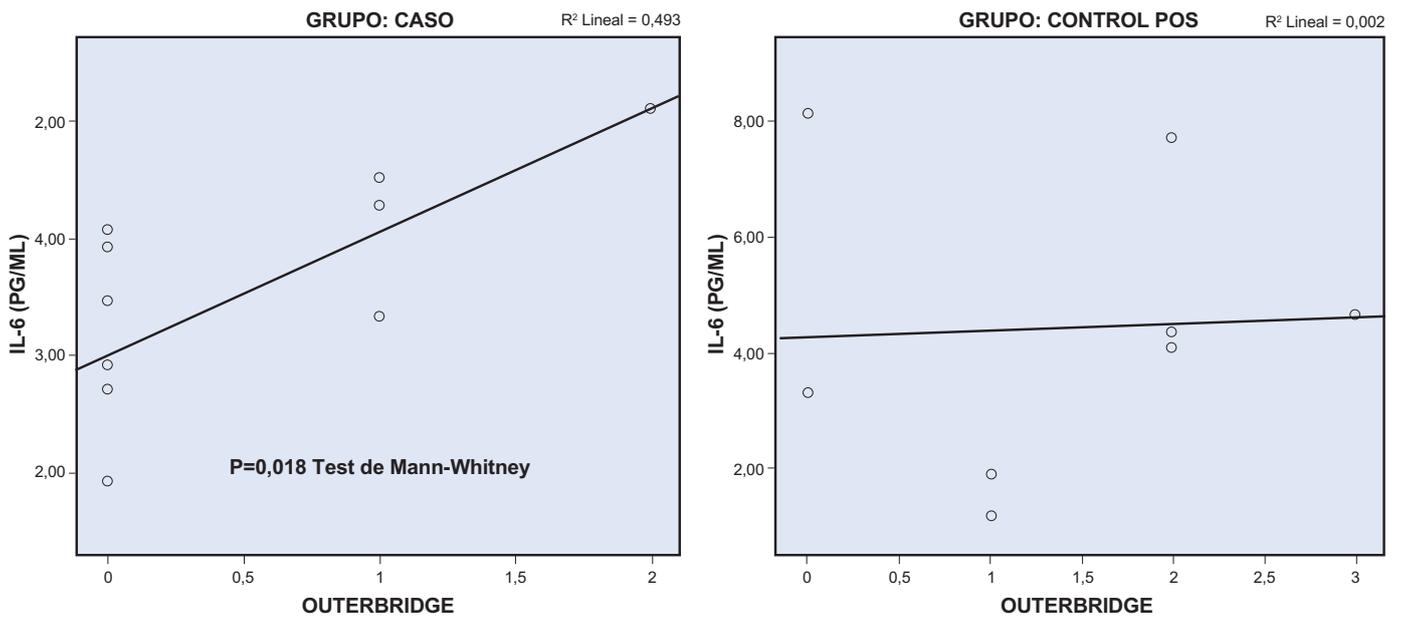
I Indetectable

P\* Test de Kruskal-Wallis

P\*\* Test U de Mann-Whitney controles positivos versus casos problemas

P\*\*\* Test U de Mann-Whitney controles negativos versus casos problemas

Figura 1. Coerrelación entre la concetración IL-6y el grado de lesión condral.



Los pacientes con rotura aislada de LCA, y no los que presentaban lesión meniscal asociada, presentaron una correlación positiva entre los niveles de IL-6 y el grado de lesión condral según clasificación de Outerbridge ( $p=0.018$ ,  $r=0.493$ , test de Spearman) (Figura 1). Ninguna del resto de las ILs estudiadas se relacionaron con la edad, el tiempo de evolución de la lesión o el grado de afectación del cartílago articular.

Al analizar las interrelaciones entre las concentraciones séricas de las diferentes interleuquinas, se demuestra que al considerar la población patológica global, existe una fuerte correlación positiva significativa entre los valores de IL6 y TNF- $\alpha$  en la población global, que se pierde al segmentar los grupos, y entre IL-6 y RANTES en los pacientes con lesión de LCA con y sin afectación del menisco simultánea. Se demuestra igualmente la correlación significativa entre las dos quimocinas IP-10 y RANTES. El resto de citoquinas estudiadas muestran también fuertes correlaciones positivas entre ellas. Al segmentar por grupo de patología, dichas correlaciones son más acusadas entre los pacientes con lesión aislada de LCA que en el grupo control positivo (Tabla 2).

### 3.5. MMP3 Y TIMP1

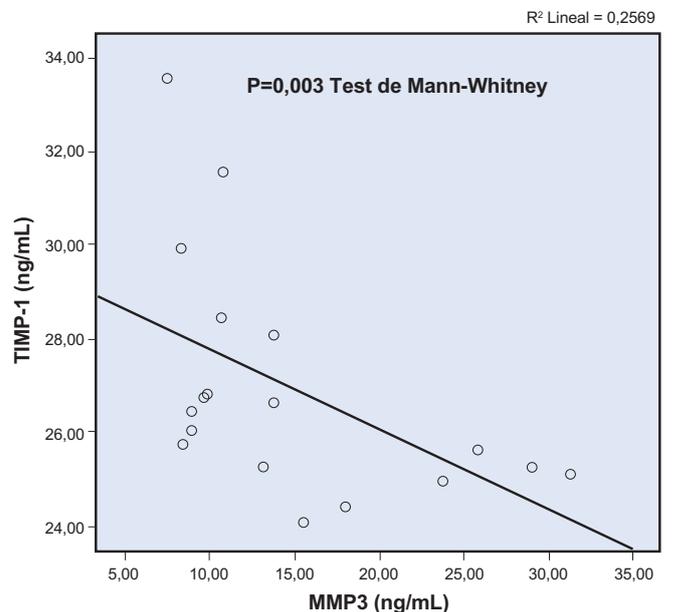
Se cuantificó la concentración en suero de MMP3 y TIMP1 en 13 casos problema, 10 controles positivos y cinco controles negativos, la cual siguió una distribución normal.

No se evidenciaron diferencias en las concentraciones de MMP3 entre los pacientes con rotura aislada del LCA y aquellos con rotura de LCA y lesión meniscal, ni tampoco con el grupo control.

Los pacientes del grupo problema tuvieron las mayores concentraciones de TIMP1, próximos a la significación estadística con respecto a los controles positivos ( $p=0.073$ , Test de Mann-Whitney).

Se objetivó una significativa correlación negativa entre los valores séricos de MMP3 y de TIMP1 ( $r = -509$ ,  $p = 0.003$ ) (Figura 2). En los grupos estudiados no se demostró correlación entre las concentraciones de MMP3 y TIPM1 y el tiempo de evolución de la lesión o el grado de afectación del cartílago.

Figura 2. Correlación negativa entre las concentraciones de MMP





**Tabla 3.** Concentraciones séricas de HSPA1A en la población estudiada segmentada según el grupo al que pertenecen

	CONTROLES POSITIVOS		CASOS PROBLEMA		CONTROLES NEGATIVOS		P
HSPA1A) (ng/mL)	N=10	X ± SEM 1.24±0.06	N=10	X ± SEM 2.31±0.51	N=11	X ± SEM 1.54±0.18	*P=0.028 **P=0.011
		Mediana (rango) 1.25 0.90-1.59		Mediana (rango) 2.01 1.06-6.58		Mediana (rango) 1.46 1.03-3.25	

Resultados expresados como media ± error estándar de la media (x ± SEM) (ng/mL).

P\* Test de Kruskal-Wallis

P\*\* Test U de Mann-Whitney controles positivos versus casos problemas

### 3.6. HSPA1A

Se midió la concentración en suero de MMP3 y TIMP1 en 13 casos problema, 10 controles positivos y diez controles negativos, la cual siguió una distribución normal.

Los pacientes con doble lesión del LCA y del menisco, presentaron valores de HSPA1A significativamente inferiores que los controles negativos y los casos problema (Tabla 3).

No se objetivaron relaciones significativas entre los niveles de HSPA1A y el tiempo de evolución de las lesiones, el grado de afectación del cartílago, las concentraciones de citoquinas, quimocinas, factores de crecimiento o de MMP3 y TIMP1.

### 3.7. EXPRESIÓN GÉNICA EN MUESTRAS DE MEMBRANA SINOVIAL

Se realizó la cuantificación relativa de los mRNAs de IL-1 $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , HSPA1A, MMP3, TIMP-1, CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF) y CSF3 (G-CSF) en muestras obtenidas de la membrana sinovial de las rodillas lesionadas de 24 pacientes en total, 13 casos problema y 11 controles positivos. En los dos casos restantes, no pudo aislarse RNA total por probable degradación del mismo en el proceso de obtención y traslado de la muestra.

En ninguno de los casos estudiados se objetivó expresión génica de IL-1  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , G-CSF y GM-CSF.

#### IL-6

No fue posible la cuantificación de mRNAs por ausencia de amplificación en 8 de los casos. En los 16 restantes (7 controles positivos y 9 muestras problema), la expresión génica fue mínima sin diferencias entre ambos grupos. (Figura 3).

#### TNF- $\alpha$

Todos los pacientes estudiados expresaron mRNAs de TNF- $\alpha$  en membrana sinovial con diferencias que no alcanzaron la significación estadística en ambos grupos. (Figura-3).

#### IL-8

En tres pacientes, no se produjo amplificación y por tanto no se detectó expresión de mRNAs. En los 9 casos problemas y 12 controles positivos que sí se objetivó, las diferencias no fueron significativas. (Figura 3).

#### CXCL10 (IP-10)

Todos los pacientes excepto dos, presentaron amplificación eficiente para la cuantificación de mRNAs, cuya expresión no arrojó diferencias significativas entre ambos grupos estudiados. (Figura 3).

#### CCL5 (RANTES)

En todos los pacientes fue posible la cuantificación relativa de mRNAs, sin que se demostraran diferencias significativas entre los grupos. (Figura 3)

#### MMP3

Todos los casos, expresaron fuertemente el gen MMP3 en membrana sinovial sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. No se objetivó relación entre el grado de expresión de MMP3 en la membrana sinovial y el tiempo de evolución de las lesiones o la gravedad de la afectación del cartílago. (Figura 3).

#### TIMP1

Se objetivó una fuerte expresión génica de TIMP1 en todos los casos estudiados, que fue significativamente superior en los pacientes con rotura de LCA aislada, que en aquellos con la doble lesión ligamentaria y meniscal ( $p=0.023$ , Test de Mann-Whitney). Figura-3). Sin embargo la cuantificación de mRNAs de TIMP1 en membrana sinovial no se relacionó con el tiempo de evolución ni con el grado de lesión condral.

#### HSPA1A

Todas las muestras de membrana sinovial presentaron expresión génica de HSPA1A, pero dicha expresión fue significativamente inferior ( $p=0.33$ , Test de Mann-Whitney) en los pacientes con doble lesión meniscal y ligamentaria. (Figura 3).

No se demostró correlación entre la expresión de HSPA1A en la membrana sinovial y el tiempo de evolución de las lesiones o la gravedad de la afectación condral.

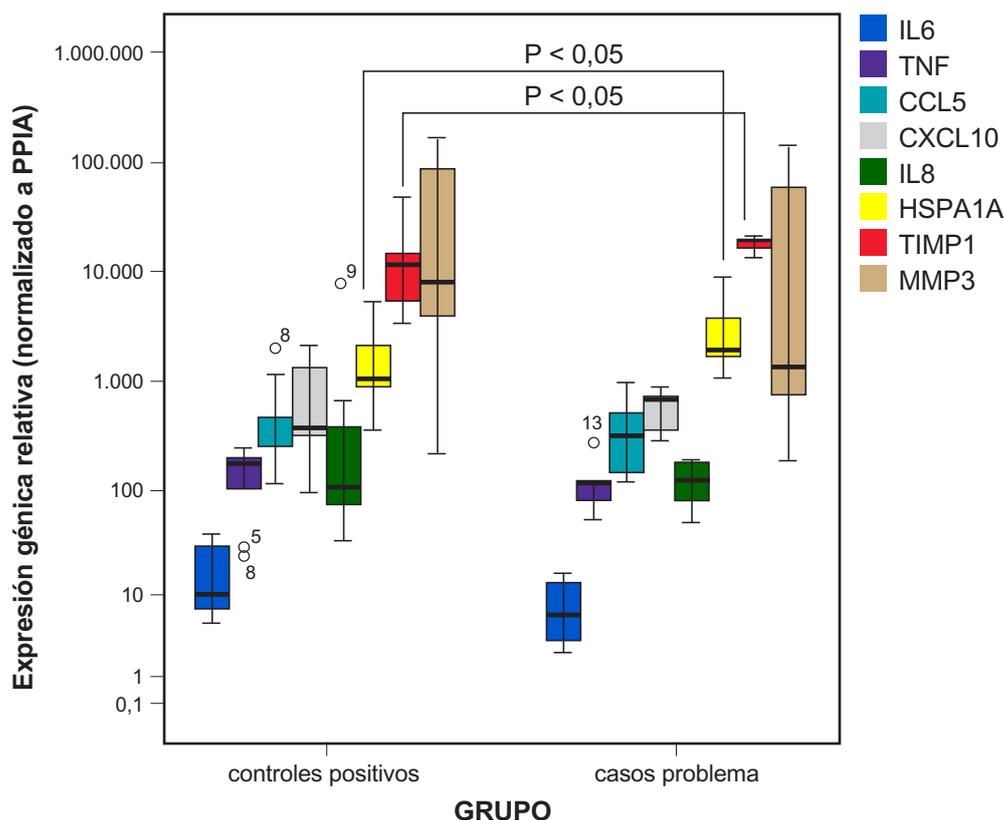


Figura 3. Expresión génica en membrana sinovial (PPIA: ciclofilina)

## 4. DISCUSIÓN

Está ampliamente aceptado que los pacientes con traumatismos en la articulación de la rodilla, a menudo desarrollan una OA secundaria. Con el estudio de la síntesis y de la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimocinas, factores de crecimiento, MMP3, TIMP1 y proteínas de choque térmico en la membrana sinovial de pacientes con rotura aislada del LCA, o concurrente con lesión del menisco, se ha intentado avanzar en el conocimiento de los procesos inflamatorios que se producen en las fases más tempranas del proceso degenerativo.

El concepto de que la OA es un proceso que afecta exclusivamente al cartílago ha sido desestimado hace algún tiempo al comprobarse que, especialmente en las primeras fases de la degeneración, la membrana sinovial está implicada en el proceso inflamatorio a través de la producción de citoquinas y otros mediadores proinflamatorios. Además el papel funcional que las proteínas investigadas tienen en el líquido sinovial está ampliamente documentado [20]. Esta moderada inflamación sistémica estaría relacionada con el incremento observado en los niveles de PCR en las fases tempranas de la patogénesis de la OA [21]. Ello es consistente con nuestros hallazgos; los pacientes con mayor grado de lesión articular presentan los niveles más altos de PCR, lo cual para algunos autores, se correlaciona con el grado de infiltración infla-

matoria de la articulación. A diferencia de otros estudios [11], dichos niveles no se correlacionaron con la concentración de MMP3 ni con el tiempo de evolución de las lesiones, probablemente por ser pacientes en las fases subclínicas o preliminares de desarrollo de OA.

En condiciones normales, sólo es posible extraer una pequeña cantidad de líquido sinovial de la rodilla, y además la aspiración suele ser dificultosa. Además existe un consenso generalizado de que no es ético aspirar líquido articular de pacientes asintomáticos. Por todo ello, se decidió cuantificar los mediadores inflamatorios en suero en lugar de en líquido sinovial y así poder tener también un grupo control negativo sin traumatismo articular. Asimismo, diversos autores han publicado la capacidad que la concentración sérica de biomarcadores tiene de reflejar los acontecimientos precoces que se producen en la articulación tras un traumatismo, si bien el grado de correlación no es igual en todos ellos [10].

En el presente estudio, las concentraciones séricas de IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , la quimocina IL-8, el factor de crecimiento GM-CSF y MMP3, fueron similares entre los tres grupos estudiados, lo que sugiere que su papel proinflamatorio en la fase subclínica y preliminar de la OA no deber ser relevante o que sus concentraciones en suero no reflejan

fielmente lo que sucede en la articulación. En este sentido, Bigoni y cols [12] observaron que los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- $\alpha$ , en líquido sinovial eran similares entre los pacientes con rotura aislada de LCA (18 casos) y los pacientes con rotura meniscal asociada (30 enfermos), lo que interpretaron que podía deberse a que el tamaño muestral fuera demasiado pequeño como para apreciar un claro patrón de cambios en el perfil de estas citoquinas. Se debe aclarar que, si bien la mayoría de los estudios realizados sobre el patrón de citoquinas y otros mediadores inflamatorios en pacientes con rotura, aislada o no, del LCA, se focalizan en la IL-1 $\beta$ , el presente trabajo lo ha hecho sobre la IL-1 $\alpha$ . Dado que ambas interleuquinas, actúan a través de receptores comunes y poseen actividades biológicas similares [7], nuestros resultados pueden ser discutidos con los del resto de la bibliografía. Estos mismos autores observaron la presencia de IL-1 en líquido sinovial sólo en cantidades traza, lo cual es coincidente con este trabajo, por lo que afirman que su papel en la degeneración articular no es evidente.

En contraposición a estos datos, el grupo con rotura meniscal concomitante a lesión del LCA, presentó niveles significativamente superiores de TNF- $\alpha$  y de IL-6. Entre los criterios de inclusión de los pacientes a estudio figuraba que la evolución de las lesiones fuera superior a tres meses por lo que clínicamente se encontraban en la fase crónica. Si bien el grupo de Bigoni y cols cuantificaron citoquinas en líquido sinovial, el hallazgo de los máximos niveles a los tres meses de la lesión concuerdan con los del presente trabajo y representarían la implicación del TNF- $\alpha$  en el proceso inflamatorio crónico y en la severidad de la lesión condral [22]. La IL-6 se considera una importante citoquina proinflamatoria probablemente responsable de la destrucción del cartílago [7,9,12]. Ello coincide con la demostración en este trabajo de la correlación positiva entre la concentración sérica de IL-6 y el grado de lesión condral según clasificación de Outerbridge, que es estadísticamente significativa solo en el grupo problema, probablemente por el menor tamaño muestral del grupo control positivo. La elevación de las concentraciones de TNF- $\alpha$  y IL-6 en los pacientes con doble rotura meniscal y de LCA, podría hacerlos más vulnerables al desarrollo de OA en el futuro dado su carácter de mediadores clave de la respuesta proinflamatoria.

Los pacientes con traumatismo aislado del LCA presentaron los niveles máximos de IP-10 y de RANTES. IP-10 y RANTES son quimocinas, y como tales poseen actividad quimotáctica y su principal función es atraer células inflamatorias a los tejidos inflamados [23]. RANTES además es capaz de inducir la síntesis de mediadores inflamatorios en las células; concretamente induce la producción de IL-6 en los fibroblastos sinoviales e incrementa la respuesta inflamatoria en OA a través de diferentes receptores CCC en tejido sinovial [24]. En el presente trabajo, los pacientes estudiados mostraron una correlación significativa positiva entre ambas quimocinas. Ambas se han identificado en sinoviocitos de pacientes con OA y se ha su-

gerido su posible papel en las fases iniciales del progreso a OA [25].

En la actual investigación, no han podido demostrarse diferencias en las concentraciones de MMP3 en ninguno de los tres grupos estudiados. La síntesis de MMP3 se realiza en el tejido sinovial, más que en los propios condrocitos, y parece estar asociada directamente con el proceso de degeneración del cartílago. Sus niveles en líquido sinovial guardan una significativa correlación con la concentración en suero [10], por lo que los datos aportados por este estudio podrían interpretarse en relación al bajo deterioro del cartílago de acuerdo con la clasificación de Outerbridge, sin dejar de considerar su, quizá, pequeño tamaño muestral. Por el contrario, los pacientes con rotura aislada de LCA tuvieron los valores máximos de TIMP-1, con tendencia a la significación estadística con respecto al grupo con doble lesión ligamentaria y meniscal. Dado que TIMP-1 previene la destrucción de la matriz, inhibiendo las MMPs y promoviendo la proliferación celular, podría inferirse que la lesión aislada de LCA estaría más protegida de una eventual destrucción posterior del cartílago. La fuerte correlación positiva entre la concentración de MMP3 y TIMP-1 confirma lo publicado por otros autores y aboga por el papel protector de TIMP-1 ante la destrucción del cartílago [26].

La HSPA1A extracelular tiene propiedades antiinflamatorias debidas a la inhibición de la expresión de citoquinas proinflamatorias [27] y factores de transcripción proinflamatorios tales como el factor nuclear  $\kappa\beta$  bloqueando la unión y activación a su diana [28]; niveles bajos de HSPA1A circulante promovería un estado proinflamatorio que incrementaría la vulnerabilidad de las rodillas lesionadas a la acción de deterioro de los factores involucrados en la degeneración articular. Los enfermos con doble lesión del LCA y el menisco, son portadores de los menores valores de HSPA1A extracelular, por lo que se puede sospechar que tendrán mayor riesgo de la evolución a OA en el futuro.

Al estudiar la expresión relativa de mRNAs del panel de biomarcadores inflamatorios, no se encontraron transcritos de los genes que codifican para IL-1, IFN- $\gamma$ , G-CSF y GM-CSF. Ello coincide con lo descrito por otros autores [29] que encontraron niveles intraarticulares indetectables de IL-1  $\beta$ , G-CSF y GM-CSF sin diferencias entre pacientes con rotura de LCA y voluntarios sanos. No obstante, demostraron concentraciones significativamente superiores de IFN- $\gamma$  en los pacientes que nuestro estudio no ha podido confirmar quizá por el efecto de la variable tiempo, dado que ellos estudiaron los pacientes en las seis semanas posteriores a la lesión y en nuestro estudio el tiempo promedio fue de 25,80 $\pm$ 33,54 meses.

Al evaluar la expresión en membrana sinovial de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$ , las quimocinas IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10), y RANTES (CCL5), y la metaloproteasa MMP3, la cuantificación relativa de los mRNAs no demostró diferencias significativas entre los pacientes

de los dos grupos estudiados. Ello es discordante con los hallazgos de los transcritos de IL-6, TNF- $\alpha$ , IP-10 y RANTES en suero, y puede interpretarse a la luz de la gran variabilidad inter-pacientes en ambos grupos, indicativa de la considerable idiosincrasia en la respuesta bioquímica individual de los pacientes, lo cual puede ser el equivalente molecular de la variabilidad biológica que se aprecia también clínicamente. Un considerable incremento del tamaño muestral arrojaría luz a las posibles variaciones de expresión génica entre pacientes.

Al igual que lo hallado en la concentración sérica de sus transcritos, los pacientes con doble lesión del LCA y meniscal presentaron niveles relativos de mRNAs de TIMP-1 y HSPA1A significativamente inferiores que los enfermos con rotura aislada del LCA, lo que, dado el carácter citoprotector de ambas, indicaría un ambiente más proinflamatorio en esas rodillas que favorecería la degradación de la matriz extracelular y el desarrollo de OA con el tiempo. Los sujetos con mayor afectación articular serían más vulnerables a la degeneración artrósica de la rodilla.

## 5. CONCLUSIONES

En resumen, se propone la consideración de la cuantificación sérica de TIMP-1 y de HSPA1A como biomarcadores pronósticos de evolución (evolutivos) clínica hacia OA. La identificación de pacientes en riesgo de desarrollar OA facilitaría la instauración de tratamientos individualizadas que abarquen desde la modificación de los estilos de vida, como farmacológicas o la aplicación de hipertermia en la rodilla lesionada, agente inductor universalmente reconocido de las proteínas de choque térmico (30). El incremento de su expresión en la membrana sinovial entecería o podría incluso detener la evolución a la degeneración articular.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a M<sup>a</sup> Jesús Sánchez Fernández y Mar Perez Vivas su inestimable ayuda en el procesamiento de las muestras.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Frobell RB, Lohmander LS, Roos HP. Acute rotational trauma to the knee: poor agreement between clinical assessment and magnetic resonance imaging findings. *Scand J Med Sci Sports* 2007; 17:109-114.
2. Frobell RB, Roos HP, Roos EM, Hellio Le Graverand MP, Buck R, Tamez-Pena J, Totterman S, Boegard T, Lohmander LS. The acutely ACL injured knee assessed by MRI: are large volume traumatic bone marrow lesions a sign of severe compression injury? *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16:829-836
3. Vaquero J. Asociación Española de Artroscopia (AEA). Informe sobre el perfil de la cirugía artroscópica en España. *Cuadernos de Artroscopia* 2001; 8:10-21.
4. Lohmander LS, Englund PM, Dahl LL, Ross EM. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. *Am J Sports Med* 2007; 35:1756-1759.
5. Roos EM. Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17:195-200.
6. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med*. 2000;133:321-328.
7. Cameron M, Buchgraber A, Passler H, Vogt M, Thonar E, Fu F, Evans CH. The natural history of the anterior cruciate ligament-deficient knee. Changes in synovial fluid cytokine and keratan sulfate concentrations. *Am J Sports Med*. 1997;25:751-754.
8. Lidén M, Sernert N, Rostgård-Christensen L, Kartus C, Ejerhed L. Osteoarthritic changes after anterior cruciate ligament reconstruction using bone-patellar tendon-bone or hamstring tendon autografts: a retrospective, 7-year radiographic and clinical follow-up study. *Arthroscopy*. 2008;24:899-908.
9. Louboutin H, Debarge R, Richou J, Selmi TA, Donell ST, Neyret P, Dubrana F. Osteoarthritis in patients with anterior cruciate ligament rupture: a review of risk factors. *Knee*. 2009;16:239-244.
10. Catterall JB, Stabler TV, Flannery CR, Kraus VB. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254). *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R229.
11. Wassilew GI, Lehnigk U, Duda GN, Taylor WR, Matziolis G, Dinybil C. The expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the synovial membranes of patients with osteoarthritis compared with traumatic knee disorders. *Arthroscopy*. 2010;26:1096-1104.

12. Bigoni M, Sacerdote P, Turati M, Franchi S, Gandolla M, Gaddi D, Moretti S, Munegato D, Augusti CA, Bresciani E, Omeljaniuk RJ, Locatelli V, Torsello A. Acute and late changes in intraarticular cytokine levels following anterior cruciate ligament injury. *J Orthop Res.* 2013;31:315-21.
13. Englund M, Guermazi A, Roemer FW, Aliabadi P, Yang M, Lewis CE, Torner J, Nevitt MC, Sack B, Felson DT. Meniscal tear in knees without surgery and the development of radiographic osteoarthritis among middle-aged and elderly persons: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 2009;60:831-839.
14. Rai MF, Patra D, Sandell LJ, Brophy RH. Transcriptome analysis of injured human meniscus reveals a distinct phenotype of meniscus degeneration with aging. *Arthritis Rheum.* 2013;65:2090-2101.
15. Brophy RH, Rai MF, Zhang Z, Torgomyan A, Sandell LJ. Molecular analysis of age and sex-related gene expression in meniscal tears with and without a concomitant anterior cruciate ligament tear. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Mar 7;94:385-393.
16. Jäättelä M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 1999; 31: 261-271.
17. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guideline for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 2009; 14:105-111
18. Nadeau SI, Landry J. Mechanisms of activation and regulation of the heat shock-sensitive signaling pathways. *Adv Exp Med Biol* 2007;594:100-113.
19. Naraoka T, Ishibashi Y, Tsuda E, Yamamoto Y, Kusumi T, Kakizaki I, Toh S. Time-dependent gene expression and immunohistochemical analysis of the injured anterior cruciate ligament. *Bone Joint Res.* 2012;1:238-244.
20. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012;64:1697-1707.
21. Pearle AD, Scanzello CR, George S, Mandl LA, DiCarlo EF, Peterson M, Sculco TP, Crow MK. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15:516-523.
22. Marks PH, Donaldson ML. Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee. *Arthroscopy.* 2005;21:1342-1347.
23. Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, Nakamura H, Aoki H, Kato T, Nishioka K. The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1056-1070.
24. Beekhuizen M, Gierman LM, van Spil WE, Van Osch GJ, Huizinga TW, Saris DB, Creemers LB, Zuurmond AM. An explorative study comparing levels of soluble mediators in control and osteoarthritic synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21:918-922.
25. Schwager J, Hoeller U, Wolfram S, Richard N. Rose hip and its constituent galactolipids confer cartilage protection by modulating cytokine, and chemokine expression. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11:105.
26. H, Shirakura K, Kimura M, Terauchi M, Shinozaki T, Watanabe H, Takagishi K. Changes in biochemical parameters after anterior cruciate ligament injury. *Int Orthop.* 2006;3:43-47.
27. Luo X, Zuo X, Zhou Y, Zhang B, Shi Y, Liu M, Wang K, McMillian DR, Xiao X. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor-alpha induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther* 2008; 10:R41. DOI: :10.1186/ar2399.
28. Stice JP, Knowlton AA (2008). Estrogen, NFkappaB, and the heat shock response. *Mol Med* 2008; 14:517-527.
29. Cuellar VG, Cuellar JM, Golish SR, Yeomans DC, Scuderi GJ. Cytokine profiling in acute anterior cruciate ligament injury. *Arthroscopy.* 2010;26:1296-1301.
30. Kiang J.G, Tsokos G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* 1998; 80: 183-201.