

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado

Medikuntzako Gradua / Grado en Medicina

Utilidad del dimetilsulfóxido para la criopreservación de muestras de líquido sinovial

Evaluación de la persistencia de contajes celulares, detección e identificación de cristales

Egilea / Autora:
Elsa López Bardón
Zuzendaria / Director:
Fernando Pérez Ruiz

© 2021, Elsa López Bardón

Cruces, 20 de abril de 2021

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. METODOLOGÍA	4
2.1 RECOGIDA Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS	4
2.2 ALMACENAJE DE MUESTRAS	5
2.3 TINCIÓN DE LAS MUESTRAS	5
2.4 ALEATORIZACIÓN DE MUESTRAS	6
2.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS	6
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	7
3. RESULTADOS	7
4. DISCUSIÓN	11
5. CONCLUSIONES	15
6. BIBLIOGRAFÍA	16

ABREVIATURAS

LS: líquido sinovial

UMS: urato monosódico monohidratado

PFCa: pirofosfato cálcico dihidratado

EDTA: etilendiaminotetraacético

DMSO: dimetilsulfóxido

TFG: Trabajo Fin de Grado

Leucos: leucocitos

FPR: Fernando Pérez Ruiz

ELB: Elsa López Bardón

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El líquido sinovial (LS) es un dializado del plasma, secretado por la membrana sinovial, que se encuentra en el interior de las cavidades sinoviales. En condiciones fisiológicas, no contiene factores de coagulación, eritrocitos ni hemoglobina; sin embargo, contiene hialuronato y glicoproteínas lubricantes (1).

Se conocen diferentes patrones de expresión de proteínas y citocinas, relacionados con procesos de inflamación o degeneración de las estructuras articulares, en los que la composición del líquido sinovial puede verse modificada (2).

El estudio del líquido sinovial es una exploración complementaria que facilita la evaluación de los derrames sinoviales (3). Su obtención es necesaria para el diagnóstico de certeza mediante la observación de cristales en la gota y la artritis por depósito de pirofosfato, así como para permitir el aislamiento del agente patógeno en las artritis bacterianas. (4, 5). Por último, permite clasificar las artropatías en inflamatorias y no inflamatorias, valorar la eficacia del tratamiento farmacológico y predecir la progresión del daño estructural en la enfermedad pudiendo cuantificar el proceso inflamatorio (6, 7).

La obtención de muestras de líquido sinovial se realiza mediante punción de la articulación, o artrocentesis, tanto durante los episodios de inflamación aguda como en articulaciones previamente inflamadas (8). Su observación microscópica, generalmente en fresco o mediante tinciones de citología estándar, permite realizar un recuento celular y detectar e identificar cristales (3). Evitar la dilación en el tiempo entre la artrocentesis y la observación de las muestras de líquido sinovial es relevante para prevenir la degradación leucocitaria y la potencial alteración de los cristales con el paso del tiempo, especialmente los de pirofosfato cálcico, susceptibles de ser degradados ex vivo por pirofosfatasas leucocitarias (5).

El patrón oro diagnóstico de las artritis por microcristales se realiza mediante microscopía con luz simple y luz polarizada, con compensador rojo de primer orden, en muestras de líquido sinovial. Es un método rápido, de bajo coste, que no requiere procesamiento de muestras (9) y con alta sensibilidad para detectar cristales y especificidad para diferenciar por su forma, refringencia y elongación los cristales de

urato monosódico monohidratado (UMS) de los de pirofosfato cálcico dihidratado (PFCa) (10). Es, por consiguiente, una exploración complementaria altamente eficiente.

Los UMS tienen forma acicular, una intensa refringencia y una elongación negativa, mientras que los de PFCa, aparecen como paralelepípedos con ausencia o intensidades variables de refringencia (menores a las de MSU), elongación positiva cuando son refringentes y realce con contraste de fases (5, 9, 11). La presencia de cristales en muestras de LS permite la confirmación de la sospecha de artritis por cristales evitando pruebas complementarias innecesarias y permitiendo un tratamiento inmediato de las mismas (5).

La visualización de muestras mediante microscopía de luz polarizada puede verse artefactada por la presencia partículas de polvo o vidrio y su rendimiento reducido por el grado de experiencia en la realización de la técnica (5). Así, Montagna et al. refiere en su estudio que la correlación entre diferentes laboratorios y observadores es elevada (12), mientras que Graf et al. en una revisión sistemática concluyen que la consistencia en la interpretación de resultados es escasa (13). Por todo ello, para el correcto desarrollo de la técnica, es necesario un entrenamiento especializado del observador (14) y facilitar datos clínicos (13).

Se ha descrito una sensibilidad de la microscopía con luz polarizada para la detección de identificación de cristales en el líquido sinovial de hasta el 84,4% (15) y una especificidad de hasta el 97,2% (16). No obstante, la falta de disponibilidad inmediata de la técnica y la dificultad para la conservación de las muestras en ciertos entornos asistenciales, como la atención primaria o las urgencias, limita su uso (17, 18, 19). Podría facilitarse el uso de esta técnica, si no fuese posible el análisis inmediato, desarrollando métodos de preservación de muestras que darían solución a este tipo de aspectos logísticos (19) (20).

Por ello, Graf et al. en su revisión sistemática buscan conocer la influencia de los diferentes factores de manejo y almacenaje de las muestras en los resultados del análisis del líquido sinovial. Concluyen que los cristales de UMS en muestras de líquido sinovial permanecen estables a temperatura ambiente durante 24-48 horas y después, progresivamente, su concentración desciende. No obstante, con la

refrigeración de muestras a 4°C (refrigerador estándar), se observa una mínima reducción de cristales a los 2 meses (13). Sin embargo, Pastor et al. discrepan de estos resultados (10): indican que los cristales de UMS se mantienen estables y sin formación “de novo” durante una semana, independientemente de la temperatura de almacenaje o el agente de preservación y que, respecto a los cristales de pirofosfato cálcico, su detección decrece con el tiempo a temperatura ambiente y en la conservación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), manteniéndose tres días si son refrigerados y preservados en heparina y con una persistencia menor tras 7 días (10).

La técnica de criopreservación difiere de la vitrificación, en que implica la congelación de células o tejidos en presencia de una relativa baja concentración de agente crioprotector (como un 10% de DMSO) a ritmos lentos (como -1°C/min) (21). El dimetilsulfóxido (DMSO) es un compuesto muy utilizado en biología celular al permitir deshidratar células durante la criopreservación, previniendo así la formación de cristales de hielo en el componente intracelular (22). El primer ensayo en el que se utiliza el DMSO, para prevenir el daño por congelación en células vivas, fue en 1959 por Lovelock y Bishop (23). Desde entonces, se ha convertido en el agente más utilizado para la criopreservación de células y tejidos (20).

Su estructura química, [(CH₃)₂SO], consiste en una molécula anfipática con un dominio polarizado y dos no polarizados, que hacen que sea soluble en medios tanto acuosos como orgánicos, permitiendo diversas utilidades tanto en el ámbito clínico como en el laboratorio (20). La acción crioprotectora del DMSO reside en fuertes interacciones con el agua que disminuyen el umbral de congelación de la solución (24) (25). Además, es capaz de penetrar en las membranas celulares inhibiendo la formación de cristales intracelulares y previene la deshidratación severa, que se lleva a cabo con la formación de cristales de hielo extracelular (26, 27, 28). Las fases clave del procedimiento de criopreservación con DMSO, son la formulación e introducción en el medio refrigerado, el rango de congelación, las condiciones de almacenamiento, la descongelación y el tiempo posterior a la misma (29).

Una de sus principales aplicaciones hoy en día, es la criopreservación de células madre hematopoyéticas para trasplantes, permitiendo ampliar el tiempo en el que la célula se

mantiene viable y la diversidad genética de células disponibles para el trasplante (29). Wohnhaas et al. refieren que permite criopreservar células inmunes manteniendo perfiles similares de expresión genética, con respecto a las células en fresco (30). Además, Hoang et al. afirman que el DMSO es un potente antioxidante que, en combinación con el yoduro de zinc podría resultar eficaz en enfermedades víricas, tales como el SARS CoV-2 (31).

Pérez-Ruiz et al. mencionan en una publicación la plausibilidad del uso de diluciones al 10% de dimetilsulfóxido para la criopreservación de muestras de líquido sinovial, procedimiento muy similar al utilizado en hematología con los leucocitos, preservando la viabilidad de los mismo durante un corto periodo de tiempo después de la congelación (32). Este procedimiento no ha sido validado hasta ahora.

Todo ello, nos hace plantear la hipótesis, en la que se centra nuestro estudio: la posible utilidad del DMSO para la criopreservación de las muestras de líquido sinovial, evaluando la persistencia de contajes celulares y la detección e identificación de cristales. El objetivo de este estudio es observar si DMSO permite criopreservar las muestras de líquido sinovial, sin que estas pierdan sus características principales, para su almacenaje y evaluación posterior o su uso en docencia pregrado o postgrado.

2. METODOLOGÍA

Se diseña un estudio de corte transversal, prospectivo y observacional. Las muestras de líquido sinovial se obtienen, de la práctica clínica, en el Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de Cruces (Barakaldo, Vizcaya).

2.1 RECOGIDA Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

La recogida de muestras de líquido sinovial se realizó por el director del TFG (FPR), desde el 1 de diciembre de 2020 hasta el 28 de febrero de 2021. Todas ellas, son excedentes de artrocentesis de pacientes con artritis por microcristales, que han otorgado consentimiento para el empleo de sus muestras para investigación; en cohortes prospectivas de investigación aprobadas por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Cruces (CEIC) con código CEIC

E03/45 para la cohorte de gota y con código CEIC E07/15 para la cohorte de artritis por pirofosfato.

Se descartaron aquellas muestras que pudieran presentar cristales tanto de UMS como de PFCa por la complejidad técnica que supone y los LS hemorrágicos o sanguinolentos, para evitar la dificultad añadida por la presencia masiva de eritrocitos.

2.2 ALMACENAJE DE MUESTRAS

Tras la recogida, con un lapso menos de 30 min, las muestras fueron posteriormente congeladas, con y sin dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (alícuotas 1+ y 1-), a -20°C. Se utilizó un congelador con control externo de temperatura y controlado por la coordinadora de Ensayos Clínicos del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Cruces y aprobado por los promotores de ensayos como procedimiento estandarizado. Se rotularon con el código de aleatorización asignado.

Las alícuotas se descongelaron a 37°C previamente a su observación, durante 5-10 minutos y la observación se realizó en los 10 minutos siguientes para preservar la vitalidad de las mismas.

2.3 TINCIÓN DE LAS MUESTRAS

La vitalidad de la muestra se estudiará mediante tinción de azul tripano. El azul tripano o trypan blue es una tinción coloidal y supravital, que se utiliza para la identificación de células viables en el cultivo de tejidos. Las células dañadas o necrosadas permiten el paso de colorante transmembrana, tiñéndose de forma difusa, incluyendo el núcleo y el citoplasma (33, 34). Se utiliza en el examen histológico de muestras de origen humano como marcador de daño celular (35).

En cuanto a la posible toxicidad del compuesto; Linshaw et al, Auskaps, Pappenhei y Tennant, concluyen en sus estudios que no se detecta. Esto permite que los cultivos teñidos se mantengan viables para la evaluación de otros agentes sobre los mismos (33, 34, 36, 37).

El almacenaje del colorante para microscopía debe realizarse en temperaturas entre 5 y 30°C, teniendo en cuenta la fecha de caducidad indicada. Los frascos deben

mantenerse siempre bien cerrados y tan pronto como los núcleos celulares sean teñidos de color pardo, será necesario cambiar de solución (35).

2.4 ALEATORIZACIÓN DE MUESTRAS

Cada muestra se aleatoriza en dos alícuotas con la adición o no de DMSO al 10%, considerándose como 1+ y 1-. Mediante un generador online de números aleatorios aleatoria se asignó un número a cada alícuota para mantener una asignación aleatoria y ciega en las observaciones posteriores.

2.5 ANÁLISIS DE MUESTRAS

Las muestras 0 fueron evaluadas y catalogadas de la siguiente forma por el observador de referencia (FPR): sin cristales, con cristales de urato (urato monosódico monohidratado) o con cristales de pirofosfato (pirofosfato cálcico dihidratado); considerándose como “alícuota cero”. Las muestras que no mostraron cristales tras observar >9 campos consecutivos en un área 3*3 campos se consideraron negativas, sin cristales.

El número de cristales por campo se valoró de forma semicuantitativa: < 1/campo, 1-5/campo, 6-10/campo y >10/campo. El número de campos necesarios hasta observar un cristal definido se evaluó asimismo de forma semicuantitativa: 1-3 campos, 4-6 campos, 7-9 campos > 9 campos. La vitalidad medida mediante tinción de azul tripano se midió de forma semicuantitativa: <25%, 25-50%, 50-75% y >75% células vitales y solo por el observador senior.

La revisión de las muestras almacenadas se realizó tres meses tras su obtención, utilizando un microscopio Nikon Eclipse 50i mediante luz ordinaria, polarizada con compensador rojo de primer orden y contraste de fases. Los análisis del líquido sinovial los llevaron a cabo dos observadores de forma independiente: la estudiante que realiza este TFG del Grado de Medicina (ELB), que previamente recibe entrenamiento específico en la detección e identificación de cristales en muestras de líquido sinovial, y un senior con experiencia y certificación por la Liga Europea de Reumatología (FPR), como referencia (1E y 1S, respectivamente). El observador junior (ELB) recibió un entrenamiento básico en 4 sesiones de 1 hora mediante

muestras de LS en fresco para el contaje leucocitario, detección e identificación de cristales.

Ambos adquirieron las mismas variables que se determinaron para la muestra 0, a excepción de la vitalidad, que solo fue evaluada por el observador experto.

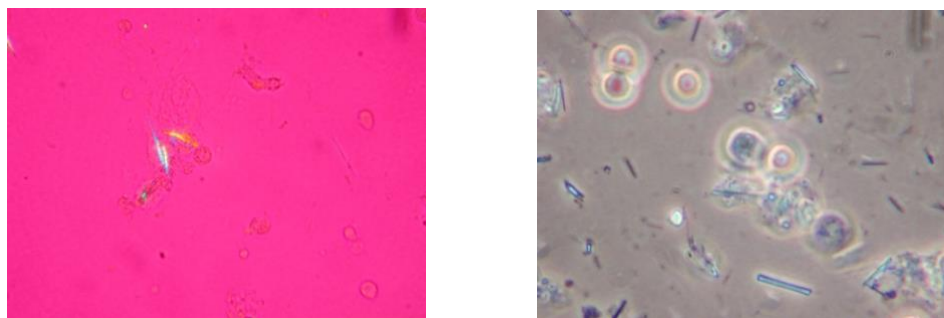


Figura 1. Microscopía óptica del líquido sinovial. 1a (izda) 400* luz polarizada, mostrando cristales de UMS: 1b (dcha) 400* contraste de fases, mostrando cristales de PFCa. Perez-Ruiz F© 2021, con permiso.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha realizado mediante el paquete estadístico SPSS de IBM V23, por ELB y FPR. Se analizan las diferencias en contajes celulares con medias pareadas para comparación de muestras 0 y 1, medias independientes para 1E y 1S, así como la fiabilidad mediante alfa de Cronbach y correlación intraclase. La concordancia entre la detección de cristales y la identificación de los mismos con las muestras de referencia y las evaluaciones de los observadores tras criopreservación, se realiza mediante índice Kappa.

3. RESULTADOS

En el estudio se incluyeron 30 muestras de líquido sinovial consecutivas que se dividieron en 90 alícuotas, de las cuales 30 fueron consideradas “alícuota cero” y se evaluaron de forma inmediata: 8 con cristales de UMS, 10 con PFCa y 12 sin cristales. Las alícuotas con y sin DMSO fueron visualizadas tras la descongelación por los dos observadores, si bien el segundo observador no pudo valorar 7 de los LS por circunstancias derivadas de la Covid-19.

El contaje inicial (“alícuota cero”) de leucocitos se sitúa entre los 200 y los 30.000 leucocitos por microlitro y sus datos se representan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Contaje inicial de leucocitos en la “alícuota cero”. Medidas de frecuencia.

Medida de frecuencia	Leucocitos 0
Media	13140
Mediana	9000
Desviación estándar	10674
Mínimo	200
Máximo	30000
Percentil 25	3375
Percentil 75	20000

Se detectaron cristales (UMS o PFCa) en 18/30 (60%) de las muestras de LS, con un 17/18 (94,4%) de las identificaciones en los campos 1-3. En 13/18 (el 72%) de las muestras con cristales, se hallaron más de 10 cristales por campo observado.

En el contaje de leucocitos se observa que existe una pérdida celular significativa tras la congelación de las muestras, que es menor con la adición del DMSO (**Tabla 2**).

Tabla 2. Prueba T para muestras relacionadas en el contaje de leucocitos tras la descongelación con y sin adición de DMSO. Comparación de las medias de muestras emparejadas. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$.

Leucocitos	Media	N	Desviación estándar
Referencia	13140	30	10674
DMSO+ Observador 1	10200*	30	7747
Referencia	14748	23	11378
DMSO+ Observador 2	6735*	23	4100
Referencia	13140	30	10674
DMSO- Observador 1	5503**	30	6105
Referencia	1878	23	11278
DMSO- Observador 2	3195**	23	2696

Al evaluar la fiabilidad entre los dos observadores para el conteo de leucocitos, mediante el estadístico alfa de Cronbach (ver **Tabla 3**), se observa que es mayor la fiabilidad del observador 1 (senior). Además, el grado de acuerdo de ambos observadores se incrementa con la adición de DMSO a la muestra, disminuyendo también los límites de los intervalos de confianza.

Tabla 3. Coeficiente de correlación intraclase para medidas promedio (intervalo de confianza 95%) entre los distintos observadores y la “muestra cero” en conteo de leucocitos con y sin DMSO. Se mide mediante el parámetro alfa de Cronbach, que se considera aceptable por encima del valor 0,6 y muy bueno si es superior a 0,9.

	DMSO+	DMSO-
Observador 1	0,91 (0,81-0,96)	0,79 (0,56-0,90)
Observador 2	0,43 (-0,35-0,76)	0,28 (-0,69-0,70)

En las muestras sin adición de DMSO, el grado de acuerdo en la detección de cristales disminuye para ambos observadores con respecto a la “alícuota cero”. En cambio, en aquellas muestras con adición de DMSO la concordancia aceptable casi total (ver **Tabla 4**).

Tabla 4. Análisis de la concordancia en detección de cristales mediante Índice Kappa entre los dos observadores con la muestra de referencia, con y sin adición de DMSO.

	DMSO+				DMSO-			
	Observador 1		Observador 2		Observador 1		Observador 2	
	Cristales-	Cristales+	Cristales-	Cristales+	Cristales-	Cristales+	Cristales-	Cristales+
Cristales-	12	0	2	2	11	1	3	2
Cristales+	0	18	0	18	5	13	7	10
	Índice Kappa observador 1: 1,00				Índice Kappa observador 1: 0,61			
	Índice Kappa observador 2: 0,62				Índice Kappa observador 2: 0,14			

En la identificación de cristales (UMS, PFCa o ausencia de ellos), la presencia de crioprotector en la muestra, también incrementa el grado de acuerdo con la muestra de

referencia. El índice Kappa del observador disminuye un tercio (0,31) al identificar cristales de muestras sin DMSO (ver **Tabla 5**).

Tabla 5. Análisis de la concordancia en identificación de cristales mediante Índice Kappa con la muestra de referencia, con y sin adición de DMSO.

		DMSO+			DMSO-		
		Observador 1			Observador 1		
		NO	UMS	PFCa	NO	UMS	PFCa
NO		12	0	0	11	0	1
UMS		0	8	0	1	7	0
PFCa		0	0	10	4	0	6

Índice Kappa observador 1: 1 Índice Kappa observador 1: 0,69

Solo se necesitaron entre 1-3 campos a observar para identificar cristales en la mayoría de las muestras. En el caso de los cristales de PFCa, solo en una ocasión se necesitaron de 7-9 campos para detectarlos. La concordancia en los campos a observar para detectar cristales se ve incrementada con la adición de DMSO (ver **Tabla 6**).

Tabla 6. Análisis de concordancia en identificación de cristales mediante Índice Kappa y campos necesarios con la muestra de referencia, con y sin adición de DMSO.

		DMSO+		DMSO-		
		UMS	PFCa	NO	UMS	PFCa
Campos 1-3	UMS	8	0	1	7	0
	PFCa	0	9	3	0	6
Campos 7-9	PFCa	0	1	1	0	0

Índice Kappa: 1,00 Índice Kappa: 0,62

En las muestras sin adición de DMSO el observador clasifica como muestras con 0 cristales algunas que sí los tienen, pasando desapercibidos sobre todo los cristales de PFCa. Al analizar el grado de acuerdo entre cuántos cristales hay por campo observado con respecto a la “muestra cero”, en muestras con y sin DMSO, es mayor en aquellas muestras con adición de DMSO (ver **Tabla 7**).

Tabla 7. Análisis de la concordancia mediante Índice Kappa de campos con identificación de cristales y muestra cero, con y sin adición de DMSO.

Cristales/campo		DMSO+		DMSO-		
		UMS	PFCa	NO	UMS	PFCa
1-5	UMS	2	0	0	2	0
	PFCa	0	2	2	0	0
5-10	UMS	1	0	0	1	0
>10	UMS	5	0	1	4	0
	PFCa	0	8	2	0	6

Índice Kappa: 1,00

Índice Kappa: 0,33

Por último, aun cuando el 100% de las alícuotas 0 mostraron vitalidad > 50%, ninguna muestra sin DMSO mostró vitalidad > 50%, frente al 76,6% de las muestras con DMSO.

4. DISCUSIÓN

El análisis de líquido sinovial (LS) mediante microscopía con luz simple y polarizada, constituye el método diagnóstico de referencia en las artritis por microcristales (36) y es un requisito para la obtención del título de Especialista en Reumatología.

A diferencia de las artritis sépticas, en las que la obtención y procesamiento del líquido sinovial debe realizarse de inmediato, en el análisis de cristales no constituye un requisito indispensable. Sin embargo, cuando la posibilidad de infección es baja, la identificación de cristales adquiere gran valor diagnóstico (37) (38).

El estudio de LS mediante microscopía de luz polarizada se inicia en 1961, con los trabajos de Daniel J. McCarty y Joseph Lee Hollander (39), quienes identifican cristales de urato monosódico monohidratado (UMS) en un 89% de las muestras de pacientes con artritis gotosa (40). Al comparar sus resultados con la microscopía de luz simple, observaron que el porcentaje de identificación positiva de cristales, era mayor utilizando microscopía de luz polarizada (40) (41).

Décadas más tarde, en 1995, el Colegio Americano de Reumatología estableció los criterios para el estudio del líquido sinovial (42). La detección de cristales de UMS es

más sencilla que la detección de cristales de PFCa, debido a que son más grandes y más intensamente refringentes (43, 44, 45). Pueden observarse dentro o fuera de las células de la serie blanca (leucocitos), en el líquido sinovial (39). Sin embargo, los cristales de PFCa son más difíciles de detectar ya que son pequeños, alargados, con débil o inexistente refringencia, y menores en número; favoreciendo que puedan pasar desapercibidos al observador (45), especialmente en presencia de detritus celulares. Su identificación requiere de más experiencia y pericia que para la identificación de cristales de UMS (39).

A pesar de constituir el patrón oro diagnóstico en las artritis por microcristales, y ser un procedimiento esencial en el diagnóstico de artritis de origen desconocido (10, 36, 46); la disponibilidad de microscopía de luz polarizada, para el análisis de líquido sinovial, no siempre es inmediata. Los pacientes suelen presentarse en el Servicio de Urgencias, donde no hay disponibilidad inmediata de microscopía de luz polarizada, ya que en ellos se prioriza descartar las artritis sépticas. A menudo, el líquido sinovial extraído se descarta, en vez de almacenarse o preservarse para análisis posteriores, perdiéndose la oportunidad de realizar una prueba diagnóstica (47).

La preservación de LS podría suponer una optimización en el diagnóstico de enfermedades, como la artritis gotosa, permitiendo un tratamiento precoz, ya que su persistencia se asocia al desarrollo de comorbilidades, como síndrome metabólico e insuficiencia renal crónica (48, 49). Por otro lado, la preservación de muestras permitiría realizar controles de calidad de muestras ya examinadas, que podrían corregir errores en el diagnóstico, y también cabría la posibilidad de utilizarlas en docencia.

La literatura publicada al respecto centra sus propuestas en la temperatura de almacenaje y el uso de anticoagulantes (heparina sódica) o quelantes de calcio (EDTA), como posibles protectores de la lisis celular, que se produce en los procesos de descongelación. A pesar de que el dimetilsulfóxido (DMSO) es ampliamente utilizado en Hematología para la criopreservación de los precursores hematopoyéticos, no hemos encontrado publicaciones que avalen su uso para la preservación de LS en el tiempo.

La primera vez que se describió la utilidad del DMSO, para prevenir el daño por congelación en células vivas, fue en el año 1959 por Lovelock y Bishop (51). Su predecesor en la materia fue el glicerol que, cuantificando el daño celular mediante la hemólisis de células de la serie roja, se vio que era capaz de prevenir la excesiva concentración de electrolitos y otras sustancias, que producen el daño durante la congelación. La propiedad protectora del glicerol, como de otros solutos neutros que se han utilizado en criopreservación (metanol, acetamida, monoacetato de glicerol); está limitada a que estas sustancias no sean tóxicas por sí mismas, tengan bajo peso molecular, sean hidrosolubles y capaces de atravesar membranas de células vivas. Es difícil que los compuestos cumplan todos estos requisitos, siendo el glicerol el que más se aproximaba a estas condiciones ideales. Sin embargo, algunas células son impermeables al glicerol; lo que hizo que se estudiase la posible función protectora del DMSO (50).

Con respecto al almacenamiento de las muestras, se ha publicado que a 4°C mejora la probabilidad de persistencia de los cristales y se reduce el riesgo de contaminación microbiológica, comparando con el almacenaje a temperatura ambiente (51, 52). Sin embargo, la temperatura que otorga mayor porcentaje de conservación de cristales en el LS es -20°C (53), por ello hemos conservado las muestras de nuestro estudio a esta temperatura. Con el paso del tiempo, sin la utilización de crioprotectores ni refrigeración de las muestras, se produce una degradación leucocitaria que supone la potencial alteración de los cristales presentes en el LS. Especialmente se produce en los de PFCa, ya que son susceptibles de ser degradados ex vivo por pirofosfatasa (5).

Esta variabilidad en los resultados de las publicaciones previas podría deberse a diferentes factores. Algunos de los estudios consultados presentan contaminación en el medio tras la descongelación y los observadores conocían previamente el cristal mayoritario en el LS (52), otros presentan una falta de claridad en la selección de sujetos a estudio e incertidumbre en el enmascaramiento (54). Aquellos con muestras pequeñas podrían aumentar el riesgo de sesgos en los resultados (52, 47, 53).

No podemos comparar nuestros resultados con los hallazgos de otros autores ya que no existe evidencia previa de la utilidad del DMSO en la criopreservación de muestras

de líquido sinovial, por lo que no dispusimos de estudios previos en los que basar el tamaño de muestra.

Una de las fortalezas de nuestro estudio es la aleatorización con ocultación de secuencia y la observación ciega de las muestras, con la intención de reducir al mínimo la posibilidad de sesgos. Ningún estudio previo ha empleado esta metodología, como ninguno ha considerado la carga de cristales (número de campos necesarios a observar y número de cristales por campo observado) como posible fuente de sesgo de resultados.

Se objetivaron diferencias significativas en las muestras con adición de DMSO, puesto que preservaban mejor tanto los contajes celulares, como la detección de cristales y su correcta identificación, que aquellas congeladas sin crioprotector. No obstante, se observa una pérdida de contajes celulares tras la descongelación de las muestras, en ambos observadores, con y sin adición de DMSO. Puede deberse a agregación a restos de fibrina, lisis celular o a factores asociados al proceso de congelación y descongelación. Sin embargo, esta pérdida es menor cuando se añade DMSO previamente, ya que disminuye la agregación celular y la actividad de la enzima fosfatasa alcalina leucocitaria (con actividad de pirofosfatasa) en el LS (52). Además, el DMSO previene la deshidratación que se produce en las células al descongelarse y la lisis celular correspondiente (26, 27, 28). De hecho, hemos observado que la criopreservación con DMSO mantuvo aceptablemente la vitalidad celular tras la descongelación, lo que no se observó en ninguna de las muestras sin DMSO.

Por otro lado, los investigadores, sin consideración a priori, detectaban diferencias en la calidad aparente de las muestras, siendo capaces de diferenciar aquellas con adición de DMSO, ya que parecían mejor conservadas.

Como hemos mencionado previamente, la identificación de los cristales de PFCa, es más complicada que la de los cristales de UMS. La adición de DMSO mejora la identificación de ambos tipos de cristales (UMS y PFCa) en las muestras. En nuestros resultados, se observa que aparecen falsos positivos y falsos negativos en las identificaciones de PFCa sin adición de DMSO, en mayor medida que en los cristales de UMS. Incluso en aquellos casos en los que hay más carga de cristales, la visualización de cristales de PFCa es más dificultosa sin la adición de DMSO.

Con respecto a la experiencia de los observadores, Pascual et al mencionan en su estudio que un entrenamiento breve resulta en un análisis de LS de bastante consistencia (5, 55, 56). Sin embargo, nuestros resultados demuestran una menor correlación intraclase entre el observador senior y el observador junior tras un corto periodo de formación (ver **Tabla 3**). La experiencia en el análisis de muestras de LS es esencial para la correcta realización de dicho procedimiento. Aún así, la adición de DMSO mejoró la fiabilidad de este último observador.

Una limitación a considerar en este estudio fue su realización en un entorno asistencial (despacho de Consulta Externa) del servicio de Reumatología del Hospital de Cruces, en la que se obtuvieron, procesaron y analizaron las muestras. La ausencia del entorno adecuado de un laboratorio y sus medios para realizar la manipulación de las muestras con mayor precisión, podrían haber influido en los resultados obtenidos.

5. CONCLUSIONES

- La adición de dimetilsulfóxido al 10% a las muestras de líquido sinovial, antes de criopreservarlas, permite un aceptable recuento celular y unas correctas detección e identificación de cristales, tanto de urato monosódico monohidratado como de pirofosfato cálcico dihidratado.
- La ausencia de criopreservante conduce a falsos negativos en la detección y errores en la identificación de cristales en las muestras de líquido sinovial.
- La limitación que podría atribuirse a una menor experiencia en la técnica puede reducirse mediante la criopreservación de las muestras con dimetilsulfóxido.

NOTA

Este estudio de investigación ha sido pre-evaluado por David Gray, Editor Jefe de Rheumatology & Therapy (indexada en PubMed, impacto 3,6) como de interés para su publicación OpenAccess en caso de obtener visto bueno definitivo de los revisores. Su correspondencia se acompaña como documento anexo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Mow V, Wang CC-B. Some Bioengineering Considerations for Tissue Engineering of Articular Cartilage. *Clin Orthop*. 1990 (367S): 204-223.
- (2) Seyedin SM, Rosen DM. Matrix proteins of the skeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1990; 2 (5): 914-19.
- (3) SemFYC. Aparato locomotor: Exploraciones complementarias en Atención Primaria. Barcelona: Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria. 2007. Disponible en: www.semfyec.es
- (4) Courtney P, Doherty M. Joint aspiration and injection and synovial fluid analysis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2013; 27 (2): 137-69.
- (5) Pascual E, Sivera F, Andrés M. Synovial fluid analysis for crystals: *Curr Opin Rheumatol*. 2011;1.
- (6) Cretu D, Diamandis EP, Chandran V. Delineating the synovial fluid proteome: Recent advancements and ongoing challenges in biomarker research. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013.
- (7) Hueber W, Robinson WH. Proteomic biomarkers for autoimmune disease. 2006; 6.
- (8) Zhang W, Doherty M, Pascual E, et al. EULAR evidence based recommendations for gout Part I. Diagnosis. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for international clinical studies including therapeutics (ESCSIT). *Ann Rheum Dis*. 2006; 65: 1301–11.
- (9) Dieppe P, Swan A. Identification of crystals in synovial fluid. *Ann Rheum Dis*. 1999; 58: 261- 3.
- (10) Pastor S, Bernal J-A, Caño R, Gómez-Sabater S, Borrás F, Andrés M. Persistence of Crystals in Stored Synovial Fluid Samples. *J Rheumatol*. 2020; 47(9): 1416-23.
- (11) Andrés M, Vela P, Jovaní V, Pascual E. Most needle-shaped calcium pyrophosphate crystals lack birefringence. *Rheumatology (Oxford)*. 2019; 58: 1095-8.

- (12) Montagna P, Brizzolara R, Ferrone C, Cutolo M, Paolino S, Cimmino MA. A method for counting monosodium urate crystals in synovial fluid. *Reumatismo* [Internet]. 2015 [consulta 3/01/2021]; 67(1). Disponible en: <http://www.reumatismo.org/index.php/reuma/article/view/827>
- (13) Graf SW, Buchbinder R, Zochling J, Whittle SL. The accuracy of methods for urate crystal detection in synovial fluid and the effect of sample handling: A systematic review. *Clin Rheumatol*. 2013; 32(2): 225-32.
- (14) ACR. Core curriculum outline for rheumatology fellowship programs [Internet]. 2015. [consulta 2/01/2021]. Disponible en: https://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/Core%20Curriculum%20Outline_2015.pdf
- (15) Wallace SL, Robinson H, Masi AT, Decker JL, McCarty DJ and Yü TF: Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis Rheum*. 1977; 20: 895-900.
- (16) Chen LX and Schumacher HR: Current trends in crystal identification. *Curr Opin Rheumatol*. 2006; 18: 171-173.
- (17) Pérez Ruiz F, Sanchez-Piedra CA, Sanchez-Costa JT, Andrés M, Diaz-Torne C, Jimenez-Palop M, et al. Improvement in Diagnosis and Treat-to-Target Management of Hyperuricemia in Gout: Results from the GEMA-2 Transversal Study on Practice. *Rheumatol Ther*. 2018; 5:243-53.
- (18) Roddy E, Packham J, Obrenovic K, Rivett A, Ledingham JM. Management of gout by UK rheumatologists: a British Society for Rheumatology national audit. *Rheumatology* (Oxford). 2018; 57: 826-30.
- (19) Kienhorst LBE, Janssens HJEM, Eijgelaar RS, Radstake TRDJ, van Riel PLCM, Janssen M. The detection of monosodium urate crystals in synovial fluid after long-term and varying storage conditions. *Joint Bone Spine*. 2015; 82(6): 470-1.
- (20) Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant*. 2014; 49(4): 469-76.

- (21) Hughes SM, Ferre AL, Yandura SE, Shetler C, Baker CAR, Calienes F, et al. Cryopreservation of human mucosal tissues. *Jaspan HB, editor. PLOS ONE.* 2018; 13(7): e0200653.
- (22) Stock W, Pinseel E, De Decker S, Sefbom J, Blommaert L, Chepurnova O, et al. Expanding the toolbox for cryopreservation of marine and freshwater diatoms. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 4279.
- (23) Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature.* 1959; 183:1394–5.
- (24) Rowley SD. Hematopoietic stem cell cryo- preservation: a review of current techniques. *J Hematother.* 1992; 1(3): 233–50.
- (25) Hornberger K, Yu G, McKenna D, Hubel A. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emerging Assays, Cryoprotectant Agents, and Technology to Improve Outcomes. *Transfus Med Hemotherapy.* 2019; 46(3): 188-96.
- (26) J.E. Lovelock. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing, *Biochim. Biophys.* 1953. 11; 28–36.
- (27) H.T. Meryman, Cryoprotective agents, *Cryobiology.* 1971; 8: 173–183.
- (28) H.T. Meryman, R.J. Williams, M.S.J. Douglas, Freezing injury from “Solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection, *Cryobiology.* 1977; 14: 287–302.
- (29) Li R, Johnson R, Yu G, Mckenna DH, Hubel A. Preservation of cell-based immunotherapies for clinical trials. *Cytotherapy.* 2019; 21(9): 943-57.
- (30) Wohnhaas CT, Leparac GG, Fernandez-Albert F, Kind D, Gantner F, Viollet C, et al. DMSO cryopreservation is the method of choice to preserve cells for droplet-based single-cell RNA sequencing. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 10699.
- (31) Hoang BX, Hoang HQ, Han B. Zinc Iodide in combination with Dimethyl Sulfoxide for treatment of SARS-CoV-2 and other viral infections. *Med Hypotheses.* 2020; 143: 109866.

- (32) Pérez-Ruiz F, Castillo E, Chinchilla SP, Herrero-Beites AM. Clinical Manifestations and Diagnosis of Gout. *Rheum Dis Clin N Am*. 2014; 40(2): 193-206.
- (33) Linshaw MA, Bauman CA, Welling LW. Use of trypan blue for identifying early proximal convoluted tubules. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 1 de agosto de 1986;251(2): F214-9.
- (34) Pappenhei AN. The reactions of lymphocytes under various experimental conditions. *Junio*. 1917;18: 633-650.
- (35) Merck M, KGaA. Microscopía. Azul de tripán (C.I. 23850) para microscopía. 1.11732.0025. 2017. Darmstad. Alemania.
- (36) Zhang W. EULAR evidence based recommendations for gout. Part I: Diagnosis. Report of a task force of the standing committee for international clinical studies including therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 28 de marzo de 2006;65(10):1301-11
- (37) Coakley G, Mathews C, Field M, Jones A, Kingsley G, Walker D, et al. BSR & BHPR, BOA, RCGP and BSAC guidelines for management of the hot swollen joint in adults. *Rheumatology*. 1 de agosto de 2006;45(8):1039-41.
- (38) Reed MJ, Carachi A. Management of the nontraumatic hot swollen joint: *Eur J Emerg Med*. abril de 2012;19(2):103-7.
- (39) Martínez-Castillo A, Núñez C, Cabiedes J. Análisis de líquido sinovial. *Reumatol Clínica*. noviembre de 2010;6(6):316-21.
- (40) Mccarty DJ. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. 1961;54(3):9.
- (41) Kohn NN. The Significance of Calcium Phosphate Crystals in the Synovial Fluid of Arthritic Patients: The «Pseudogout Syndrome». *Intern Med*. 1962;56(5):8.
- (42) Gatter RA, Andrews RP, Cooley DA, Fiechtner JJ, Minna DA, Phelps P, et al. American College of Rheumatology Guidelines for Performing Office Synovial Fluid Examinations: *JCR J Clin Rheumatol*. junio de 1995;1(3):194-6.
- (43) Loeb JN. The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. *Arthritis Rheum*. marzo de 1972;15(2):189-92.
- (44) Gordon C, Swan A, Dieppe P. Detection of crystals in synovial fluids by light microscopy: sensitivity and reliability. *Ann Rheum Dis*. 1 de septiembre de 1989;48(9):737-42.

- (45) Swan A, Chapman B, Heap P, Seward H, Dieppe P. Submicroscopic crystals in osteoarthritic synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 1 de julio de 1994;53(7):467-70.
- (46) Landewé RBM, Günther KP, Lukas C, Braun J, Combe B, Conaghan PG, et al. EULAR/EFORT recommendations for the diagnosis and initial management of patients with acute or recent onset swelling of the knee. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:12-19.
- (47) Tausche A-K, Gehrish S, Panzner I, Winzer M, Range U, Bornstein SR, et al. A 3-Day Delay in Synovial Fluid Crystal Identification Did Not Hinder the Reliable Detection of Monosodium Urate and Calcium Pyrophosphate Crystals: *J Clin Rheumatol.* agosto de 2013;19(5):241-5.
- (48) Janssens H, van de Lisdonk E, Bor H, van den Hoogen H, Janssen M. Gout, just a nasty event or a cardiovascular signal? A study from primary care. *Fam Pract.* agosto de 2003;20(4):413-6.
- (49) Mikuls TR. Gout epidemiology: results from the UK General Practice Research Database, 1990-1999. *Ann Rheum Dis.* 1 de febrero de 2005;64(2):267-72.
- (50) Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature.* mayo de 1959;183(4672):1394-5.
- (51) Kerolus G, Clayburne G, Schumacher HR. Is it mandatory to examine synovial fluids promptly after arthrocentesis? *Arthritis Rheum.* marzo de 1989;32(3):271-8.
- (52) McGill NW, Swan A, Dieppe PA. Survival of calcium pyrophosphate crystals in stored synovial fluids. *Ann Rheum Dis.* 1 de diciembre de 1991;50(12):939-41.
- (53) Kienhorst LBE, Janssens HJEM, Eijgelaar RS, Radstake TRDJ, van Riel PLCM, Janssen M. The detection of monosodium urate crystals in synovial fluid after long-term and varying storage conditions. *Joint Bone Spine.* diciembre de 2015;82(6):470-1.
- (54) Freemont AJ, Denton J. *Atlas of Synovial Fluid Cytopathology* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1991 [citado 14 de marzo de 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/978-94-011-3828-4>
- (55) Lumbreras B, Pascual E, Frasquet J, et al. Analysis for crystals in synovial fluid: training of the analysts results in high consistency. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:612 – 615.

- (56) Tausche A-K, Gehrisch S, Panzner I, Winzer M, Range U, Bornstein SR, et al. A 3-Day Delay in Synovial Fluid Crystal Identification Did Not Hinder the Reliable Detection of Monosodium Urate and Calcium Pyrophosphate Crystals: *J Clin Rheumatol.* agosto de 2013;19(5):241-5.
- (57) Pascual E, Tovar J, Ruiz MT. The ordinary light microscope: an appropriate tool for provisional detection and identification of crystals in synovial fluid. *Ann Rheum Dis.* 1989;48:983-985.
- (58) Bernal JA, Andrés M, López-Salguero S, Jovaní V, Vela P, Pascual E. Compensated polarized microscopy for crystal identification shows high reliability among multiple observers. 2017; 1132.