

Estudio de regiones génicas relacionadas con el estrés oxidativo. Papel en la artrosis

Autora:

Estefanía Cortés Pereira

Tesis doctoral UDC 2017

Directores:

Dr. Francisco Javier Blanco García y el Dr. Ignacio Rego Pérez

Tutor:

Isaac Manuel Fuentes Boquete

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dr. Francisco J. Blanco García y el Dr. Ignacio Rego Pérez, directores de esta tesis doctoral

Dr. Isaac Manuel Fuentes Boquete

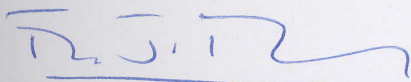
CERTIFICAN:

Que la presente memoria de tesis titulada **“Estudio de rexións xénicas relacionadas co estrés oxidativo. Papel na artrose”**, presentada por Doña **Estefanía Cortés Pereira**, para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el INIBIC, dentro del grupo de Reumatología. La tesis ha sido revisada y está en disposición de ser presentada para optar al grado de Doctor

de A Coruña, y reúne las condiciones de originalidad y rigor científico para optar al

Para que así conste, firman el presente certificado

A Coruña, a 7 de Abril de 2017



Fdo. Dr. Francisco J. Blanco García



Fdo. Dr. Ignacio Rego Pérez

Fdo. Dr. Isaac Manuel Fuentes Boquete

Dr. Isaac Manuel Fuentes Boquete

CERTIFICA:

Que el presente trabajo que lleva por título **“Estudio de rexións xénicas relacionadas co estrés oxidativo. Papel na artrose”** fue realizado por **Estefanía Cortés Pereira**, bajo mi tutela desde el Departamento de Medicina de la Universidad de A Coruña, y reúne las condiciones de originalidad y rigor científico para optar al grado de doctor en Ciencias de la Salud.

A Coruña, a 7 de Abril de 2017


Fdo. Dr. Isaac Manuel Fuentes Boquete

Ós meus pais
A Toño

AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer cuando me embarqué en esta nueva aventura de la tesis doctoral, esta aventura llena de encrucijadas y piedras en el camino, que al final he conseguido sortear hasta llegar al destino. Un camino lleno de buenos momentos (que hacen olvidar los malos tragos), de buenas experiencias, mucho trabajo y esfuerzo que ha hecho posible que hoy deposite este trabajo. Un logro que no alcanzaría sin la ayuda y apoyo de muchas personas y como bien dice el refrán, “es de bien nacidos, ser agradecidos”, por tanto considero que es mi obligación dedicarles unas líneas a todas aquellas personas que han contribuido en mayor o menor medida a que alcanzara esta meta.

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis los doctores Francisco Blanco e Ignacio Rego y a mi tutor Isaac Fuentes, por haber dirigido este trabajo durante estos años. En especial quisiera agradecer al doctor Francisco Blanco el haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo en su grupo y al Dr. Ignacio Rego por el entusiasmo puesto en este trabajo y apoyo. Al grupo de genómica, por haberme acogido tan cariñosamente y hacerme un hueco en sus vidas, han sido muchos días de risas, trabajo, riñas, comidas, cafés y en definitiva experiencias que han dejado mella en mi memoria. Gracias a Merce, por no dejarme ser “un pulpo en un garaje”, sus preguntas quisquillosas, su gran capacidad resolutoria y preocupación. A Sara por su apoyo, disposición y sabiduría técnica, a Ángel por encontrarle a todo doble sentido y alegrar las jornadas de trabajo y a Andrea por sus ansias de aprender y saber. A María, por enseñarme que hay vida más allá del laboratorio, mi compañera de verbenas, aventuras, batallas, risas y lágrimas y apoyo incondicional, a Juanillo por ser mi “patrón” en este viaje, sus ganas de enseñar, su confianza y manejo de la bioinformática.

Gracias a todos los compañeros del INIBIC (los que están, los que emigraron y las nuevas incorporaciones) por hacerme parte de esta gran familia. Al grupo de inflamación (Carlos, Romina, Noa, Laura, Olalla y Jenny) por quererme tal como soy, por cafés y comidas diferentes y compartir más que una poyata. Al grupo de oncología (Moises, Mar, Isa, Tere y Raquel) por soportarme y alegrarme días difíciles, a Mar por sus ganas de luchar, a Raquel por su “fé”, trucos y preocupación y a Isa por sus consejos “meramente” técnicos. Al grupo de Virología, Biología del cartílago, Cellcom y Microbiología por su compañerismo, simpatía y atención.

Al grupo de reumatología, en especial al equipo clínico por ser la cara amable de la investigación, al grupo de Proteómica por ser unos grandes compañeros

de reuniones y de trabajo, en especial a las “Antoñitas” (Carolina, Lucía, Valentina, Bea y Patri), Jesus por sus consejos proteómicos y Lucia G y Maria Camacho por su forma de ver la vida. Al grupo de Terapia celular en especial a Tamara por adoptarme y darme consejos y collejas cuando los necesitaba, a Clara por hacerme entender el mérito de mi trabajo, a Mariajo por sus consejos y cariño, a Emma por animarme en los momentos difíciles, a Angie por ser la guinda del pastel y a Rocío por su alegría. Al grupo de Endocrinología (Susana, Paula y Bárbara) y a las integrantes del Biobanco por su ayuda y simpatía. A la plataforma de Histomorfología (Pury y Noa), a los integrantes de la Fundación Profesor Novoa Santos, a Fany, por resolver todos los problemas burocráticos con una sonrisa y ser mi tocaya, y a Bego por su paciencia, eficiencia y dedicación. No quiero olvidarme tampoco de todos los estudiantes de prácticas, a los que espero haberles sido útil y a las niñas del máster Aida, Nerea, Esther y en especial a Lidia, por su compañerismo, por todas las horas de trabajo, estudio y risas. Y también de las compañeras de grupo que han estado de estancia como Nancy, Maylin y Sara Cheleschi, que también han aportado su granito de arena en este trabajo.

Por último, aunque no menos importante, quisiera agradecer a mi familia por su apoyo y amor incondicional, a la que me gustaría dedicarle este trabajo en especial a todos aquellos que por desgracia no pueden leerla. A mis padres por dedicarme su vida, hacerme ser quien soy, permitirme cumplir mis sueños y que sin su esfuerzo, trabajo y dedicación no habría logrado llegar hasta aquí. A Toño por su amor infinito, aguantarme todos estos años, ser mi amigo, confidente, mi otra mitad y mostrarme que todo esfuerzo tiene recompensa. A mis medio hermanos Nacho, Belén, Marcos, Marquiños y Sofía, porque juntos hemos conseguido reponernos de los golpes de la vida, por cuidarme y por sentirse orgullosos de mi. A mis amigas de siempre, Dolo, Clara, Lucia y Ana, por tantos años de amistad, cariño y por estar siempre ahí, a mi grupo de amigos Junior, María, Clara, Segade, Sebas... por todos los buenos momentos y el tiempo que han compartido conmigo y a mis antiguos compañeros de Vigo, Almu y Siño por su amistad y cariño y que a pesar de los años y la distancia, siempre hay un punto intermedio para encontrarnos.

En definitiva a todas las personas que han formado parte de mi vida y me han ayudado a alcanzar esta meta.

GRACIAS!!!

ÍNDICE

Índice

ÍNDICE	XI
LISTADO DE ABREVIATURAS	XVI
LISTADO DE FIGURAS	XXVII
LISTADO DE TABLAS	XXXI
RESUMEN.....	XXXV
RESUMEN.....	XXXVII
RESUMO	XXXIX
ABSTRACT.....	XLI

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA ARTROSIS	3
1.1.1 <i>Definición</i>	3
1.1.2 <i>Estructura de la articulación</i>	4
1.1.3 <i>Cartílago articular</i>	4
1.2 CLASIFICACIÓN DE LA ARTROSIS	7
1.2.1 <i>Clasificación de la artrosis por criterios radiográficos</i>	7
1.2.2 <i>Clasificación sintomática</i>	9
1.2.3 <i>Clasificación clínica</i>	9
1.3 PREVALENCIA DE LA ARTROSIS	10
1.4 ASPECTOS SOCIO-ECONÓMICOS DE LA ARTROSIS.....	11
1.4.1 <i>Factores implicados en el desarrollo de la artrosis</i>	12
1.4.1.1 Factores no modificables	12
i. La edad	12
i. El sexo	12
ii. La etnia	13
iii. La genética.....	14
1.4.1.1.1. Factores modificables	23
i. Obesidad	23
ii. Ocupación laboral	23
iii. Hábito tabáquico	24
iv. Deporte.....	24
v. Factores hormonales	25
1.5 EL ESTRÉS OXIDATIVO	25
1.5.1 <i>Relevancia del estrés oxidativo en la artrosis</i>	26
1.5.2 <i>El óxido Nítrico</i>	28
1.5.3 <i>La mitocondria y el estrés oxidativo</i>	29
1.5.4 <i>La mitocondria en la artrosis</i>	31
1.5.5 <i>Haplogrupos mitocondriales</i>	33
1.5.6 <i>Interacciones mitocondria-núcleo</i>	40
1.6 EPIGENÉTICA	46
1.6.1 <i>Mecanismos epigenéticos</i>	46
1.6.2 <i>Modificación post-transcripcional de histonas</i>	46
1.1.1.2. <i>ARN no codificante</i>	48

1.6.3	<i>La metilación del ADN</i>	49
1.6.4	<i>Impacto de la mitocondria en la metilación del ADN</i>	51
CAPÍTULO 2		
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS		57
2.1	JUSTIFICACIÓN	59
2.2	OBJETIVOS.....	61
CAPÍTULO 3		
MATERIAL Y MÉTODOS		63
3.1	INTRODUCCIÓN DEL ANÁLISIS DE DATOS DEL ARRAY DE METILACIÓN.....	65
3.1.1	<i>Análisis de datos de metilación</i>	66
3.1.2	<i>Búsqueda de genes diferencialmente metilados relacionados con el estrés oxidativo</i>	67
3.1.3	<i>Selección de genes diferencialmente metilados como nuevas dianas en artrosis</i>	68
3.1.4	<i>Procesamiento de muestras de cartílago</i>	69
3.1.4.1	Origen y procesamiento de las muestras de cadera	69
3.1.4.2	Origen y procesamiento de las muestras de rodilla.....	69
3.1.5	<i>Cultivo de condrocitos y estimulación con IL1-β</i>	70
3.1.6	<i>Extracción de ARN</i>	71
3.1.6.1	A partir de tejido	71
3.1.6.2	A partir de células en cultivo.....	73
3.1.6.3	Cuantificación del ARN por espectrofotometría.....	73
3.1.7	<i>Análisis de la calidad del ARN</i>	74
3.1.8	<i>Ensayo de expresión por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real</i>	74
3.1.9	<i>Genes relacionados con el estrés oxidativo. Validación en cartílago de rodilla</i>	76
3.1.10	<i>Nuevos genes en artrosis. Análisis de expresión en una cohorte de cadera</i>	77
3.1.11	<i>Análisis de la expresión génica</i>	77
3.2	ANÁLISIS DE LOS DATOS DE METILACIÓN EN FUNCIÓN DE LOS HAPLOGRUPOS	78
3.2.1	<i>Análisis de los procesos biológicos. DAVID</i>	78
3.2.2	<i>Obtención de muestras de cartílago y extracción de ARN</i>	78
3.2.3	<i>Estudio de validación por RNA-Seq</i>	79
3.2.4	<i>Análisis de los datos del RNA-Seq</i>	82
3.2.4.1	Análisis de expresión diferencial	83
3.3	PROPUESTA Y JUSTIFICACIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS Y SUS POLIMORFISMOS..	84
3.3.1	<i>Cohorte de pacientes y controles del estudio epidemiológico. Descripción</i>	85
3.3.2	<i>Cohortes de validación. Descripción</i>	86
3.3.2.1	Cohorte Santiago	86
3.3.2.2	Cohorte del OAI.....	86
3.3.3	<i>Extracción de ADN</i>	87
3.3.3.1	A partir de sangre	87

3.3.3.2	A partir de tejido	87
3.3.3.3	A partir de pellet celular de condrocitos	88
3.3.4	<i>Técnicas de genotipado de los diferentes polimorfismos estudiados</i>	88
3.3.4.1	Single Base Extension (SBE)	88
3.3.4.2	Electroforesis capilar empleando cebadores marcados	91
3.3.4.3	Asignación de los haplogrupos mitocondriales	92
3.3.5	<i>Estudio funcional</i>	95
3.3.5.1	Justificación de las dos fuentes de carbono	95
3.3.5.2	Producción de ROS por citometría de flujo	97
3.3.5.3	Determinación de NO por medio del reactivo de Griess	98
3.3.6	<i>Análisis estadístico de los datos</i>	99
3.3.6.1	Estudio epidemiológico de asociación a nivel de clusters mitocondriales y polimorfismos relacionados con el estrés oxidativo	99
3.3.6.2	Estudio de las interacciones entre los clusters mitocondriales y los polimorfismos nucleares relacionados con el estrés oxidativo	100
3.3.6.3	Estudio funcional	100

CAPÍTULO 4

RESULTADOS..... 103

OBJETIVO 1: IDENTIFICAR REGIONES GÉNICAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO POR MEDIO DE ESTUDIOS EPIGENÉTICOS EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR

4.1	GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO	105
4.1.1	<i>Validación por expresión génica</i>	111
4.1.1.1	Análisis de la expresión génica de los genes relacionados con el estrés oxidativo ...	112
4.1.2	<i>Identificación de nuevas regiones génicas relacionadas con la artrosis mediante el estudio de metilación</i>	113
4.1.2.1	Validación por expresión génica en una cohorte de pacientes de artrosis	114
4.1.2.2	Expresión en tejido	115
4.1.2.3	Expresión en cultivo celular primario de condrocitos estimulados con IL1- β	115
4.1.3	<i>Resumen de resultados</i>	116

OBJETIVO 2: DETERMINAR LA INFLUENCIA DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES, COMO AGENTES REGULADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO, EN EL METILOMA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.

4.2	ANÁLISIS JERÁRQUICO POR HAPLOGRUPOS.....	118
4.2.1	<i>Listado de genes diferencialmente metilados entre el haplogrupo H y el haplogrupo J</i>	119
4.2.2	<i>Análisis de los Procesos alterados en función de los genes diferencialmente metilados entre los haplogrupos H y J</i>	122
4.2.3	<i>Análisis de la expresión diferencial por RNA-Seq</i>	124
4.2.3.1	Expresión diferencial basada en haplogrupos	126
4.2.3.1.1	Análisis de los procesos alterados en función de los genes diferencialmente expresados por haplogrupo mitocondrial	129
4.2.3.1.2	Análisis de correlación entre metilación y expresión a nivel de los haplogrupos mitocondriales H y J	132
4.2.4	<i>Resumen de resultados</i>	132

OBJETIVO 3: EXPLORAR EL PAPEL EN LA ARTROSIS DE LAS INTERACCIONES MITOCONDRIA-NÚCLEO A NIVEL DE GENES RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

4.3	DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE PROCOAC	134
4.3.1	<i>Estudio de replicación de la asociación de los haplogrupos mitocondriales con la artrosis de cadera en la cohorte PROCOAC</i>	135
4.3.1.1	Estudio de asociación de los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la detoxificación celular en la cohorte PROCOAC	136
4.3.1.1.1	Según su genotipo dominante	136
4.3.1.1.2	Según su genotipo recesivo	138
4.3.1.1.3	Según su genotipo homocigoto	140
4.3.1.1.4	Estudio de asociación del microsatélite del gen NOS2A en la cohorte PROCOAC.	142
4.3.1.2	Estudio de asociación de las interacciones entre los clusters mitocondriales y los polimorfismos nucleares analizados en la cohorte PROCOAC	146
4.3.1.2.1	Interacciones entre los clusters mitocondriales y los genotipos en su forma dominante	147
4.3.1.2.2	Interacciones de los clusters de haplogrupos y los genotipos en su forma recesiva.	149
4.3.1.2.3	Interacciones de los clusters de haplogrupos y los genotipos en su condición de homocigoto	153
4.3.2	<i>Estudio epidemiológico de replicación</i>	157
4.3.2.1	Cohorte de cadera de Santiago	157
4.3.2.2	Estudio de replicación de la asociación de los haplogrupos mitocondriales con la artrosis de cadera en la cohorte Santiago.....	157
4.3.2.2.1	Estudio de asociación de los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la detoxificación celular en la cohorte Santiago.....	158
4.3.2.2.2	Estudio de asociación del microsatélite del gen NOS2A en la cohorte de Santiago	159
4.3.2.3	Estudio de asociación de las interacciones entre los clusters mitocondriales y los polimorfismos nucleares analizados en la cohorte de Santiago.....	164
4.3.2.3.1	Interacciones entre los clusters mitocondriales y los genotipos del polimorfismo rs1050450 del gen GPX1 y rs1001179 del gen CAT en su forma dominante	164
4.3.2.3.2	Interacciones entre los clusters mitocondriales y los genotipos del polimorfismo rs1050450 del gen GPX1 y rs1001179 del gen CAT en su forma recesiva	166
4.3.2.3.3	Interacciones entre los clusters mitocondriales y los genotipos del polimorfismo rs1050450 del gen GPX1 y rs1001179 del gen CAT en su forma homocigota.....	167
4.3.2.4	Cohorte de rodilla del OAI	168
4.3.2.4.1	Estudio de replicación de la asociación de los haplogrupos mitocondriales con la artrosis de rodilla en la cohorte del OAI	169
4.3.2.4.2	Estudio de asociación de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 en la cohorte del OAI	170
4.3.2.4.3	Estudio de asociación del microsatélite del gen NOS2A en la cohorte del OAI	170
4.3.2.4.4	Estudio de asociación de las interacciones entre los clusters mitocondriales de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 en la cohorte del OAI	174
4.3.3	<i>Estudio funcional en la cohorte PROCOAC. Producción de ROS</i>	179
4.3.3.1.1	Análisis de la producción de ROS en función del diagnóstico.....	180
4.3.3.1.2	Análisis de la producción de ROS En función de los distintos genotipos del polimorfismo rs1001179 del gen CAT	180
4.3.3.1.3	Análisis de la producción de ROS En función de la interacción de los clusters mitocondriales con los distintos genotipos del polimorfismo rs1050450 de GPX1	181
4.3.3.2	Producción de NO	182
4.3.3.2.1	Análisis de la producción de NO En función del diagnóstico.....	183

4.3.3.2.2	Análisis de la producción de NO En función de los alelos de 11 y 13 repeticiones del microsatélite de NOS2A	184
4.3.3.2.3	Análisis de la producción de NO En función de los genotipos del microsatélite del gen NOS2A	185
4.4	RESUMEN DE LOS RESULTADOS.....	186
CAPÍTULO 5		
DISCUSIÓN		189
5.1	OBJETIVO 1: IDENTIFICAR REGIONES GÉNICAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO POR MEDIO DE ESTUDIOS EPIGENÉTICOS EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR	
5.1.1	<i>Genes diferencialmente metilados relacionados con el estrés oxidativo y su expresión génica.</i>	191
5.1.2	<i>Identificación de nuevas regiones génicas relacionadas con la artrosis mediante el estudio de metilación</i>	197
5.2	OBJETIVO 2: DETERMINAR LA INFLUENCIA DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES, COMO AGENTES REGULADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO, EN EL METILOMA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR	
5.2.1	<i>Impacto de los haplogrupos mitocondriales en el metiloma del cartílago ...</i>	201
5.2.2	<i>Análisis del transcriptoma del cartílago en los haplogrupos H y J</i>	205
5.3	OBJETIVO 3: EXPLORAR EL PAPEL EN LA ARTROSIS DE LAS INTERACCIONES MITOCONDRIA-NÚCLEO A NIVEL DE GENES RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO	
5.3.1	<i>Estudio de asociación de los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la detoxificación celular</i>	210
5.3.2	<i>Estudio de asociación de las interacciones entre los clusters mitocondriales y los polimorfismos nucleares y Estudio funcional</i>	212
CAPÍTULO 6		
CONCLUSIONES		221
6.1	CONCLUSIONES	223
CAPÍTULO 7		
BIBLIOGRAFÍA.....		225
7.1	BIBLIOGRAFÍA	227
ANEXO I.....		271
ANEXO II		281
ANEXO III		303
ANEXO IV		309

LISTADO DE ABREVIATURAS

3	
3-NT	
3- nitrotirosina.....	28
5	
5mC	
5-metilcitosina.....	49
A	
ACAN	
Agregano.....	49
acetil Co-A	
Acetil Coenzima A.....	52
ACL	
ATP-citrato liasa.....	52
ACR	
Del inglés, American College of Rheumatology.....	9
ACTN3	
alfa actinina 3.....	45
ADAMTS4	
Metalopeptidasa 4 con motivo de trombospondina tipo 1.....	50
ADAMTS5	
Desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina S5.....	49
ADN	
Ácido desorribonucleico.....	14
ADNc	
ADN complementario.....	74
ADNmt	
ADN mitocondrial.....	17
ADP	
Adenin difosfato.....	29
ALDH3B1	
familia de la aldehído deshidrogenasa 3 miembro B1.....	105
AMPc	
Adenin mono fosfato cíclico.....	193
APOE	
apolipoproteína E.....	105
ARN	
Ácido ribonucleico.....	33
ARNm	
ARN mensajero.....	80
ARNr	
ARN ribosómico.....	33
ARNt	
ARN de transferencia.....	33
AS	
Splicing alternativo.....	45

ATP	
Adenin Tri fosfato	25
<i>B</i>	
B	
Coeficiente de regresión.....	100
BBC3	
componente 3 de unión a BCL2	205
BCL	
base calls	81
BID	
dominio BH3 pro-apoptótico miembro de la familia BCL2	196
BMP	
Proteína morfogénicas del hueso.....	15
<i>C</i>	
Ca ⁺²	
Calcio	193
CASP8	
Caspasa 8	76
CD5	
glicoproteína expresada por los linfocitos T	206
CH ₃	
Grupo metilo.....	49
CHST11	
Sufotransferasa carboxilasa 11	16
CHUAC	
Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña	69
CHUS	
Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.....	86
CLUMPP	
del inglés, cluster matching and permutation	100
COL10A1	
Colágeno tipo X cadena alfa 1	51
COL11A1	
colágeno tipo XI cadena alfa 1	16
COL2A1	
Colágeno tipo II cadena alfa 1	47
COL9A1	
colágeno IX cadena alfa 1.....	51
COMP	
Proteína oligomérica de la matriz del cartílago.....	24
COX2	
ciclooxigenasa 2	16
Citocromo oxidasa 2.....	28
CpG	
Regiones ricas en citosinas y guanina unidas por un enlace fosfato	66
CRM	
cadena respiratoria mitocondrial	31

CTE	
Cadena de transporte de electrones de la mitocondria.....	29
CYGB	
citoglobina.....	105
CYTIP	
Proteína 1 de interacción con citohesinas.....	68
<i>D</i>	
DCFH	
Diclorodihidrofluoresceína.....	97
DCFH-DA	
diacetato de diclorodihidrofluoresceína.....	97
DM	
Diferencialmente metiladas.....	65
DMEM	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium.....	70
DMO	
Densidad mineral ósea.....	25
DNMT	
ADN metiltransferasas.....	49
dNTPs	
dinucleótidos.....	74
DOT1L	
Histona metiltransferasa de Lisina.....	17
DVWA	
Dominio del factor A doble Von Willebrand.....	16
<i>E</i>	
EDTA	
Ácido etilendiaminotetraacético.....	70
EGLN1	
del inglés, Egl-9 family hypoxia inducible factor 1.....	76
EMX1	
homeobox empty spiracles.....	132
EPISER	
prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española.....	10
escala K-L	
Escala radiográfica utilizada para clasificar la artrosis en 5 categorías, desarrollada por Kellgren y Lawrence.....	7
EULAR	
Del inglés, European League Against Rheumatism.....	3
<i>F</i>	
FADH ₂	
Dinucleótido de flavina y adenina.....	29
FRET	
Principio de transferencia de energía entre fluorocromos (del inglés, <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>).....	75
FUCA1	
fucosidasa α -L1.....	119

<i>G</i>	
GAGs	
Glucosaminoglicanos	5
GAL3	
galectina-3	205
GDF5	
Factor 5 de crecimiento de diferenciación	15
GMPc	
Guanosin monofosfato cíclico	28
GPR22	
Receptor 22 de proteína G acoplada	17
GPx	
Glutation Peroxidasas	30
GPX3	
Glutación peroxidasa 3	76
GSTP1	
glutación S-transferasa Pi 1	105
GTP	
Guanosin trifosfato	28
GWAS	
Estudio de asociación del genoma completo	14
<i>H</i>	
<i>h</i>	
horas	70
H ₂ O	
Fórmula química del agua	5
H3	
Histona 3	17
H3K4	
histona 3 metilada en la lisina 4	48
HAT	
Histonas acetiltransferasas	46
HDA	
Histonas desacetilasas	46
HDAC	
histonas desacetilasas clásicas	46
HIF	
Factor inducible de hipoxia	200
HIF-1 α	
Factor 1 inducible por hipoxia, subunidad 1 alfa	16
HMTs	
Histonas metil transferasas	48
HOXD3	
<i>homeobox D3</i>	119
HYAL2	
hialuronglucosaminidasa 2	105

I

I.C.

Intervalo de Confianza 100

IGFBP5

Proteína 5 de unión al factor de crecimiento de insulina 49

IL1- β

Citoquina inflamatoria, Interleuquina 1 beta..... 27

IL8

interleuquina 8..... 16

IMC

Índice de masa corporal 23

INE

Instituto Nacional de Estadística 11

INIBIC

Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña 69

iNOS

enzima óxido nítrico inducible..... 28

INS

Insulina 76

IPCEF1

proteína de interacción con factores de intercambio con citohesinas 1..... 76

J

JoCo OA

Proyecto de Estudio de la artrosis del Condado de Johnston 14

K

KCNIP4

proteína 4 de intracción con canal de voltaje de sodio..... 132

KYNU

Enzima quinureninasa 43

L

LAPTM4

Proteína transmembrana lisosomal 4..... 68

LAPTM5

Proteína transmembrana lisosomal 5..... 68

LDL

Grasas de baja densidad..... 69

LEP

Leptina 51

LGALS12

glectina 12..... 105

lncARNs

ARN largos no codificantes 48

M

MARCO

Receptor de macrófagos con estructura de cológeno..... 69

MBE	
Enzima mitocondrial bifuncional	52
MCF2L	
Secuencia de línea celular derivada de transformina	17
mg	
miligramos	70
MgCl ₂	
Cloruro de Magnesio	75
miARNs	
micro ARN	48
MitoSOX™	
<i>red mitochondrial superoxide indicator</i>	97
mL	
mililitros	70
MLLT11	
linaje mixto linfoide/mieloide translocado al 11	105
MMP13	
metaloproteinasa 13	15
MMPs	
metaloproteinasas	25
MPO	
mieloperoxidasa	105
MTHF	
Metileno tetrahidrofolato	52
MYT1L	
símil del factor de transcripción 1 de mielina	207
<i>N</i>	
NADH ⁺	
Dinucleótido reducido de nicotinamida y adenina	29
NAM	
Nicotinamida	43
NaOH	
Hidróxido de Sodio	81
ncARNs	
ARN no codificantes	48
NCBI	
Del inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i>	76
NFAT	
factor nuclear de células T activadas	206
NFAT1	
Factor nuclear 1 de activación de células T	47
NF-κB	
Factor nuclear kappa B subunidad 1	51
NO	
Óxido nítrico	28
NOS	
Enzima óxido nítrico sintasa	28
NOS2A	
Óxido nítrico sintasa 2 A	42

NRF1	
Factor respiratorio nuclear 1	53
NUMTs	
Secuencias mitocondriales nucleares.....	40
<i>O</i>	
O_2	
Oxígeno	26
O_2^-	
anión superóxido.....	26
OAI	
Osteoarthritis Initiative.....	38
OARSI	
Del inglés, Osteoarthritis Research Society	3
OGG1	
8-Oxoglicosilasa 1	85
ONOO ⁻	
Radical peroxinitrito.....	28
OOA	
Oxaloacetato	52
OR	
Odd Ratio	85
OXPPOS	
Fosforilación oxidativa mitocondrial	24
<i>P</i>	
PACER	
ARN extragénico COX2 asociado a p5	48
pb	
pares de bases.....	72
PBS	
Tampón fosfato salino.....	71
PCA	
Análisis de componentes principales	66
PCR	
reacción en cadena de la polimerasa.....	74
PDMs	
Péptidos derivados de mitocondrias.....	43
PGC1- α	
Receptor activado de proliferación de peroxisomas y coactivador alfa 1	53
PGE2	
Prostaglandina E2.....	28
PHLPP1	
Proteína fosfatasa 1 rica en repeticiones de leucina y dominio PH	51
P_i	
Fosfato.....	29
PI3K γ	
Quinasa del fosfatidil-Inositol 3 gamma	68

PKD2	
policistina 2.....	76
PLA2R1	
receptor 1 de fosfolipasa A2.....	105
PLEK	
Substrato de la quinasa C de plaquetas.....	68
Pol-γ	
Enzima nuclear polimerasa gamma.....	54
PRMTs	
proteína metiltransferasa de arginina.....	48
Prx	
Enzimas peroxiredoxinas.....	41
PTHLH	
precursor de la proteína relacionada con la hormona paratiroides.....	15
PTHrP	
Proteína relacionada con la hormona paratiroides.....	15
PYCR1	
pirrolina-5-carboxilato reductasa.....	76
R	
RIN	
del ingles, RNA Integrity Number, algoritmo creado para estimar la integridad de ARN total ...	
.....	74
RISC	
Complejo de inducción de silenciamiento.....	48
RNasas	
Ribonucleasas.....	71
RNase8	
RNasa 8.....	119
RNS	
Especies reactivas del nitrógeno.....	30
ROS	
Especies Reactivas de Oxígeno.....	25
RPL13A	
gen de referencia, proteína ribosomal L13A.....	76
rpm	
Revoluciones por minuto.....	71
RUNX2	
Regulador transcripcional runt factor 2.....	14
S	
SAM	
S- adenosilmetionina.....	49
SBF	
Suero Bovino Fetal.....	70
SCARA3	
receptor <i>scavenger</i> clase A miembro 3.....	76
SCN5A	
subunidad alfa 5 del canal mediado por voltaje de sodio.....	206

SELE	
selectina-E	205
Semergen	
Sociedad Española de médicos de atención primaria	11
SER	
Sociedad Española de Reumatología	10
SGC	
Guanilato ciclasa cíclica soluble	28
SHMT	
Serina hidroximetiltransferasa mitocondrial	52
SMAD3	
miembro 3 de la familia SMAD	15
sncARNs	
ARN pequeños no codificantes	48
SNP	
Polimorfismo de base única	16
SOD	
Superóxido Dismutasa	30
SOD2	
Superóxido dismutasa 2	26
SOST	
Esclerostina	51
SOX9	
<i>SRY-Box 9</i>	47
SPTA1	
espectrina	207
<i>T</i>	
TCA	
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos	29
TGF- β	
Factor de crecimiento transformina beta	15
TNF- α	
Factor de necrosis tumoral alfa	28
TPP ⁺	
Ión trifenilfosfonio	97
<i>U</i>	
UCP2	
Proteína desacoplante 2	84
UPL	
<i>del inglés, Universal ProbeLibrary Probes</i>	75
UPR ^{mt}	
Proteínas mitocondriales no empaquetadas	43
<i>V</i>	
valor B	
Estadístico que indica las probabilidades de que un gen esté diferencialmente metilado	67

valor-M	
valor para medir los niveles de metilación	66
VEGF	
factor de crecimiento del endotelio vascular	16
VNN1	
Vanina 1.....	105
W	
Wnt	
Vía de transducción de señales formada por proteínas que transfieren las señales extracelulares al interior celular	17
WNT7A	
perteneciente a la vía de señalización <i>wnt</i>	206
WRN	
helicasa del síndrome de Werner.....	105

LISTADO DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura de una articulación sinovial.</i>	4
<i>Figura 2. Imágenes histológicas de cartílago articular.</i>	5
<i>Figura 3. Estructura del cartílago articular que muestra las capas que lo componen principalmente, capa superficial, capa intermedia (zona de transición), capa profunda y hueso subcondral.</i>	6
<i>Figura 4. Esquema mostrando los distintos grados de afectación de artrosis de rodilla.</i>	8
<i>Figura 5. Esquema de los principales factores de riesgo asociados a la artrosis.</i>	13
<i>Figura 6. Polimorfismos asociados con el riesgo de artrosis.</i>	18
<i>Figura 7: Estructura y función de las mitocondrias.</i>	30
<i>Figura 8. Representación esquemática del genoma mitocondrial humano.</i>	34
<i>Figura 9. Distribución global de los haplogrupos.</i>	36
<i>Figura 10. Esquema de comunicaciones entre la mitocondria y el núcleo.</i>	42
<i>Figura 11. Modificaciones epigenéticas en citosina e histonas.</i>	47
<i>Figura 12. Metilación del ADN.</i>	50
<i>Figura 13: Señalización mitocondria-núcleo y epigenética.</i>	56
<i>Figura 14: Flujo de trabajo del RNA-Seq.</i>	81
<i>Figura 15. Ejemplo de un gráfico de Bruijn.</i>	82
<i>Figura 16. Esquema mostrando las diferencias entre deoxinucleótido normal (dNTP) y dideoxinucleótido terminador (ddNTP).</i>	89
<i>Figura 17. Electroferogramas de los haplogrupos de ADNmt Europeos más comunes.</i>	94
<i>Figura 18. Diagramas representativos del metabolismo de la Glucosa y la Galactosa (B).</i>	96
<i>Figura 19. Expresión génica relativa de los genes seleccionados para el estudio del estrés oxidativo entre controles sanos y pacientes.</i>	112
<i>Figura 20. Expresión génica relativa de los genes seleccionados entre controles sanos y pacientes.</i>	115
<i>Figura 21. Expresión génica promedio de los genes seleccionados en condrocitos de cultivo primario estimulados con IL1-β.</i>	116
<i>Figura 22. Análisis jerárquico de las 1.926 sondas diferencialmente metiladas entre los 3 haplogrupos mitocondriales (H, J y U).</i>	118
<i>Figura 23. Procesos biológicos significativamente alterados e hipometilados para el haplogrupo J, obtenidos tras la comparación de los patrones de metilación diferencial entre el haplogrupo H y J, junto con su enrichment score entre paréntesis.</i>	122

Figura 24. Procesos biológicos significativamente alterados e hipometilados para el haplogrupo H, obtenidos tras la comparación de los patrones de metilación diferencial entre el haplogrupo H y J, junto con su enrichment score entre paréntesis.	123
Figura 25. Niveles de calidad por base para la muestra 16SE0418.....	125
Figura 26. Gráfico de PCA de las diferentes muestras una vez realizada la cuantificación con kallisto.....	126
Figura 27. Volcano plot mostrando los genes diferencialmente expresados entre haplogrupos.	127
Figura 28. Heatmap de los 20 genes más significativos en la comparación Haplogrupo J - Haplogrupo H.....	129
Figura 29. Procesos biológicos significativamente alterados y sobre-expresados para el haplogrupo H, obtenidos tras la comparación de los patrones de metilación diferencial entre el haplogrupo H y J, junto con su enrichment score entre paréntesis.....	130
Figura 30. Procesos biológicos significativamente alterados y sobre-expresados para el haplogrupo J, obtenidos tras la comparación de los patrones de metilación diferencial entre el haplogrupo H y J, junto con su enrichment score entre paréntesis.....	131
Figura 31. Diagrama de Venn que representa la correlación entre los genes hipometilados y sobre-expresados en el haplogrupo J con respecto al H.....	132
Figura 32. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo rs1050450 de GPX1 en su forma dominante y su interacción con el cluster TJ estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC.	147
Figura 33. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo rs1050450 de GPX1 en su forma recesiva y su interacción con el cluster TJ estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC.....	150
Figura 34. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo rs1050450 de GPX1 en su forma recesiva y su interacción con el cluster HV estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC.....	151
Figura 35. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo rs1050450 de GPX1 en su forma homocigota y su interacción con el cluster TJ estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC.	154
Figura 36. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo rs1050450 de GPX1 en su forma homocigota y su interacción con el cluster HV estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC.....	154
Figura 37. Representación gráfica de las frecuencias de los genotipos del polimorfismo rs1050450 de GPX1 en su forma dominante y su interacción con el cluster TJ estratificado por su condición de sano o artrósico.	165
Figura 38. Representación gráfica de las frecuencias de los genotipos del polimorfismo rs1001179 de CAT en su forma dominante y su interacción con el cluster TJ estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte del OAI.....	175

<i>Figura 39. Representación gráfica de las frecuencias de los genotipos del polimorfismo rs1001179 de CAT en su forma dominante y su interacción con el cluster HV estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte del OAI.....</i>	<i>175</i>
<i>Figura 40. Representación de los valores promedio de producción de ROS totales y mitocondriales según su cultivo en medio con glucosa o galactosa.</i>	<i>179</i>
<i>Figura 41. Representación de los valores promedio de producción de ROS totales y mitocondriales, estratificado por su condición de sano o artrósico.</i>	<i>180</i>
<i>Figura 42. Representación de los valores promedio de producción de ROS totales y mitocondriales distribuidos por el genotipo del polimorfismo rs1001179 del gen CAT. A: cultivo en glucosa, B: cultivo en galactosa.</i>	<i>181</i>
<i>Figura 43. Representación de los valores promedio de producción de ROS totales y mitocondriales distribuidos por la interacción entre los clusters TJ y HV y el genotipo CC/CT del polimorfismo rs1050450 de GPX1. A: cultivo en glucosa, B: cultivo en galactosa.</i>	<i>182</i>
<i>Figura 44. Representación de los valores promedio (μM) de producción de NO en el cultivo con glucosa y galactosa.....</i>	<i>183</i>
<i>Figura 45. Producción media (μM) de NO en medios con glucosa y galactosa estratificados por el diagnóstico.....</i>	<i>184</i>
<i>Figura 46. Producción media (μM) de NO en función del número de repeticiones del microsatélite de NOS2A tras el cultivo de condrocitos en medio con glucosa y galactosa. ...</i>	<i>185</i>
<i>Figura 47. Producción media (μM) de NO tras el cultivo en los diferentes medios de los condrocitos portadores de los distintos genotipos de NOS2A. A: genotipo 11-12 frente al genotipo 12-13. B: genotipo 12-13 frente al resto de genotipos presentes.</i>	<i>186</i>

LISTADO DE TABLAS

<i>Tabla 1. Sistema de evaluación radiográfica de Kellgren-Lawrence para la clasificación de pacientes artrósicos.</i>	8
<i>Tabla 2. Criterios radiológicos y clínicos del ACR para el diagnóstico de la artrosis de cadera y rodilla.</i>	9
<i>Tabla 3. Nuevos polimorfismos encontrados por estudios GWAS asociados a la artrosis.</i>	19
<i>Tabla 4. Asociación de variantes genéticas del ADNmt con ciertas enfermedades descritas en la bibliografía.</i>	37
<i>Tabla 5. Genes a estudio relacionados con el estrés oxidativo junto con las secuencias de sus cebadores y la sonda utilizada</i>	76
<i>Tabla 6. Genes a estudio junto con las secuencias de sus cebadores y la sonda utilizada.</i>	77
<i>Tabla 7. Secuencia de los cebadores y tamaño del amplicón para las reacciones de PCR.</i>	91
<i>Tabla 8. Secuencia de los cebadores de SBE en mayúscula y secuencia de la cola inespecífica en minúscula.</i>	91
<i>Tabla 9: Secuencia específica para los cebadores del microsatélite del gen NOS2A.</i>	92
<i>Tabla 10: Sitios polimórficos interrogados para asignar los 6 haplogrupos mitocondriales mayoritarios Europeos.</i>	93
<i>Tabla 11. Secuencias de los cebadores específicos usados en la PCR multiplex para determinar los haplogrupos de ADNmt.</i>	95
<i>Tabla 12. Genes y procesos celulares diferencialmente metilados entre el cluster 3 y no-cluster 3 relacionados con el estrés oxidativo.</i>	106
<i>Tabla 13. Genes relacionados con el estrés oxidativo seleccionados para validación por expresión génica.</i>	111
<i>Tabla 14. Genes con una relación inversa entre metilación y expresión que han sido seleccionados para su posterior validación por expresión génica.</i>	114
<i>Tabla 15. Listado de las 10 regiones más hipermetiladas en el haplogrupo J en relación al H, ordenadas de forma decreciente por sus diferencias en el valor- β.</i>	120
<i>Tabla 16. Listado de las 10 regiones más hipometiladas en el haplogrupo J en relación al H, ordenadas de forma decreciente por sus diferencias en el valor- β.</i>	121
<i>Tabla 17. Características de las muestras analizadas mediante RNA-Seq.</i>	124
<i>Tabla 18. Resumen de los 20 genes más diferencialmente expresados entre el haplogrupo H y J.</i>	127
<i>Tabla 19. Distribución de la cohorte según el sexo y su condición de sanos o artrósicos en la cohorte PROCOAC.</i>	134

Tabla 20. Distribución de las frecuencias de los clusters según su condición de sanos o artrósicos en la cohorte PROCOAC.....	135
Tabla 21. Modelo de regresión para analizar el efecto de los clusters mitocondriales en el riesgo de artrosis de cadera en la cohorte PROCOAC.	136
Tabla 22. Distribución de los genotipos para los polimorfismos estudiados por condición de sanos o artrósicos y para el genotipo dominante en la cohorte PROCOAC.....	137
Tabla 23. Distribución de los genotipos para los polimorfismos estudiados por condición de sanos o artrósicos y para el genotipo recesivo en la cohorte PROCOAC.....	139
Tabla 24. Distribución de los genotipos para los polimorfismos estudiados por condición de sanos o artrósicos y para el genotipo homocigoto en la cohorte PROCOAC.....	141
Tabla 25. Distribución de los recuentos de las repeticiones para el microsatélite del gen NOS2A por condición de sanos o artrósicos en la cohorte PROCOAC.....	143
Tabla 26. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto de los clusters mitocondriales, los genotipos del polimorfismo rs1001179 de CAT y las repeticiones del microstaélite de NOS2A en la cohorte PROCOAC.....	145
Tabla 27. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto de los clusters mitocondriales, los genotipos del polimorfismo rs1001179 de CAT y las repeticiones del microsatélite de NOS2A utilizando el grupo “Otros” como referencia en la cohorte PROCOAC.	145
Tabla 28. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto de los clusters mitocondriales, los genotipos del polimorfismo rs1001179 de CAT y las repeticiones del microstaélite de NOS2A utilizando el genotipo 11-12 como referencia en la cohorte PROCOAC.....	146
Tabla 29. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos de los genes a estudio con el cluster TJ ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.	148
Tabla 30. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos de los genes a estudio con el cluster HV ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.	148
Tabla 31. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos de los genes a estudio con el cluster TJ ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.	151
Tabla 32. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos de los genes a estudio con el cluster HV ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.	152
Tabla 33. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismos de los genes a estudio con el cluster TJ ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.	155
Tabla 34. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismo de los genes a estudio con el cluster HV ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.	156
Tabla 35. Distribución de la cohorte según el sexo y su condición de sanos o artrósicos en la cohorte de Santiago.	157
Tabla 36. Modelo de regresión para analizar el efecto de los clusters mitocondriales en el riesgo de artrosis de cadera en la cohorte de Santiago.....	158

Tabla 37. Distribución de los genotipos para los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 de GPX1 por condición de sanos o artrósicos en la cohorte de Santiago.....	159
Tabla 38. Distribución de los recuentos de las repeticiones para el microsatélite del gen NOS2A por condición de sanos o artrósicos en la cohorte de Santiago.	160
Tabla 39. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos de los polimorfismos rs1001179 de CAT, rs1050450 de GPX1 y el alelo de 13 repeticiones del microsatélite de NOS2A en la cohorte de Santiago.	162
Tabla 40. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos de los polimorfismos rs1001179 de CAT, rs1050450 de GPX1 y los genotipos del microsatélite de NOS2A utilizando como grupo de referencia "Otros" en la cohorte de Santiago.....	163
Tabla 41. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos de los polimorfismos rs1001179 de CAT, rs1050450 de GPX1 y los genotipos del microsatélite de NOS2A utilizando como grupo de referencia el genotipo "11-12" en la cohorte de Santiago.	163
Tabla 42. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismo rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster TJ ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.	165
Tabla 43. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster HV ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.	166
Tabla 44. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismo rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster TJ ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.	166
Tabla 45. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismo rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster HV ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.	167
Tabla 46. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismo rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster TJ ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.	168
Tabla 47. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismo rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster TJ ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.	168
Tabla 48. Distribución por sexos y diagnóstico de la cohorte de rodilla en la cohorte del OAI.	169
Tabla 49. Modelo de regresión para analizar el efecto de los clusters mitocondriales en el riesgo de artrosis de rodilla en la cohorte del OAI	169
Tabla 50. Distribución de los genotipos recesivo del polimorfismo rs1001179 del gen CAT y genotipo dominante del polimorfismo rs1050450 de GPX1 por condición de sanos o artrósicos del OAI.	170
Tabla 51. Distribución de los recuentos de las repeticiones para el microsatélite del gen NOS2A por condición de sanos o artrósicos en la cohorte del OAI.	171

<i>Tabla 52. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos del microsatélite de NOS2A utilizando como grupo de referencia “Otros” en la cohorte del OAI.</i>	<i>173</i>
<i>Tabla 53. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos del microsatélite de NOS2A utilizando como grupo de referencia el genotipo 11-12 en la cohorte del OAI.....</i>	<i>173</i>
<i>Tabla 54. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster TJ ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.</i>	<i>176</i>
<i>Tabla 55. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster HV ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.</i>	<i>176</i>
<i>Tabla 56. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster TJ ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.....</i>	<i>177</i>
<i>Tabla 57. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster HV ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.....</i>	<i>177</i>
<i>Tabla 58. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismos rs1050450 del gen GPX1 y rs1001179 del gen CAT con el cluster TJ ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.</i>	<i>178</i>
<i>Tabla 59. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el cluster HV ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.</i>	<i>178</i>

RESUMEN

RESUMEN

La artrosis es la enfermedad reumática más prevalente e invalidante a nivel mundial y actualmente no existe un tratamiento efectivo. Inicialmente se manifiesta a nivel molecular generando luego alteraciones anatómicas y/o fisiológicas.

El papel de la epigenética es crucial para comprender la interacción gen-ambiente en las enfermedades complejas y recientemente, se han relacionado diferentes patrones de metilación con la artrosis. Por otro lado, la mitocondria ha tomado un papel importante por su importancia en la detoxificación celular y los haplogrupos mitocondriales han demostrado su influencia en la predisposición y progresión de la enfermedad.

Este estudio se ha centrado en la búsqueda de nuevas regiones génicas relacionadas con el estrés oxidativo con un valor potencial como dianas terapéuticas o biomarcadores de la enfermedad e independientes a la articulación afectada. Para ello, se han realizado experimentos de expresión génica, análisis del metiloma y secuenciación junto con estudios de asociación y funcionales *in vitro* con condrocitos para identificar nuevas dianas.

Los resultados obtenidos identificaron genes implicados en el estrés oxidativo como potenciales dianas terapéuticas, perfiles de metilación distintivos entre haplogrupos mitocondriales, la expresión diferencial del transcriptoma en la enfermedad y la interacción de los *clusters* mitocondriales con polimorfismos nucleares y sus consecuencias funcionales.

RESUMO

A artrose é a enfermidade reumática máis prevalente e invalidante a nivel mundial e actualmente non existe un tratamento efectivo. Inicialmente maniféstase a nivel molecular xerando logo alteracións anatómicas e/ou fisiolóxicas.

O papel da epixenética é crucial para comprender a interacción xen-ambiente nas enfermidades complexas e recentemente, relacionáronse diferentes patróns de metilación coa artrose. Doutra banda, a mitocondria tomou un papel importante pola súa importancia na detoxificación celular e os haplogrupos mitocondriais demostraron a súa influencia na predisposición e progresión da enfermidade.

Este estudo centrouse na procura de novas rexións xénicas relacionadas co estrés oxidativo cun valor potencial como dianas terapéuticas ou biomarcadores da enfermidade e independentes á articulación afectada. Para iso, realizáronse experimentos de expresión xénica, análise do metiloma e secuenciación xunto con estudos de asociación e funcionais *in vitro* con condrocitos para identificar novas dianas.

Os resultados obtidos identificaron xenos implicados no estrés oxidativo como potenciais dianas terapéuticas, perfís de metilación distintivos entre haplogrupos mitocondriais, a expresión diferencial do transcriptoma na enfermidade e a interacción dos *clusters* mitocondriais con polimorfismos nucleares e as súas consecuencias funcionais.

ABSTRACT

Osteoarthritis is the most prevalent and incapacitating rheumatic disease worldwide and currently there isn't any effective treatment for it. Initially, it manifests itself at the molecular level, generating anatomical and / or physiological alterations.

The role of epigenetics is crucial to understand the gene-environment interaction in complex diseases, and recently, different patterns of methylation have been linked to osteoarthritis. On the other hand, mitochondria has played an important role because of its importance in cell detoxification and mitochondrial haplogroups have been shown to influence the predisposition and progression of the disease.

This study has focused on the search for new genetic regions related to oxidative stress with potential value as therapeutic targets or disease biomarkers and independent of the affected joint. To do this, experiments on gene expression, methylome analysis and sequencing have been carried out together with association studies and functional in vitro experiments with chondrocytes to identify new targets.

The results obtained have identified genes implicated in oxidative stress as potential therapeutic targets, distinctive methylation profiles between mitochondrial haplogroups, differential expression of the transcriptome in the disease and the interaction of mitochondrial clusters with nuclear polymorphisms and their functional consequences.

Capítulo 1
INTRODUCCIÓN



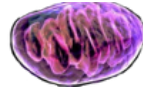
1.1 LA ARTROSIS

1.1.1 DEFINICIÓN

El hecho de definir una enfermedad tiene importantes implicaciones para su prevención, en el momento del diagnóstico y para ofrecer un tratamiento adecuado. Hasta la fecha no existía un consenso para definir la artrosis y ésta era definida tradicionalmente como una patología articular degenerativa de las articulaciones sinoviales que representa un fallo en la reparación del daño generado por el estrés causado por alguna alteración en alguno de los tejidos de estas articulaciones, incluyendo el cartílago, el hueso subcondral, los ligamentos, el menisco (cuando está presente), los músculos periarticulares, los nervios periféricos y el sinovio (líquido viscoso alcalino y transparente secretado por la membrana sinovial localizado en las articulaciones). El desenlace final de esta patología provoca la desestructuración del cartílago y del hueso, causando dolor, rigidez e incapacidad funcional de la articulación (1).

Recientemente la *European League Against Rheumatism* (EULAR) ha publicado un informe para potenciar futuras investigaciones sobre la artrosis (2) resaltando la importancia de las estructuras cartilaginosas de las articulaciones así como las interacciones que se establecen entre todas las estructuras que conforman la articulación (3). Por otro lado la *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) ha propuesto una estandarización de la definición de la artrosis que aúna todas las definiciones globalmente reconocidas para clasificar la enfermedad y facilitar la comunicación y el avance en la investigación en este campo.

La OARSI define la artrosis como un trastorno que involucra a las articulaciones móviles caracterizado por el estrés celular y la degradación de la matriz extracelular iniciada por micro y macro lesiones que activan respuestas de mala adaptación de reparación que incluyen las vías pro-inflamatorias de la inmunidad innata. La enfermedad se manifiesta por primera vez como una alteración molecular (alteración del metabolismo del tejido articular), seguido por alteraciones anatómicas y/o fisiológicas (caracterizadas por la degradación del cartílago, la remodelación ósea, la formación de osteofitos, inflamación de las articulaciones y pérdida de la función normal de las articulaciones), que puede culminar en la enfermedad (4).



1.1.2 ESTRUCTURA DE LA ARTICULACIÓN

El movimiento del esqueleto humano se hace posible gracias a 7 clases de articulaciones de libre movimiento (sinoviales) y por 6 clases de articulaciones fijas (fibrosas o cartilagosas). La articulación sinovial (Figura 1) es una unidad funcional de tejido conectivo influenciada por la expresión molecular y celular. En el caso más simple, una articulación permite que dos huesos colocados de forma opuesta se muevan libremente en relación al otro. El ensamblaje formado por hueso-cartílago-líquido sinovial-cartílago-hueso, forma una estructura de soporte organizada diferente dependiendo del sitio y la función, resultando en una estructura articular especializada (5).

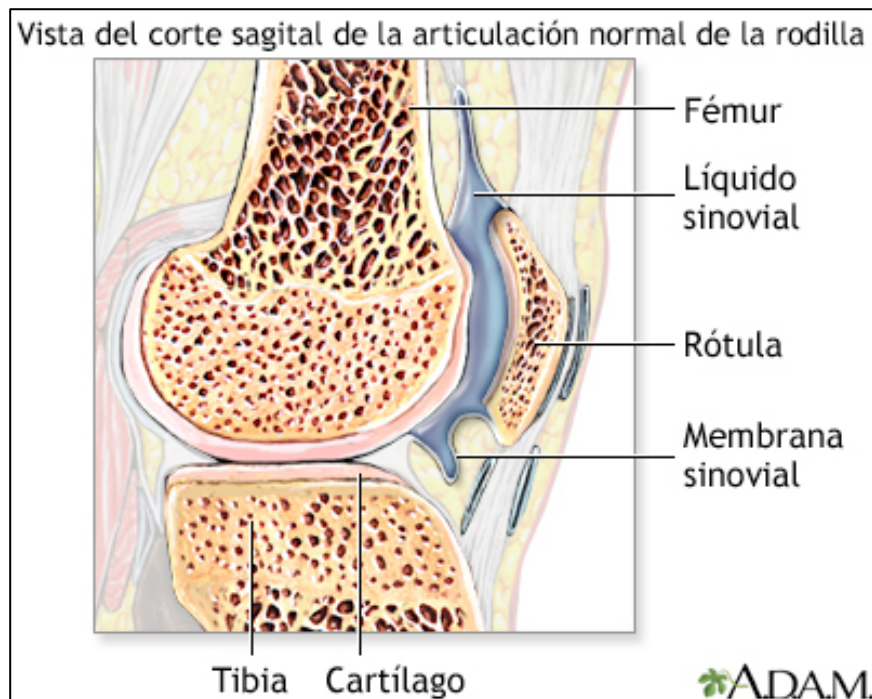


Figura 1. Estructura de una articulación sinovial. La articulación formada por: cartílago articular hialino y cápsula fibrosa, delimitada en su parte interna por la membrana sinovial. Imagen tomada de <http://eaudefisiologia.blogspot.com.es/2012/02/liquido-sinovial.html>.

1.1.3 CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular es el tejido que recubre el hueso subcondral en la articulación y está formado por cartílago hialino que bordea la cavidad sinovial de la articulación (6). El cartílago hialino es una estructura aneural, avascular y alinfática y su único tipo celular son los condrocitos (Figura 2). Los condrocitos suponen el 1-5% del volumen del cartílago articular y se nutren por difusión a

Introducción

partir de la matriz extracelular. Son células muy especializadas, responsables de sintetizar y mantener la infraestructura de la matriz extracelular del cartílago articular. Los condrocitos se encuentran aislados en medio de la matriz extracelular en cavidades que se denominan lagunas y, pese a lo que se creía, que los condrocitos eran unas células aisladas, se ha descrito que están conectadas a través de conductos por los que discurren prolongaciones citoplasmáticas a través de las cuales los condrocitos establecen contactos entre células alejadas mediante uniones gap por donde se transportan nutrientes (7).

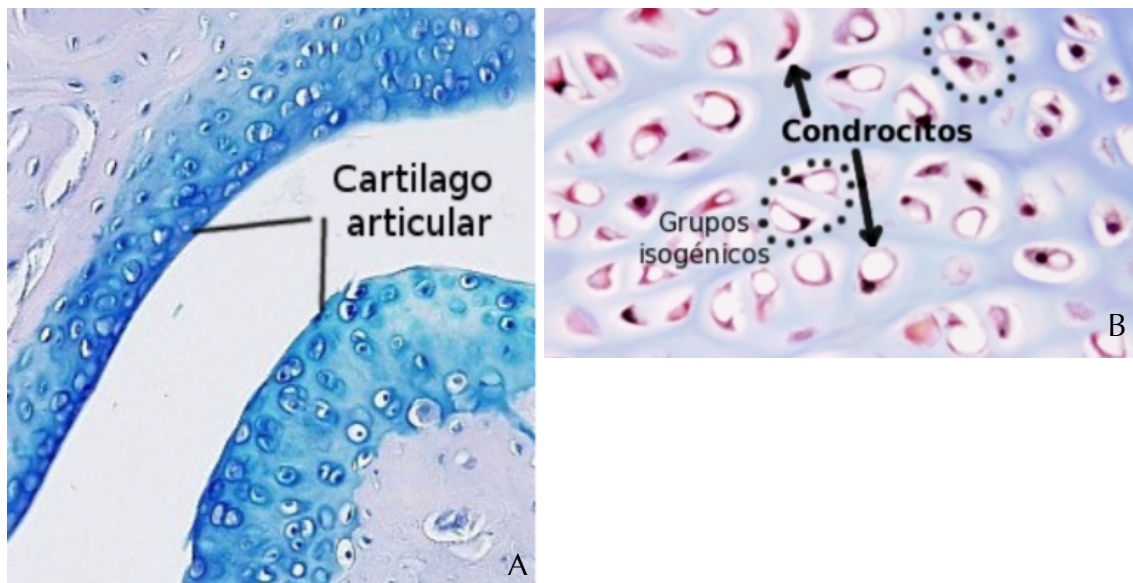
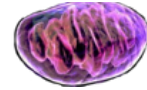


Figura 2. Imágenes histológicas de cartílago articular. A: cartílago hialino (teñido en azul) de una articulación de mano donde se pueden apreciar los condrocitos distribuidos en la matriz extracelular. B condrocitos formando grupos isogénicos que forman las lagunas. Imágenes tomadas de <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/a-conectivo-cartilago.pdf>

El cartílago articular está compuesto en su mayor parte por agua (H_2O), que ayuda a soportar la deformación del tejido y a la lubricación de la superficie para el movimiento entre las dos superficies óseas que constituyen la articulación. Otro componente esencial es el colágeno tipo II, que forma una red que le confiere al cartílago fuerza de tensión. Los proteoglicanos se encuentran en el cartílago articular en forma de largos agregados y le confieren al tejido fuerza de compresión, resistencia y elasticidad. Las subunidades de los proteoglicanos se denominan glucosaminoglicanos (GAGs) y existen dos tipos principales: el condroitín sulfato y el keratán sulfato. En el medio de esta matriz extracelular se encuentran embebidos los condrocitos (8).



Desde un punto de vista histológico, el cartílago se compone de cuatro capas: capa superficial, capa intermedia, capa profunda y capa calcificada (Figura 3). La función principal de la capa superficial es proteger y mantener las capas inferiores, está en contacto con el líquido sinovial y es responsable de la mayoría de las propiedades elásticas del cartílago. Representa el 10-20% del grosor del cartílago, está formada por fibras de colágeno colocadas en paralelo a la superficie articular y contiene un elevado número de condrocitos pequeños y aplanados. La capa intermedia representa el 40-60% del volumen total del cartílago y contiene proteoglicanos y delgadas fibrillas de colágeno distribuidas oblicuamente a través de la matriz. Los condrocitos se encuentran en menor densidad, distribuidos aleatoriamente solos o en grupos (8,9).

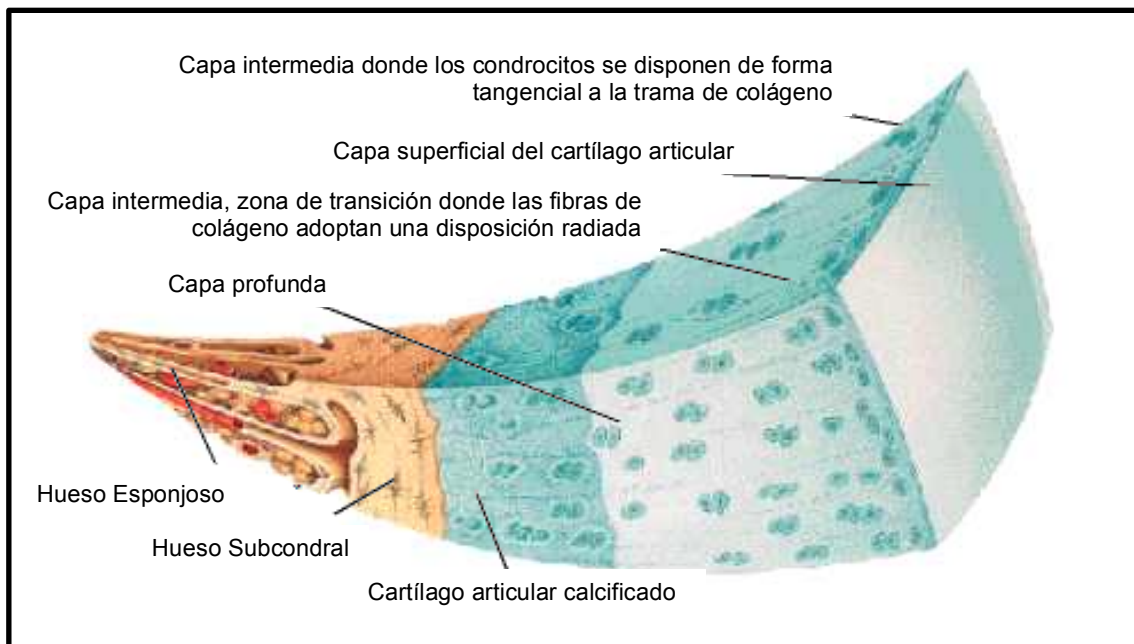


Figura 3. Estructura del cartílago articular que muestra las capas que lo componen principalmente, capa superficial, capa intermedia (zona de transición), capa profunda y hueso subcondral. Imagen modificada de: <http://www.zonamedica.com.ar/atlasosteoarticular/artrosis/pag7.8.htm>

La capa profunda del cartílago es responsable de la gran resistencia a las fuerzas compresivas debido a la orientación perpendicular a la superficie articular de las fibrillas de colágeno que, además, presentan un mayor diámetro y supone el 30% del espesor del tejido. Debido a esta orientación, los condrocitos se distribuyen en columnas y presentan una morfología elíptica. La capa calcificada es responsable del anclaje de las fibrillas de colágeno de la capa superficial al hueso

subcondral. En esta zona las células son escasas y la mayoría están hipertrofiadas (8,9).

1.2 CLASIFICACIÓN DE LA ARTROSIS

La artrosis es una enfermedad compleja que en sus inicios presenta modificaciones moleculares que pueden generar alteraciones en el metabolismo del tejido que, en última instancia, causan la degradación del cartílago provocando una remodelación ósea y la formación de osteofitos, culminando en la invalidez funcional de la articulación (4). Como se ha mencionado previamente, la artrosis puede comenzar en cualquier tejido que forme parte de la articulación siendo el origen de la patología (patogénesis) una de las características más comunes para clasificarla (10).

En función del mecanismo de inicio se diferencian dos tipos de artrosis, primaria y secundaria. La artrosis primaria se considera idiopática y está relacionada con mecanismos causados por alteraciones genéticas y ambientales (11), mientras que la artrosis secundaria es producida por traumatismos, enfermedades congénitas o de desarrollo, anomalías metabólicas u otras patologías (10,11). Existen distintas clasificaciones que según criterios radiográficos y sintomáticos permiten diferenciar entre pacientes artrósicos o sanos. En el caso de los estudios epidemiológicos, la distribución de los pacientes se puede realizar según criterios radiográficos, sintomáticos y/o clínicos.

1.2.1 CLASIFICACIÓN DE LA ARTROSIS POR CRITERIOS RADIOGRÁFICOS

La incorporación de las técnicas de rayos-X a la medicina en el siglo XIX permitió definir un sistema de evaluación radiográfica por medio de la asignación de diferentes grados radiológicos que hacen referencia, principalmente, a la disminución del espacio articular. La escala radiográfica más utilizada en la artrosis fue desarrollada por *Kellgren* y *Lawrence* en 1957 (escala K-L) y clasifica a la enfermedad en 5 categorías (Tabla 1) según la disminución del espacio articular debido a la pérdida de volumen del cartílago, la esclerosis del hueso subcondral y la presencia en los márgenes articulares de osteofitos (Figura 4). Para considerar a un paciente como artrósico su grado K-L debe ser igual o superior a 2 (12).

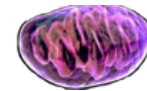


Tabla 1. Sistema de evaluación radiográfica de *Kellgren-Lawrence* para la clasificación de pacientes artrósicos.

Escala radiográfica <i>Kellgren-Lawrence</i>		
Grado	Clasificación	Características
0	Sano	Ausencia de signos radiológicos
1	Dudosa	Posible presencia de osteofitos
		Reducción dudosa del espacio articular
2	Leve	Presencia de pequeños osteofitos definidos
		Reducción del espacio articular leve o media
3	Moderada	Osteofitos definidos de tamaño medio
		Reducción del espacio articular $\geq 50\%$
4	Severa	Esclerosis leve
		Reducción severa del espacio articular
		Numerosos osteofitos
		Esclerosis grave

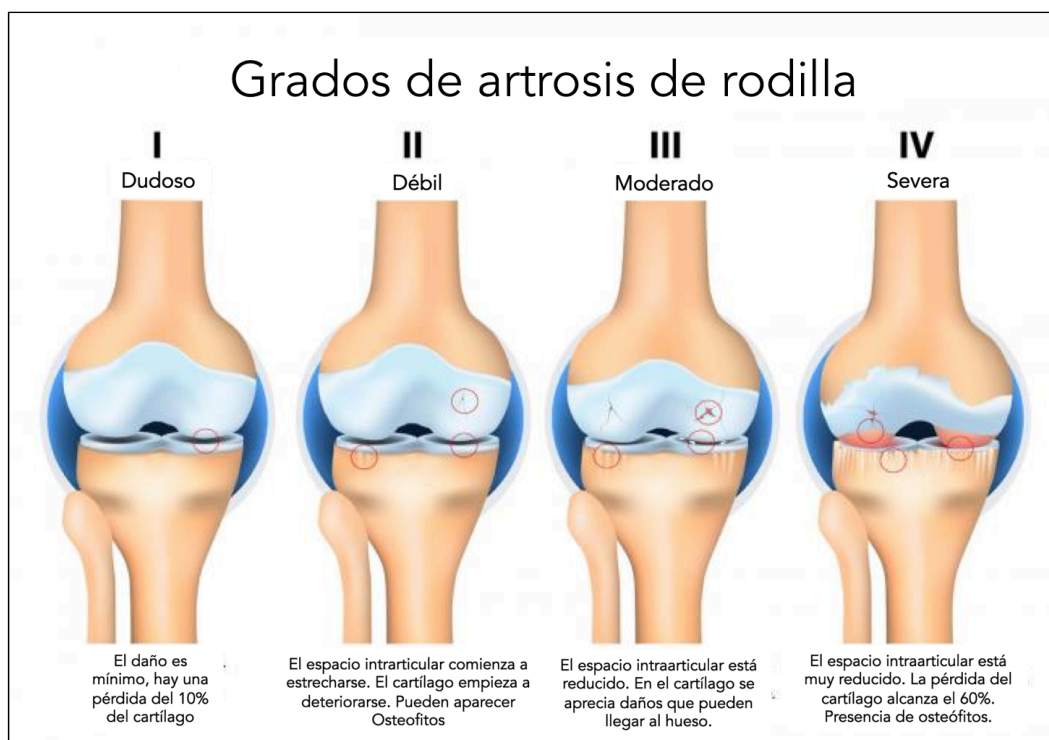


Figura 4. Esquema mostrando los distintos grados de afectación de artrosis de rodilla (12). Modificado de: <http://www.medicalnewstoday.com/kc/osteoarthritis-causes-symptoms-treatments-27871?page=2>

1.2.2 CLASIFICACIÓN SINTOMÁTICA

Las manifestaciones sintomáticas de la artrosis forman parte del cuadro diagnóstico de la artrosis; síntomas como el dolor y la rigidez articular, entre otros, junto con manifestaciones radiológicas, se tienen en cuenta para realizar una clasificación sintomática de la enfermedad. Cuando se usa este tipo de clasificación se debe tener en cuenta que la correlación entre los signos radiológicos y el dolor no siempre se corresponde (13), y en muchos casos puede no existir una manifestación sintomática del dolor articular pese a la presencia de signos radiológicos en la articulación (14).

1.2.3 CLASIFICACIÓN CLÍNICA

Esta clasificación se realiza en base exclusivamente a la información clínica del paciente (historia clínica y un examen físico). Debido a la sintomatología tan heterogénea de la enfermedad, es necesario unificar criterios de inclusión de los pacientes artrósicos para los diversos estudios. Por esta razón, el *American College of Rheumatology* (ACR) establece unos criterios para el diagnóstico de pacientes con artrosis de rodilla y cadera que agrupan tanto manifestaciones sintomáticas como clínicas y radiológicas (15) (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios radiológicos y clínicos del ACR para el diagnóstico de la artrosis de cadera y rodilla.

CADERA (dolor de cadera junto con, al menos, dos de los siguientes criterios)
Edad >50 años
Dolor a la rotación interna de la cadera
Rigidez matutina ≤ 60 minutos
Velocidad de sedimentación globular <45mm/h
Radiografía con osteofitos y/o estrechamiento del espacio articular
Flexión de cadera $\leq 115^\circ$
Rotación interna de cadera <15°

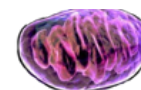


Tabla 2. (Continuación) Criterios radiológicos y clínicos del ACR para el diagnóstico de la artrosis de cadera y rodilla.

RODILLA (dolor de rodilla junto con alguno de los siguientes criterios)
Edad >38 años
Rigidez matutina \leq 30 minutos
Crepitación ósea a los movimientos activos
Engrosamiento de estructuras óseas en la exploración
Radiografía con osteofitos y/o estrechamiento del espacio articular
No aumento de temperatura cutánea en la rodilla

1.3 PREVALENCIA DE LA ARTROSIS

Durante las últimas décadas se han realizado diversos estudios para determinar la prevalencia de la artrosis en diversas poblaciones mundiales que obtienen valores similares para la artrosis de rodilla y cadera. Así, en 2010 se estimó que la prevalencia de la artrosis a nivel mundial era del 5% para la artrosis de manos y que la prevalencia de la artrosis de rodilla era del 20% y en el caso de la cadera afectaba alrededor del 5% en personas mayores de 40 años (16). En el caso de la población española, el estudio EPISER (prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española) describe que de las enfermedades reumáticas más frecuentes, la más prevalente es la artrosis; este estudio fue llevado a cabo por la Sociedad Española de Reumatología (SER) por medio de una encuesta poblacional teniendo en cuenta criterios clínicos (17).

Recientemente se llevó a cabo un estudio observacional multicéntrico nacional (EVALÚA), con el objetivo de determinar el perfil clínico, afectación y tratamiento de pacientes con artrosis de rodilla, cadera y manos. Los valores de prevalencia obtenidos para esta población española fueron de un 84,3% para la artrosis de rodilla, 23,4% para la artrosis de cadera y para la artrosis de manos de un 14,7%. Además, en la mayoría de los pacientes la enfermedad se manifestó de forma bilateral, es decir, las dos articulaciones estaban afectadas; en cuanto a la localización de la articulación afectada, la más frecuente fue la rodilla (64,5%), seguido por rodilla y cadera (11,4%), cadera (9,4%) y en manos (6%). El estudio EVALÚA ha descrito también un predominio de mujeres (77,8%) que sufren esta patología independientemente de la localización, siendo el promedio de edad de esta población de 68 años (18).

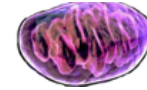
A nivel global, es difícil establecer cifras, aunque existen datos que reflejan la importancia que supone esta enfermedad para la sociedad. Así, en el trabajo de revisión de *Pereira et al.* en 2011, realizaron un meta-análisis tomando datos de cohortes de la bibliografía publicada de distintos países y los valores de artrosis que obtuvieron fueron de 24% para la artrosis de rodilla, un 11% para la artrosis de cadera y un 43% en la artrosis de manos (19).

Las perspectivas futuras sobre esta enfermedad en nuestra población son que el número de personas que sufran artrosis incrementará de cara a los próximos años, debido fundamentalmente al aumento de la esperanza de vida, al envejecimiento de la población y al incremento de la obesidad en la población general (20). Según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), en estos últimos años las personas mayores de 64 años han aumentado en un 2,2%, el índice de envejecimiento (porcentaje que representa la población mayor de 64 años sobre la menor de 16 años) lo ha hecho en un 3,1%, y el sobrepeso y la obesidad se han incrementado en un 17,6% y un 3,6% respectivamente (21).

1.4 ASPECTOS SOCIO-ECONÓMICOS DE LA ARTROSIS

El impacto socio-económico de la artrosis en los países desarrollados se ha visto incrementado en las últimas décadas debido al aumento de la esperanza de vida y el consecuente envejecimiento de la población (20). Las enfermedades reumáticas suponen entre un 15-20% de las consultas de atención primaria en Europa (22), siendo la artrosis la responsable de la mayoría de las visitas (23).

Se ha estimado que el coste sanitario en la última década podría representar entre un 0,8% - 1% para el sistema sanitario del país. El coste socio-económico de esta patología incluye, no sólo los costes sanitarios derivados de las consultas de atención primaria y las operaciones quirúrgicas de reemplazamiento total de cadera o rodilla por una prótesis, sino que implica también las pérdidas en productividad laboral, ya sea a través de bajas solicitadas por los pacientes o por un menor rendimiento en el trabajo, representando el 0,25% - 0,5% de la economía (23). En cuanto a los costes para el sistema sanitario, el diagnóstico, seguimiento y tratamiento genera importantes costes económicos siendo, junto al cáncer, la segunda patología más costosa para el sistema sanitario. Según datos del estudio ArtRoCad elaborado por la SER y Semergen (Sociedad Española de médicos de atención primaria), el tratamiento de la artrosis de rodilla y cadera, supone un coste de casi 5.000 millones de € anuales, suponiendo un gasto medio por paciente de 1.500 € al año (24).



En los EEUU las operaciones de reemplazo total de articulaciones se duplicaron en los últimos diez años llegando a realizar un millón de operaciones al año con un coste total de 15.000 millones de dólares. Los costes anuales del absentismo por artrosis de trabajadores en los EEUU superaron los 10.000 millones de dólares, estimando un coste por trabajador al año de entre 700 – 7000 dólares al año (25).

1.4.1 FACTORES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LA ARTROSIS

La artrosis es definida como una patología de origen multifactorial en la que, por lo general, se ven implicados más de un factor de forma simultánea. El riesgo de desarrollar la enfermedad está determinado por factores sistémicos y factores intrínsecos o extrínsecos a la articulación (26,27). Se han identificado una serie de factores de riesgo para esta patología como son la edad, el sexo, la etnia, la obesidad, la ocupación laboral, la nutrición, el hábito tabáquico, los factores genéticos, los daños articulares por traumatismos en la articulación, etc (28). Estos factores se pueden clasificar según su naturaleza es decir, existen factores no modificables y modificables (Figura 5).

1.4.1.1 Factores no modificables

i. LA EDAD

El incremento de la prevalencia e incidencia de la artrosis radiográfica o de artrosis sintomática está claramente relacionado con la edad, uno de los factores principales de riesgo en la artrosis (29). Sin embargo, el mecanismo específico no ha sido elucidado y probablemente sea consecuencia de numerosos factores individuales, entre los que se incluyen el daño oxidativo, la disminución del grosor del cartílago o el debilitamiento muscular, entre otros. Además, con el envejecimiento, la homeostasis celular se ve alterada dando lugar a respuestas inadecuadas al estrés o a la lesión articular, generando destrucción y pérdida de tejido articular (28–30).

ii. EL SEXO

Diversos estudios epidemiológicos han descrito que existen diferencias en cuanto a la incidencia y la severidad de la artrosis relacionadas con el sexo (31,32). La prevalencia de la artrosis es mayor en las mujeres que en los hombres y con grados de severidad radiológicos mayores (33). Además, las mujeres presentan un menor grosor de cartílago que los hombres (34) y se ha encontrado también una

asociación estadísticamente significativa con la enfermedad en las mujeres postmenopáusicas (35).

El estudio EVALÚA ha puesto de manifiesto que existe un predominio de mujeres (77,8%) con artrosis en la población española independientemente de la articulación afectada (18). El mecanismo que produce estas diferencias en la incidencia y la severidad de la enfermedad entre sexos todavía no se ha descubierto, pero es probable que estén involucrados factores mecánicos y hormonales (31).

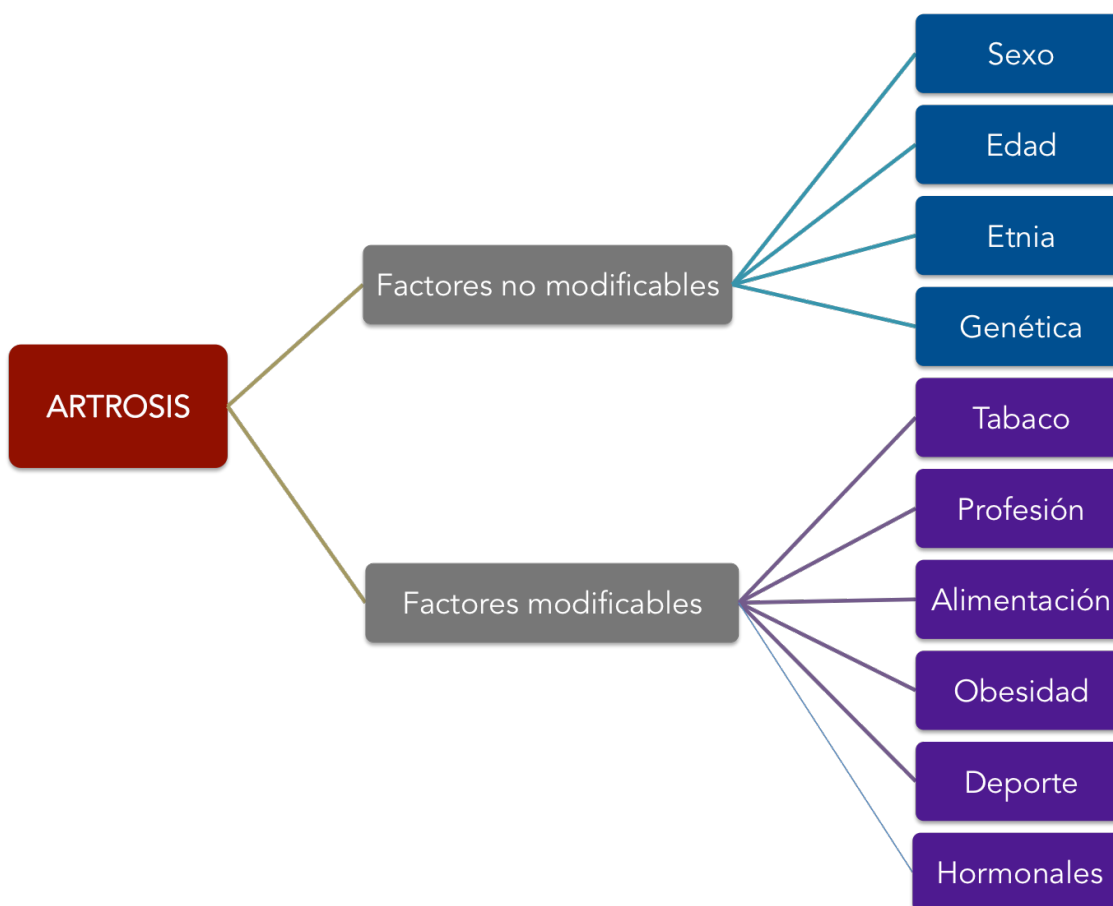
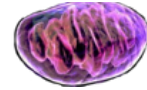


Figura 5. Esquema de los principales factores de riesgo asociados a la artrosis.

iii. LA ETNIA

La procedencia étnica de la población puede relacionarse con la predisposición a padecer artrosis, ya que se han observado, en diferentes poblaciones mundiales, diferencias en sus porcentajes de riesgo (36). La etnia es una característica



intrínseca de la población y se ha descrito como un factor de riesgo para esta patología en diferentes bases de datos pertenecientes a diferentes etnias (37).

En el estudio transversal llevado a cabo por *Nelson et al.* en la cohorte del proyecto JoCo OA (Proyecto de Estudio de la artrosis del Condado de Johnston) en América del Norte, observaron que la población afroamericana presentaba más probabilidades de padecer artrosis de rodilla que la población caucásica (38). Otro análisis realizado en esta misma cohorte reveló diferencias en la progresión de la artrosis de cadera donde la población afroamericana tenía una mayor probabilidad que los caucásicos de progresar de un grado K-L igual a 0 a un grado 1 (39). Un estudio de artrosis en una población de Beijing (Pequín, China) reveló que la artrosis de cadera era mucho menos frecuente en la población china que en los caucásicos (40).

iv. LA GENÉTICA

Tanto el inicio como la progresión y/o la severidad de la enfermedad están influenciados por los factores genéticos, los cuales interactúan con diversas alteraciones producidas por distintos genes (41). Diversos estudios en gemelos y familias han estimado que el componente genético de la artrosis es del 50-65% para la artrosis de manos y cadera y en el caso de la rodilla se ha sugerido que es del 39% (36).

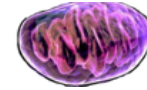
Los estudios genéticos se centran en identificar qué variantes genéticas influyen en una enfermedad. Tradicionalmente se identificaban mediante dos aproximaciones (42), por medio del escaneo genómico en busca de genes que, de alguna forma, se asociasen con la patología y para el cual no se requería de un conocimiento previo de los genes, o bien por el estudio de genes candidatos, orientado fundamentalmente hacia la búsqueda de alteraciones en un gen o grupo de genes y que sí requiere de un conocimiento previo de la función del gen y de su posible papel en la enfermedad (41). Sin embargo debido a la falta de marcadores genéticos adecuados, no se han identificado muchos genes candidatos que muestren una clara relación con la etiología de la enfermedad. Las variaciones polimórficas son muy comunes en el ADN (ácido desoxirribonucleico) y en combinación con el estudio de asociación del genoma completo (GWAS) han acelerado significativamente la compleja localización de genes relacionados con enfermedades (43,44).

En los últimos años diferentes estudios han identificado genes que se encuentran fuertemente asociados con la artrosis, genes relacionados con la condrogénesis y la osificación endocondral, como el regulador transcripcional RUNX2 (regulador

transcripcional *runt* factor 2), que tiene un papel esencial en la osificación endocondral, permitiendo la formación y el mantenimiento del cartílago cuando su expresión está reprimida (45,46). Este gen podría ser una potencial diana terapéutica en la artrosis ya que contribuye a la hipertrofia de los condrocitos, al desarrollo de los osteofitos durante la progresión de la artrosis (47,48) y a la degradación del cartílago por la estimulación de la expresión de la MMP13 (metaloproteinasa 13) (49). El gen PTHLH (precursor de la proteína relacionada con la hormona paratiroides), que codifica para PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroides) que es la encargada de regular el ratio de diferenciación y osificación endocondral en condrocitos (50) por la vía de señalización dependiente de SMAD3 (miembro 3 de la familia SMAD) del TGF- β (Factor de crecimiento transformina β) también se ha relacionado con la enfermedad (50,51); así, la expresión de PTHLH está aumentada en el cartílago de pacientes con artrosis de rodilla (48).

El gen SMAD3 es un mediador intracelular para TGF- β involucrado en la regulación de la proliferación de los condrocitos, su diferenciación y la mineralización de la matriz (52). En la osificación endocondral, la vía de TGF- β es estimulada por SMAD3, induciendo la expresión de PTHrP que inhibe la diferenciación terminal de los condrocitos (51). Por otro lado, durante la diferenciación de los condrocitos, SMAD3 puede inactivar a RUNX2 por mecanismos independientes a PTHrP (52). Además, se ha descrito que la activación de la vía de TGF- β por SMAD3 podría activar los procesos anabólicos reprimiendo la expresión de MMP13 y evitando así el desarrollo de la enfermedad (53). El gen GDF5 (Factor 5 de crecimiento de diferenciación) constituye un claro ejemplo de factor de riesgo genético en la artrosis. Este gen es un miembro de la familia BMP (proteínas morfogénicas del hueso) la cual es crucial para la condrogénesis y proliferación de los condrocitos (54) en concreto, la disminución de la expresión del gen, asociada al alelo T del polimorfismo **rs143383** en los tejidos sinoviales, está relacionado con un mayor riesgo de artrosis (55,56). La asociación de este gen con la artrosis se descubrió en una población asiática (57), posteriormente fue replicado en una población europea (58) y un meta-análisis confirmó su asociación en dos grupos étnicos (59). GDF5 activa la hipertrofia de los condrocitos en la osificación endocondral (60), estimulada también por un aumento de la secreción de la fosfatasa alcalina, osteopontina y colágenos tipo I y X (61).

En los últimos años, se han publicado múltiples estudios de asociación de variables polimórficas, pero debido a la heterogeneidad y complejidad de la artrosis, estos polimorfismos muestran diferentes niveles de asociación, ya que



pueden estar asociados a subtipos de artrosis o a grupos étnicos, creando un amplio rango de asociaciones (62). Un ejemplo de este tipo de estudios es el análisis de los polimorfismos funcionales en genes de las cascadas de señalización proinflamatorias, que pueden contribuir al riesgo genético de la artrosis. Genes como COX2 (ciclooxigenasa 2), enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas que actúa como dioxigenasa y peroxidasa, presenta un polimorfismo de base única (SNP), el **rs20417** 765 C/G, que está localizado en la región promotora de COX2; el análisis de este polimorfismo mostró que el alelo C se asociaba con un menor riesgo y el alelo G con un mayor riesgo de artrosis (63). Otro ejemplo es el gen relacionado con la señalización inflamatoria en las articulaciones y la degradación del cartílago es el gen IL8 (interleuquina 8). El estudio de sus polimorfismos mostró que los portadores del alelo T en los SNPs **rs4073** 251 A/T y **rs2227306** 781 C/T se asociaban de manera significativa con un mayor riesgo de artrosis (64).

El gen HIF-1 α (Factor 1 inducible por hipoxia subunidad 1 alfa), que regula la homeostasis del oxígeno en el cartílago y está asociado al estrés oxidativo, mostró que sus variantes polimórficas influyen en la transcripción del gen. En este caso, se identificó que la presencia del **rs11549465** (P582S) desempeñaba un papel protector en la pérdida de cartílago en la población mejicana (65). Por otro lado, el gen CHST11 (sulfotransferasa carboxilasa 11) codifica para una enzima situada en la membrana del aparato de Golgi que cataliza la transferencia de un grupo sulfato a condroitin (66), un disacárido que se une covalentemente con la proteína agregano (67). En su SNP **rs835487** (A/G), se ha asociado su alelo G con la artrosis (68) y se ha visto una sobre-expresión de CHST11 en pacientes con artrosis de rodilla (69) y cadera (70), lo cual podría alterar la homeostasis del condrocito por la sobre-expresión de la vía de BMP y por la represión de la vía de TGF- β .

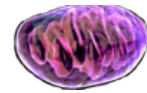
Un reciente trabajo estudió los polimorfismos encontrados en COL11A1 (colágeno tipo XI cadena alfa 1) en una población Japonesa y observaron que el alelo T del polimorfismo **rs4907986** y que el alelo C en el polimorfismo **rs1241164** se asociaba con un mayor riesgo en esta población (71). El gen VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) codifica para un factor angiogénico implicado en el desarrollo, osificación endocondral y formación de cartílago (72). Es un marcador de condrocitos hipertróficos y contribuye a la artrosis en modelos animales estimulando la proliferación de condrocitos, la apoptosis y la producción de mediadores catabólicos (73,74). Recientemente, se estudió la asociación con la susceptibilidad de la artrosis con el gen DVWA (dominio del factor A doble de *Von Willebrand*), relacionado con la adhesión celular y las

interacciones entre proteínas. Por medio de un meta-análisis se identificó que el alelo G del SNP **rs7639618** DVWA está relacionado con un mayor riesgo de artrosis de rodilla en la población asiática (62).

En cuanto a los estudios GWAS, se han publicado diversos trabajos pero hasta la fecha pocos se han validado (57,75–78); en caucásicos solo 3 *loci* han alcanzado el ratio de significancia en los estudios GWAS. Estos *loci* incluyen una variante que influye en la expresión de GDF5 (57,75), un *locus* del receptor GPR22 (receptor 22 de proteína G acoplada) (76,77) y una variante en MCF2L (secuencia de línea celular derivada de transformina) (78). Otro ejemplo, es la histona metiltransferasa DOT1L, que metila la lisina-79 de la histona H3, está implicada en la regulación epigenética del genoma (79) y tiene un papel potencial en la formación endocondral del hueso por su interacción con la vía de señalización Wnt, vía de transducción de señales formadas por proteínas que transfiere las señales extracelulares al interior celular. El alelo G de su polimorfismo **rs12982744** se relacionó con una reducción del volumen del cartílago en cadera (80). En el último año, se identificaron nuevos polimorfismos y se replicó el encontrado en el gen DOT1L (Tabla 3) asociados al grosor del cartílago en la cadera, el aumento del espacio intra-articular en la cadera y con la artrosis de cadera por medio de estudios GWAS (81).

Los estudios de asociación se renovaron con la combinación de GWAS y meta-análisis; con este tipo de análisis se han encontrado 56 SNPs asociados con la artrosis o con un subtipo de esta enfermedad. Entre ellos, se han asociado 23 SNPs para la artrosis de cadera, 20 SNPs para la artrosis de rodilla y 13 SNPs (Figura 6) que muestran una tendencia a desarrollar artrosis en ambas articulaciones (62) (Tabla 3). Por ejemplo, en el trabajo de *Rodríguez-Fontela et al.* se identificó, por medio de un meta-análisis, que los genes COL11A1 y VEGF estaban significativamente asociados con la enfermedad, en concreto los polimorfismos **rs4907986** y **rs1241164** de COL11A1, los cuales se asociaron, el primero, como un factor de riesgo (alelo T), y el segundo como un factor de protección (alelo T); además, el alelo T de **rs833058** de VEGF se reveló como un factor protector en la artrosis de cadera en hombres (55).

Finalmente, aunque será tratado en mayor profundidad más adelante en este trabajo, los haplogrupos de ADN mitocondrial (ADNmt) emergen como nuevas variantes genéticas implicadas en la prevalencia, incidencia y progresión de la enfermedad. Los individuos con el haplogrupo mitocondrial J, que está relacionado con un menor nivel de biomarcadores séricos de degradación de cartílago, una menor producción de NO (óxido nítrico) y una mayor longitud de



los telómeros, tienen también un menor riesgo de desarrollar artrosis de rodilla y cadera. Por otro lado los portadores del haplogrupo mitocondrial H que está asociado a niveles séricos más elevados de biomarcadores de degradación del cartílago, se asocia con una mayor riesgo de padecer la enfermedad (82–84).

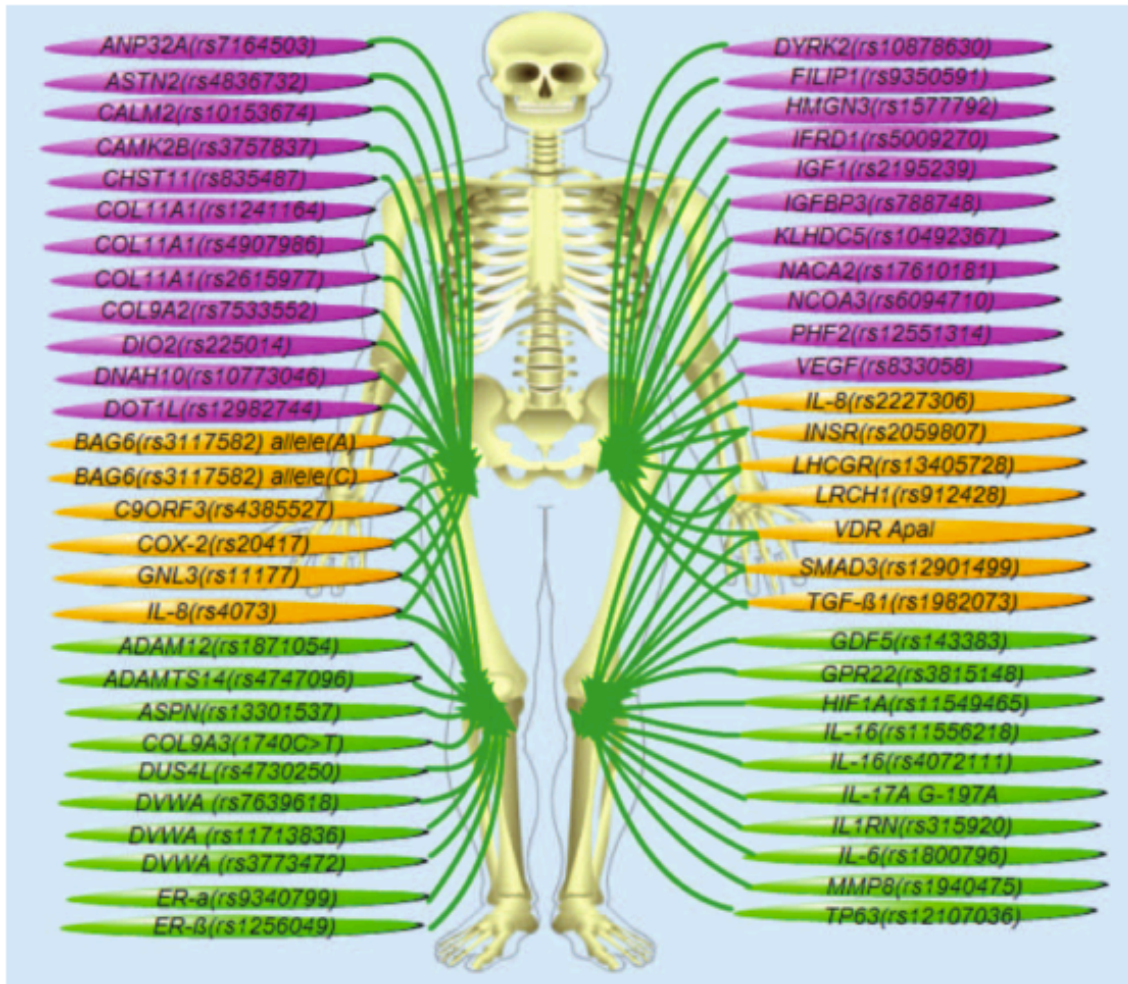


Figura 6. Polimorfismos asociados con el riesgo de artrosis. En la figura se muestran 56 SNPs pertenecientes a 50 genes que se han asociado con el riesgo de artrosis. De todos ellos, 23 SNPs se han asociado con la artrosis de cadera (marcados en violeta); 20 SNPs asociados con artrosis de rodilla (marcados en verde); mientras que 13 SNPs se han asociado con artrosis de rodilla y cadera (marcados en amarillo). Tomado de Wang et al. 2016 (62).

Introducción

Tabla 3. Nuevos polimorfismos encontrados por estudios GWAS asociados a la artrosis.

ID Gen	Gen	Polimorfismo	Articulación	Asociación con la enfermedad	Referencia
ANP32A	Fosfoproteína nuclear aci-acídica familia 32 miembro A	rs7163503	Cadera	Protector	Valdes et al (85)
ASTN2	Astrotacina 2	rs4836732	Cadera	Riesgo	Zeggini et al (86)
CALM2	Calmodulina 2	rs10553674	Cadera	Riesgo	Mototani et al (87)
CAMK2B	Proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina II beta	rs3757837	Cadera	Riesgo	Evangelou et al (77)
CHST11	Carbohidrato sulfotransferasa 11	rs835487	Cadera	Riesgo	Zeggini et al (86)
COL11A1	Colágeno tipo XI cadena alfa 1	rs1241164	Cadera	Protector	Rodriguez- Fontenla et al (74)
COL11A1	Colágeno tipo XI cadena alfa 1	rs4907986	Cadera	Riesgo	Rodriguez-Fontenla et al (74)
COL11A1	Colágeno tipo XI cadena alfa 1	rs2615977	Cadera	Riesgo	Panoutsopoulou et al (88)
COL9A2	Colágeno tipo IX cadena alfa 2	rs33552	Cadera	Riesgo	Nakki et al (89)
DIO2	deiodinasa, iodotironina tipo II	rs225014	Cadera	Riesgo	Meulenbelt et al (90)
DNAH10	Cadena pesada 10 de dineína, axonema	rs10773046	Cadera	Riesgo	Evangelou et al (77)
DOT1L	Metiltransferasa histona H3K79	rs12982744	Cadera	Protector	Castano et al (81)
DYRK2	Quinasa regulada por fosforilación dual, específica de tirosina (Y)	rs10878630	Cadera	Riesgo	Evangelou et al (77)
FILIP1	Proteína I de interacción con filamina A	rs9350591	Cadera	Riesgo	Zeggini et al (86)
HMGN3	Dominio de unión de alta movilidad nucleosomal	rs1577792	Cadera	Riesgo	Evangelou et al (77)
IFRD1	Regulador 1 del desarrollo relacionado con Interferón	rs5009270	Cadera	Riesgo	Evangelou et al (77)
IGF1	Factor de crecimiento tipo Insulina	rs2195239	Cadera	Riesgo	Limer et al (91)
IGFBP3	Proteína de unión para el factor de crecimiento tipo insulina	rs788748	Cadera	Protector	Evans et al (92)
KLHDC5	Dominio kelch 5	rs10492367	Cadera	Riesgo	Zeggini et al (86)
NACA2	Complejo alfa asociado a polipéptido nascent subunidad 2	rs17610181	Cadera	Riesgo	Evangelou et al (77)
NCOA3	Coactivador 3 del receptor nuclear	rs6094710	Cadera	Riesgo	Evangelou et al (77)
PHF2	Proteína finger 2 PHD	rs12551314	Cadera	Riesgo	Evangelou et al (77)
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular	rs833058	Cadera	Protector	Rodriguez-Fontenla et al (74)



Tabla 3. (Continuación) Nuevos polimorfismos encontrados por estudios GWAS asociados a la artrosis.

ID Gen	Gen	Polimorfismo	Articulación	Asociación con la enfermedad	Referencia
ADAM12	Dominio 12 metalopeptidasa ADAM	rs1871054	Rodilla	Riesgo	Wang et al(93)
ADAMTS14	Metalopeptidasa 14 con motivo de trombospondina tipo 1	rs4747096	Rodilla	Riesgo	Rodriguez-Fontenla et al (74)
ASPN	Asporina	rs13301537	Rodilla	Riesgo	Liang et al (94)
COL9A3 (1740 C>T)	Colágeno tipo IX cadena alfa 3	rs61734651	Rodilla	Riesgo	Ikedo et al (95)
DUS4L	Dihidroruridina sintasa 4	rs4730250	Rodilla	Riesgo	Evangjelou et al (77)
DVWA	Dominio doble del factor A Von Willebrand	rs7639618	Rodilla	Riesgo	Miyamoto et al (96)
DVWA	Dominio doble del factor A Von Willebrand	rs11713836	Rodilla	Riesgo	Miyamoto et al (96)
DVWA	Dominio doble del factor A Von Willebrand	rs3773472	Rodilla	Riesgo	Miyamoto et al (96)
DVWA	Dominio doble del factor A Von Willebrand	rs11718863	Rodilla	Riesgo	Miyamoto et al (96)
ER-α	Receptor de estrógenos alfa	rs9340799	Rodilla	Riesgo	Ren et al (97)
ER-β	Receptor de estrógenos beta	rs1256049	Rodilla	Riesgo	Lee et al (98)
GDF5	Factor 5 de diferenciación de crecimiento	rs143383	Rodilla	Riesgo	Zhang et al (99)
GPR22	Receptor 22 de proteína G acoplada	rs3815148	Rodilla	Riesgo	Kerkhof et al (76)
HIF1A	Factor 1 inducible por hipoxia	rs11549465	Rodilla	Riesgo	Fernandez-Torres et al (65)
IL16	Interleuquina 16	rs11556218	Rodilla	Protector	Luo et al (100)
IL16	Interleuquina 16	rs4072111	Rodilla	Protector	Luo et al (100)
IL17A (G-197A)	Interleuquina 17A	rs2275913	Rodilla	Protector	Han et al (101)
IL1RN	Receptor antagonista de Interleuquina 1	rs315920	Rodilla	Riesgo	Limer et al (91)
IL6	Interleuquina 6	rs1800796	Rodilla	Protector	Fernandes et al (102)
MMP8	Metaloproteinasa 8	rs1940475	Rodilla	Protector	Nakki et al (103)
C9ORF3	Marco de lectura abierto cromosoma 9	rs4385527	Artrosis	Protector	Cui et al (104)
INSR	Receptor de Insulina	rs2059807	Artrosis	Riesgo	Cui et al (104)

Introducción

Tabla 3. (Continuación) Nuevos polimorfismos encontrados por estudios GWAS asociados a la artrosis.

ID Gen	Gen	Polimorfismo	Articulación	Asociación con la enfermedad	Referencia
SMAD3	Miembro 3 familia SMAD	rs12901499	Rodilla y cadera	Riesgo	Valdes et al (105)
BAG6 (C/A)	Atanogen 6 asociado a BCL2	rs3117582	Artrosis	Protector	Etokebe et al (106)
BAG6 (A/C)	Atanogen 6 asociado a BCL2	rs3117582	Artrosis	Riesgo	Etokebe et al (106)
COX2	Ciclooxigenasa 2	rs20417	Artrosis	Protector	Schneider et al (63)
GLN3	Proteína de unión a nucleótido de guanina	rs11177	Artrosis	Riesgo	Zeggini et al (86)
IL8	Interleuquina 8	rs4073	Artrosis	Riesgo	Yu et al (64)
IL8	Interleuquina 8	rs2227306	Artrosis	Riesgo	Yu et al (64)
LHCCR	Receptor de la hormona de Luteinización y coriogonadotropina	rs13405728	Artrosis	Protector	Cui et al (104)
LRCH1	Dominio con repeticiones ricas en leucina y homólogo a calponina	rs912428	Artrosis	Riesgo	Zhu et al (107)
TGF-β1	Factor de crecimiento de transformina beta 1	rs1982073	Artrosis	Riesgo	Cong et al (108)
PIK3R1	Quinasa 3 fosfoinositol reguladora subunidad 1	rs10471753	Cadera	Riesgo	Castano et al (81)
TGF-α	Factor de crecimiento de transformina alfa 1	rs2862851	Cadera	Riesgo	Castano et al (81)
SLBP/FGFR 3	Proteína de unión Stem-Loop y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos	rs2236995	Cadera	Riesgo	Castano et al (81)
TREH/DDX 6	Trehalasa y Box-DEAD helicasa 6	rs496547	Cadera	Riesgo	Castano et al (81)
BTNL2	Burtofilina 2	rs10947262	Rodilla	Riesgo	Nakajima et al (109)
MCF2L	Secuencia de transformina derivada de linea celular	rs11842874	Rodilla y cadera	Riesgo	Day-Williams et al (78)
PTH1H	Hormona paratiroide	rs10492367	Cadera	Riesgo	Zeggini et al
HLA-DQB1	Complejo mayor de histocompatibilidad Clase II DR beta 1	rs7775228	Rodilla	Riesgo	Nakajima et al (109)
FTO	Gen asociado a masa de lípidos y obesidad	rs8044769	Rodilla	Riesgo	Zeggini et al (86)



1.1.1.1. Factores modificables

i. OBESIDAD

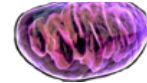
Uno de los factores modificables que se asocia con la incidencia y progresión de la artrosis es la obesidad (110). Se ha demostrado que la sobrecarga mecánica en las articulaciones de soporte debido a un exceso de peso es un factor de riesgo de artrosis para la rodilla y la cadera (111–114) pero también se han descrito asociaciones con la artrosis de manos (115), lo que sugiere una etiología más compleja para la artrosis inducida por la obesidad (116).

Recientes estudios epidemiológicos han mostrado un aumento del riesgo de artrosis en pacientes con sobrepeso, lo que sugiere una relación entre los mediadores sistémicos inflamatorios, como las adipocinas liberadas por el tejido adiposo, y la artrosis (117). Además, se han encontrado como posibles biomarcadores la leptina, la resistina y la adiponectina, cuyos niveles influyen sobre el metabolismo del cartílago (118), poniendo de manifiesto una correlación directa con el aumento del índice de masa corporal (IMC) y la obesidad en la población con el riesgo de artrosis de cadera y especialmente de rodilla (119).

ii. OCUPACIÓN LABORAL

Un factor a tener en cuenta en el desarrollo y progresión de la artrosis es el efecto de la actividad laboral sobre las articulaciones. Dentro de las causas que lo relacionan se encuentran: las fuerzas mecánicas, la postura adaptada y el uso repetitivo al que se ven sometidas las articulaciones. Varios artículos revisados por *Palmer* encuentran una relación entre la actividad laboral que exija un esfuerzo físico de las articulaciones y la artrosis de rodilla. Trabajos donde el levantamiento de peso, estar arrodillado o en cuclillas durante un tiempo de la jornada laboral, contribuyen a la incidencia y/o progresión y empeoramiento de los síntomas de la enfermedad (120).

En la revisión realizada por *Jensen* se evaluó la asociación de la artrosis de cadera y las actividades laborales con una demanda de esfuerzo físico como el levantamiento de objetos pesados, tareas agrícolas, trabajos en la construcción o subir y bajar escaleras. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el desarrollo de aquellos trabajos que exigían levantar pesos o labores agrícolas y la incidencia de artrosis de cadera. En el caso de subir y bajar escaleras repetidamente durante la jornada laboral se asoció positivamente con un peor pronóstico de la artrosis de cadera (121).



iii. HÁBITO TABÁQUICO

Un reciente estudio observacional analizó los datos de varias publicaciones sobre el tabaquismo, por medio de un meta-análisis se estudió su asociación con la artrosis de manos, rodilla y cadera, encontrando una relación inversa entre el tabaquismo y la enfermedad (122). El hábito de fumar puede tener efectos contradictorios sobre esta patología, por un lado la nicotina previene la enfermedad pero, por otro lado, induce dolor musculoesquelético por estimulación de los receptores de las células neuronales (123).

No existe una relación clara entre el consumo de tabaco y el daño en el tejido cartilaginoso, aunque un estudio realizado en familias con artrosis de rodilla indicó que el tabaquismo aceleró la pérdida de cartílago (123). En otro meta-análisis sobre el consumo de tabaco y casos de artrosis radiográfica se mostró que, en los fumadores, el riesgo de padecer una artrosis dolorosa se veía incrementado con el consumo de tabaco (124).

iv. DEPORTE

El efecto de la actividad física resulta beneficioso, ya que fortalece la musculatura periarticular ayudando a estabilizar la articulación (125) y el ejercicio regular protege contra los trastornos degenerativos de las articulaciones. Está descrito que hacer ejercicio disminuye la concentración de citoquinas inflamatorias intraarticulares en la rodilla y facilita el movimiento de la proteína COMP (proteína oligomérica de la matriz del cartílago) desde el espacio articular hasta el suero, esta proteína está implicada en la integridad estructural del cartílago (126). Aunque el deporte de alta intensidad, donde las articulaciones son sometidas a importantes traumas repetitivos, ha mostrado un aumento del riesgo de padecer artrosis (125). De hecho, en deportes como el fútbol, las lesiones del ligamento cruzado anterior son muy comunes y se ha observado una prevalencia muy alta de artrosis de rodilla radiográfica en jugadores profesionales que sufrieron este tipo de lesión (127). Además un reciente estudio evaluó la asociación entre la artrosis de rodilla con diferentes niveles de actividad física y determinó que los niveles crecientes de ejercicio se asociaban con el riesgo de artrosis primaria de rodilla (128).

El rendimiento deportivo de élite está influenciado también por la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS); un estudio realizado en atletas de resistencia y velocistas mostró diferencias entre las frecuencias de los haplogrupos mitocondriales, resultando que los haplogrupos K y J2 estaban sobre-representados en el grupo de velocistas y ausentes entre los atletas de resistencia.

Esto estaría relacionado con el hecho de que estos haplogrupos tienen un desacoplamiento mayor del sistema OXPHOS, lo que reduciría la producción de ATP (Adenosin Tri Fosfato), pero también la liberación de ROS (especies reactivas de Oxígeno) y por tanto no resultan beneficiosos para un alto rendimiento de resistencia, pero sí para la longevidad (129).

Por tanto, la asociación entre la artrosis y la actividad física o deportes particulares como correr no está clara todavía. Una reciente revisión concluyó que no era posible determinar el papel que ejercía correr en la artrosis de rodilla debido a los resultados contradictorios publicados por lo que se necesitan más estudios para determinar su relación (130).

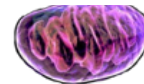
v. FACTORES HORMONALES

El incremento de la artrosis relacionado con la edad y con la mayor prevalencia en las mujeres sugiere que las hormonas sexuales, particularmente una deficiencia de estrógenos causada por la menopausia, tiene un papel clave en la predisposición a la artrosis (131); de hecho se ha descrito una asociación significativa entre las variaciones genéticas en el gen del receptor de estrógeno alfa y el desarrollo de artrosis en mujeres (132). Entre las funciones de los estrógenos se encuentra la regulación de la homeostasis ósea, la modulación de la actividad del condrocito, la síntesis de metaloproteinasas (MMPs), la producción de NO y de ROS (133).

Se ha demostrado además que la densidad mineral ósea (DMO) está influenciada por las hormonas sexuales (134) y que un incremento en la DMO conlleva un mayor riesgo de padecer artrosis (135). En este sentido, se ha descrito una fuerte asociación entre el aumento de la DMO y el inicio de la artrosis de rodilla en mujeres adultas post-menopáusicas, aunque no se ha identificado la causa molecular (112,136). Sin embargo, existen estudios que sugieren que un incremento de la DMO reduce el riesgo de fracturas de cadera, a expensas de un incremento del riesgo de la artrosis de rodilla (137). En un reciente trabajo en la cohorte JoCo OA se ha evaluado la asociación entre la DMO con la artrosis de cadera incipiente y se ha observado que un incremento de la DMO no aumenta el riesgo de artrosis de rodilla ni de cadera, sino que lo disminuye en un 44% (137). Por tanto, la asociación entre la artrosis y la DMO no está clara todavía.

1.5 EL ESTRÉS OXIDATIVO

El desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes, a favor de los primeros, provoca un daño celular denominado estrés oxidativo. Los oxidantes se forman



como un producto anormal del metabolismo aeróbico y bajo condiciones fisiopatológicas se generan grandes cantidades en poco tiempo. Los antioxidantes son por definición “una sustancia”, de naturaleza enzimática o no enzimática, que disminuye o inhibe significativamente la oxidación de un sustrato (138).

Hace un siglo se formuló la “hipótesis de la tasa de la vida”, que indica que la tasa metabólica de un individuo determina su esperanza de vida en base a que los organismos con tasas metabólicas más altas suelen tener una esperanza de vida más corta (139). En los años 50 la “teoría de los radicales libres” para el envejecimiento de *D. Harman*, especuló que los radicales de oxígeno endógenos eran generados en las células y creaban un patrón de daño acumulativo (140). Esta teoría creó mucha controversia por el nuevo concepto de oxidantes endógenos, aunque posteriormente fue aceptada por la identificación de la enzima superóxido dismutasa 2 (SOD2), cuya única función es eliminar los aniones superóxido (O_2^-) (141).

Actualmente, estas teorías se consideran sinónimas ya que cuanto mayor es la tasa metabólica de un organismo, mayor es la producción de ROS y menor es la esperanza de vida. Sin embargo, este hecho no se cumple en todas las especies, por ejemplo los primates tienen una esperanza de vida más alta de lo que su tasa metabólica predeciría. Un análisis pormenorizado de la producción de oxidantes, demostró que a una tasa metabólica dada, las mitocondrias de especies longevas y con una tasa metabólica alta, tienden a producir menos ROS (142). Esto indica que es la baja producción de ROS lo que favorece la longevidad (143). Independientemente de cómo o dónde se generan los oxidantes, un aumento de su frecuencia intracelular tiene dos efectos principales: daño celular y señalización de vías específicas. Ambos efectos influyen en numerosos procesos celulares asociadas al envejecimiento (139).

1.5.1 RELEVANCIA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ARTROSIS

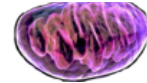
El cartílago articular es un tejido avascular que se nutre por difusión del líquido sinovial principalmente, sus niveles de oxígeno (O_2) son bajos, entre el 1-6% (144), y preferentemente utiliza la vía anaeróbica para metabolizar la glucosa a lactato por medio de la glucólisis (145). Aunque los condrocitos pueden sobrevivir largos períodos en anoxia, las bajas concentraciones de O_2 condicionan su metabolismo, la expresión génica y la morfología del condrocito que, en respuesta, produce citoquinas (144) que provocan la degeneración del cartílago por la degradación de la matriz extracelular (146).

Los estudios sobre el consumo de O_2 y el metabolismo de la glucosa y el lactato en el cartílago sugieren un cambio en las vías de obtención de energía según el ambiente de O_2 . Es decir, en ambientes hipóxicos los condrocitos realizan una glucólisis anaeróbica mientras que, en concentraciones fisiológicas de O_2 combinarían el metabolismo aeróbico y glucolítico para la obtención de energía (147). El metabolismo del O_2 en las células aeróbicas durante la OXPHOS no reduce completamente el O_2 a H_2O , sino que también forma ROS. Una reducción incompleta del O_2 para producir ROS podría explicar por qué el condrocito consume y necesita O_2 , teniendo en cuenta el papel fisiológico de los ROS como mediadores de señalización celular a pesar de su implicación en el progreso de la enfermedad artrósica (144).

En el desarrollo de la artrosis se ve implicado también el factor mecánico; las tensiones mecánicas ejercidas sobre el cartílago articular disminuyen las actividades celulares de los condrocitos e inducen la producción de factores catabólicos, como las citoquinas inflamatorias y las quimiocinas (94,95), y cantidades en exceso de ROS (150). Las tensiones mecánicas disminuyen la actividad de los condrocitos, la producción de componentes de la matriz extracelular del cartílago e inducen la apoptosis celular, además de causar la degeneración/destrucción de la estructura del cartílago articular (150–152).

El incremento de los niveles de ROS está relacionado con un aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias como la interleuquina 1 beta ($IL1-\beta$), implicada en la degeneración del cartílago, ya que induce la pérdida de proteoglicanos y la degradación de la matriz (146). Diversos estudios han demostrado que la degradación del cartílago articular está mediada parcialmente por ROS (153,154), y niveles elevados y crónicos de estas especies reactivas pueden provocar un importante daño oxidativo en el ADN causando apoptosis, lo que contribuye al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades degenerativas (155,156).

Estas lesiones oxidativas en el ADN se acumulan en el genoma nuclear y mitocondrial durante el proceso de envejecimiento (157), lo que inhabilita a su vez las proteínas de reparación del ADN (158). Además, se ha identificado una disminución de la expresión de los genes antioxidantes en el cartílago artrósico, lo que contribuye al incremento del estrés oxidativo (159). La acumulación de estas lesiones oxidativas en el ADN provocan un mal funcionamiento de la célula, lo que podría explicar el incremento de la incidencia de la artrosis con la edad (146).



1.5.2 EL ÓXIDO NÍTRICO

El NO es un radical libre gaseoso que se sintetiza mediante la conversión de L-arginina en NOH-arginina y posteriormente en L-citrulina + NO. La reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (160). De forma general una vez sintetizado, el NO difunde hacia el exterior de la célula y activa la guanilato ciclasa cíclica soluble (SGC) para producir guanosin monofosfato cíclico (GMPc) a partir del guanosin trifosfato (GTP). La GMPc se une específicamente a proteínas diana como las quinasas, fosfodiesterasas y canales de iones nucleares que provoca numerosos efectos biológicos (161).

Los condrocitos, al ser estimulados con IL1- β producen altos niveles de NO (162), además la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) está sobre-expresada en los condrocitos artrósicos resultando en un exceso de producción de NO, lo que provocará a su vez la estimulación de citoquinas inflamatorias así como otros procesos catabólicos (163). El NO inhibe la síntesis de proteoglicanos y de colágeno (164), activa las MMPs, media en la apoptosis celular y promueve las respuestas inflamatorias de los condrocitos. Además, entre los efectos más nocivos del NO en el cartílago articular, se encuentra su habilidad para unirse a aniones O_2^- formando el radical peroxinitrito ($ONOO^-$) (146). Este compuesto es un potente oxidante que se une a los residuos de tirosina en proteínas para formar 3-nitrotirosina (3-NT) (165), y su presencia se ha relacionado con el envejecimiento y la artrosis, lo que sugiere que el daño oxidativo causado por $ONOO^-$ contribuye también al desarrollo de la enfermedad con la edad (166).

El NO es mediador de los efectos de citoquinas inflamatorias como la IL1- β y el TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), que se ha demostrado que desempeñan un papel patogénico en el desarrollo de la artrosis. También se ha identificado que el NO es un regulador positivo de las MMPs, lo que sugiere que controla la remodelación de la matriz (161). Por su parte, la prostaglandina E2 (PGE2) puede revertir la degradación de los proteoglicanos inducida por IL1- β en el cartílago artrósico. Y como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que existe una asociación negativa entre la producción de NO y la síntesis de proteoglicanos, y una relación positiva entre la producción de NO y la liberación de proteoglicanos, lo que sugiere que el NO ayuda a la PGE2 en la modulación de la degradación de proteoglicanos (167,168). Además, también se ha indicado que el NO está relacionado con la apoptosis, proceso central característico de la artrosis, y se ha demostrado que el NO endógeno o exógeno puede inducir apoptosis en los condrocitos a través de un mecanismo mitocondrial (169), donde se reduce el NO a nitrito por la citocromo c oxidasa (COX2) (170). Por otro lado, el NO

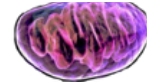
también inhibe la producción de ATP al competir con el O_2 para unirse a COX2 en la mitocondria, inhibiendo así el transporte de electrones y la generación de ATP (171).

1.5.3 LA MITOCONDRIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

Las mitocondrias son orgánulos celulares presentes en todas las células eucariotas, cuyo origen proviene de la fusión entre una célula eucariótica y una α -protobacteria capaz de realizar la OXPHOS. Las mitocondrias son los orgánulos transductores de energía de las células eucariotas, donde convierten los metabolitos primarios en moléculas de alta energía, ATP, por el acoplamiento entre el transporte de electrones y OXPHOS. Estos orgánulos tienen una doble membrana, la membrana externa que separa la mitocondria del citosol, y la membrana interna, que se invagina para formar las crestas mitocondriales, donde se encuentran cinco complejos enzimáticos que forman parte de la cadena de transporte de electrones (CTE) (172).

El sistema OXPHOS consiste en dos subsistemas, la CTE, que abarca los complejos I-IV, y la ATP sintasa o complejo V (Figura 7). La CTE tiene sus complejos enzimáticos respiratorios colocados en una orientación específica en la membrana mitocondrial interna. El trasvase de electrones entre estos complejos, libera energía que es almacenada en forma de gradiente de protones. Estos electrones proceden del $NADH^+$ (dinucleótido reducido de nicotinamida y adenina) y del $FADH_2$ (dinucleótido de flavina y adenina) los cuales son producidos por la oxidación de nutrientes como la glucosa, ácidos orgánicos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o de las grasas por la β -oxidación. La energía que se libera a medida que los electrones fluyen por la CTE se utiliza para bombear protones fuera de la matriz mitocondrial interna a través de los complejos I, III y IV, pero no a través del complejo II. La energía potencial almacenada se utiliza entonces para activar el complejo V, la ATP sintasa, para condensar ADP (adenin difosfato) + P_i (fosfato) y formar ATP. El ATP es exportado al citosol por un translocador de nucleótidos de adenina, en retorno de ADP del citosol (173,174).

Además, el sistema OXPHOS regula otras funciones como el transporte iónico, el intercambio de metabolitos, la entrada de proteínas o la fusión mitocondrial, por lo que un defecto en este proceso puede causar fallos a nivel celular (175). Su regulación se lleva a cabo tanto por el ADN nuclear como por el mitocondrial, siendo el genoma nuclear el que codifica la mayoría de las subunidades que forman los diferentes complejos (176). Por otro lado, el sistema OXPHOS es una



de las principales fuentes de generación de ROS ya que en torno al 3% del O_2 consumido se reduce de forma incompleta generando O_2^- en vez de H_2O (139,177). Esta producción de ROS, se contrarresta con un sistema de defensa antioxidante que incluye las enzimas superóxido dismutasas (SOD), catalasa y las glutatión peroxidasas (GPx). Las SOD convierten el O_2^- en H_2O_2 , mientras que la catalasa y la GPx convierten el H_2O_2 en H_2O (139). El equilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo. Las consecuencias celulares de este estrés incluyen la modificación de proteínas, la lipoperoxidación o la oxidación del ADN (139,176).

Una diana importante tanto de ROS como de las especies reactivas del nitrógeno (RNS) es el ADNmt (82), ya que en la mitocondria el proceso de reparación del ADNmt es poco eficiente y, además, éste carece del empaquetamiento con histonas que sí tiene el ADN nuclear (178). El daño oxidativo inducido por ROS es una fuente importante de inestabilidad genómica mitocondrial que conduce a la disfunción respiratoria y se ha indicado que es uno de los factores más importantes en el envejecimiento (178); además, en el caso de los condrocitos artrósicos se ve comprometida su función por los daños producidos en su ADNmt (179).

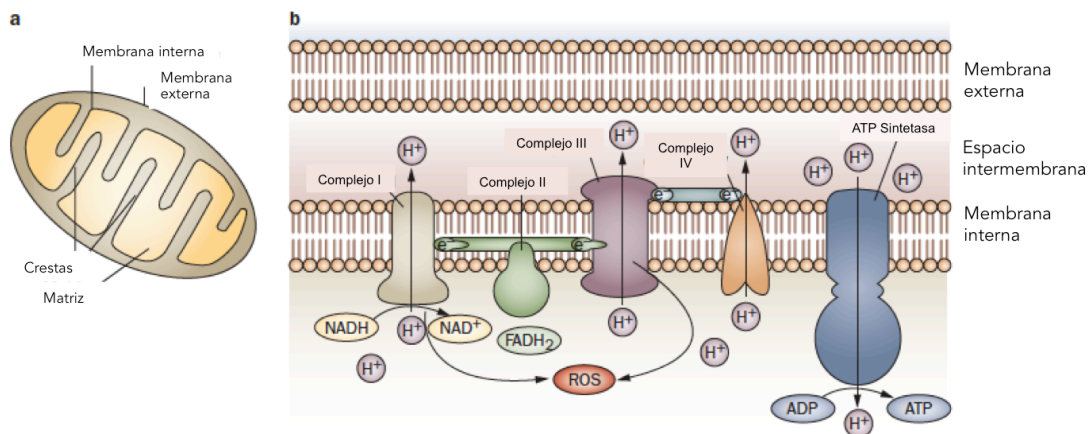


Figura 7: Estructura y función de las mitocondrias. (a) Estructura de las mitocondrias. La membrana mitocondrial externa envuelve el orgánulo entero, la membrana mitocondrial interna está compartimentada en crestas, que expanden la superficie de la membrana mitocondrial interna y aumentan su capacidad para generar ATP. Contiene proteínas que realizan las reacciones de oxidación de la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP (OXPHOS). (b) La cadena de transporte de electrones (CTE). Tres moléculas de NADH y una molécula de FADH₂ donan electrones a los demás complejos de proteínas, que usan la energía liberada para bombear protones al espacio intermembrana, lo que crea un potencial de membrana que se utiliza para convertir ADP en ATP. Las fugas de electrones de la cadena de transporte de electrones puede resultar en la producción de ROS. Modificado de Blanco, F. J. et al. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 161–169 (2011).

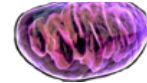
1.5.4 LA MITOCONDRIA EN LA ARTROSIS

Las alteraciones mitocondriales han sido implicadas en eventos de apoptosis, envejecimiento y diversas patologías complejas humanas, como parkinson, alzheimer y también artrosis (180). En el caso de la artrosis, las alteraciones en algunas funciones mitocondriales como la producción de ATP, la modulación de los niveles de Ca^{+2} y el estado redox de la mitocondria podrían explicar algunos mecanismos por los cuales se induce la degradación del cartílago por los condrocitos; así como el incremento del estrés oxidativo, la producción de citoquinas y la consecuente inflamación mediada por la degradación de la matriz, la calcificación y el aumento de muerte celular (180).

La producción de ATP en los condrocitos se genera a través de la glucólisis produciendo ácido láctico (180), y por OXPHOS, que puede representar hasta un 25% de la producción de ATP en el cartílago (181,182). El análisis de la actividad de los complejos mitocondriales reveló que los condrocitos artrósicos muestran una disminución de los complejos I, II y III y un aumento de la actividad citrato sintasa, que sugiere que la masa mitocondrial está aumentada en comparación con las células sanas (183), lo que podría ser un mecanismo compensatorio frente a la deficiencia en la transferencia de electrones y la baja producción de ATP (180). Recientes hallazgos mostraron que la hipoxia modula el proteoma del condrocito artrósico y sano, incluyendo algunas proteínas mitocondriales, e indicando una menor capacidad de reacción por parte de los condrocitos artrósicos en un ambiente hipóxico (184).

Se ha establecido que la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) es la principal fuente de producción de ROS (185) y que la inhibición de los complejos III y V de la CRM provoca una mayor respuesta inflamatoria potencialmente relacionada con la producción de ROS (186). Varios estudios en condrocitos articulares humanos han indicado que el uso de inhibidores específicos de la CRM suprimieron la síntesis de proteoglicanos y colágeno (181,187,188) y la inhibición del complejo I con rotenona mostró una reducción de proteoglicanos en el cartílago y aumentó la liberación de GAGs (188).

La función mitocondrial está correlacionado con la acumulación de deleciones y mutaciones puntuales en el ADNmt (189). Además, la acción de ROS sobre el ADNmt provoca un daño en su estructura, generando mutaciones que afectan a la CTE lo que conlleva una disfunción en la respiración mitocondrial y un aumento de la producción de ROS. Esto da lugar a una retroalimentación positiva entre el daño en el ADNmt y la producción de ROS que se conoce como círculo



vicioso de daño sobre el ADNmt mediado por ROS (190). Para evitar este daño, la mitocondria se protege con la enzima SOD2. Una deficiencia completa de SOD2 en ratones, mostró una inhibición sustancial de la respiración y un aumento de la permeabilidad mitocondrial; mientras que la deficiencia parcial de la enzima generó un aumento de la pérdida de protones, además de una inhibición de la respiración y una acumulación temprana y rápida del daño oxidativo mitocondrial (191). Además, un estudio proteómico a nivel de la capa superficial del cartílago artrósico, ha mostrado una disminución de la expresión proteica de SOD2 e identificaron un total de 23 proteínas mitocondriales con una expresión significativamente alterada, las cuales estaban implicadas fundamentalmente en la respuesta al estrés oxidativo, la producción de energía, la organización de la membrana mitocondrial y la apoptosis (192–194). Por otro lado, en un estudio que evaluaba los niveles séricos de SOD2, mostró que en pacientes artrósicos se encontraban más altos que en controles sanos. Este aumento podría ser debido al propio proceso artrósico ya que, en ese mismo estudio, se identifica una relación directa entre los niveles en suero de la enzima y el grado K-L, de modo que cuanto mayor es el grado K-L, mayor es el nivel sérico de SOD2 (195).

La presencia de citoquinas inflamatorias provoca alteraciones en la mitocondria y produce un exceso de NO, aunque el mecanismo exacto de regulación sigue siendo desconocido (196,197), se teoriza sobre la intervención de la actividad del complejo IV y la disminución del potencial de membrana mitocondrial necesario en el sistema OXPHOS (183). Además se ha encontrado que las citoquinas inflamatorias producidas en el líquido sinovial de articulaciones afectadas, como IL-1 β y TNF- α , alteran la actividad mitocondrial en condrocitos sanos y artrósicos induciendo daño en el ADNmt (197). En los condrocitos humanos estas citoquinas pueden disminuir la producción de ATP por inhibición de la actividad del complejo I en la CRM, así como reducir el potencial de membrana mitocondrial (188,197). Otra molécula con actividad catabólica es PGE2, que disminuye la generación de potencial de membrana y de ATP (198) y se ha observado que las mitocondrias de condrocitos artrósicos son más susceptibles a la apoptosis por el daño en el ADNmt al ser estimuladas con citoquinas inflamatorias (197).

Las mitocondrias también son las responsables de mantener la homeostasis celular del Ca⁺² y de su transporte celular, con un papel importante en la calcificación de la matriz extracelular en el condrocito (199,200), de hecho, se han encontrado gránulos mitocondriales con Ca⁺² y fósforo en la mitocondria (199). Cuando la respiración mitocondrial es suprimida, se promueve la

mineralización y se ha indicado que las mitocondrias son las responsables de este proceso (181,182). Un reciente estudio ha señalado que la integridad del ADNmt también es esencial en el mantenimiento de la matriz extracelular del cartílago (177), de hecho, se ha relacionado el daño oxidativo a nivel del ADNmt con el proceso artrósico ante la evidencia de que los pacientes artrósicos presentan mayores niveles de daño en el ADNmt que los sujetos sanos (201).

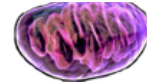
La mitocondria es un orgánulo clave en la regulación de las vías apoptóticas dependientes e independientes de caspasas (202–204). Se ha demostrado también que la inhibición de algunos complejos mitocondriales provoca un aumento de los procesos inflamatorios, induce la síntesis de MMPs, así como de proteínas proinflamatorias, una inhibición en la síntesis de proteoglicanos, un exceso de producción de ROS y NO y daño en el ADNmt provocando en última instancia la muerte celular. Por tanto la vía mitocondrial sería una de las principales vías de muerte celular en el condrocito artrósico (183,205). Con todos estos antecedentes y hallazgos sobre la influencia de la mitocondria en el proceso artrósico, el control efectivo de los procesos mitocondriales representa una alternativa terapéutica para los pacientes con artrosis (206).

1.5.5 HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES

La mitocondria es un orgánulo clave en el proceso artrósico y su genoma es relevante tanto en el desarrollo de la enfermedad como en el diagnóstico, ya que se ha descrito que los haplogrupos del ADNmt podrían ser utilizados como biomarcadores útiles para el diagnóstico y pronóstico de la artrosis e incluso podrían ser adecuados para definir fenotipos específicos de la enfermedad. Son, por tanto, una herramienta de gran utilidad para detectar la enfermedad en sus estadios iniciales y la evolución (83,207,208).

El genoma mitocondrial es una molécula circular de doble cadena de 16.569 pares de bases (pb) (209), que codifica para 13 polipéptidos de las subunidades de los complejos que forman la CTE, 22 son ácidos ribonucleicos (ARN) de transferencia (ARNt) y 2 ARN ribosómicos (ARNr), el 12s y el 16s (210) (Figura 8). Los componentes de la CTE son codificados en su mayoría por el genoma nuclear, sin embargo, el genoma mitocondrial codifica para 13 polipéptidos que forman parte de los siguientes complejos:

- **Complejo I** (NADH deshidrogenasa) subunidades: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6.
- **Complejo III** (citocromo b óxido-reductasa): Citocromo b (Cyt b).



- **Complejo IV** (citocromo c-oxidasa) subunidades COI, COII y COIII.
- **Complejo V** (ATP sintetasa): ATPasa-6 y ATPasa-8.

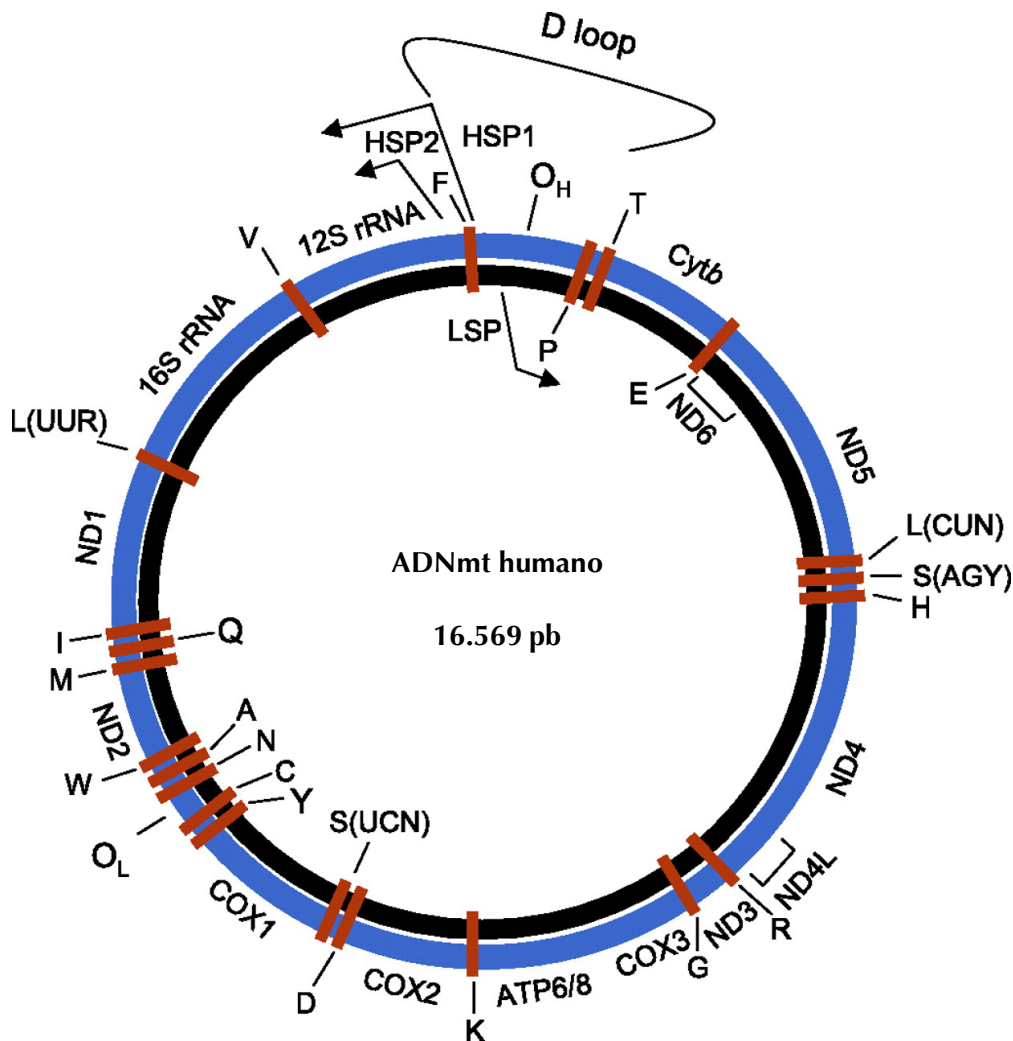


Figura 8. Representación esquemática del genoma mitocondrial humano. La organización genómica y las características estructurales se representan en un mapa genómico circular que muestra hebras pesadas –H– (azules) y ligeras –L– (negras). Los genes de codificación de proteínas y ARNr se intercalan con 22 genes de ARNt (barras rojas indicadas por el código de aminoácidos de una sola letra). Los genes de ARNt duplicados para leucina (L) y serina (S) se distinguen por su reconocimiento de codones indicado entre paréntesis. La región reguladora *D-loop* contiene los promotores de las hebras –L y –H (LSP, HSP1 y HSP2), las flechas muestran la dirección de la transcripción. El origen de la replicación de la hebra-H (OH) está dentro de la región *D-loop*, mientras que el de la hebra –L (OL) se encuentra dentro de un grupo de cinco genes ARNt (W, A, N, C, Y). Los genes codificantes de proteínas incluyen el citocromo c-oxidasa (COX): subunidades 1, 2 y 3, NADH deshidrogenasa (ND) 1, 2, 3, 4, 4L, 5, y 6; ATP sintetasa (ATPS) 6 y 8; citocromo b (Cyt b). Modificado de *Richard C. Scarpulla physiol. Rev.* 2008; 88:611-638.

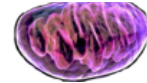
En una célula somática de mamíferos hay miles de copias del ADNmt empaquetados en los nucleoides (211), cada mitocondria lleva entre 2-10 copias por orgánulo de su genoma y debido a su alta tasa de mutación, el ADNmt puede variar dentro de una misma célula y dependiendo de las necesidades energéticas de la célula o del tejido donde está la célula incluido. (212,213). El genoma mitocondrial no posee histonas y sus mecanismos de reparación son menos

eficientes que los del genoma nuclear, lo que genera una alta tasa de mutación, entre 5 y 10 veces mayor que en el genoma nuclear (214). Además, debido a su proximidad a la fuente de generación de radicales libres presenta una mayor exposición a ROS, lo que puede dañar el material genético provocando una menor eficiencia energética (215).

Debido a su elevada tasa de mutación, el ADNmt ha acumulado secuencialmente a lo largo de la evolución de los linajes maternos un número sustancial de mutaciones. Esto ha permitido subdividir a las poblaciones en una serie de agrupaciones con características genéticas comunes en base a su ADNmt; estos grupos definidos de ADNmt se denominan haplogrupos mitocondriales. La mayoría de los haplogrupos son continente específicos y su herencia es por vía materna (216). Sabiendo que el origen de nuestra especie procede de África, la considerada “Eva mitocondrial” habría vivido en África hace 200.000 años y por medio de estudios filogeográficos se identificó el árbol de haplogrupos de ADNmt. Los distintos haplogrupos se generaron a partir de las migraciones del ser humano hacia otros continentes, donde el hombre al volverse sedentario permitió que las mutaciones del ADNmt se fijaran. Al representar la distribución de los haplogrupos a nivel mundial (Figura 9), se distinguen tres ramas principales: una africana (África subsahariana), una asiática (Asia del este) y otra europea (continente europeo) (217).

Los haplogrupos africanos se distribuyen en siete familias (L0, L1, L2, L3, L4, L5 y L6) y hace 85.000 años la línea L3 se subdividió para dar lugar al resto de haplogrupos no africanos, lo cual fue causado probablemente por los cambios climáticos producidos por el último período glacial. Hace 60.000 años la subdivisión de la familia L3 en tres subgrupos, M, N y R, dio lugar a los principales haplogrupos asiáticos que a su vez generaron subtipos que poblaron América. Los haplogrupos europeos aparecieron hace 45.000 años a partir de las ramas N y R (217), y en la actualidad el 95% de los europeos pertenecen a alguno de estos nueve haplogrupos: H, I, J, K, T, U, V, W o X (41). Los haplogrupos que tienen un origen filogenético común, es decir, con una serie de polimorfismos hereditarios que les otorgan unas características diferenciadoras, se pueden agrupar en “clusters”.

Una de las teorías propuestas para explicar el origen de los diferentes haplogrupos mitocondriales y sus diferentes características moleculares y metabólicas fue propuesta por *Mishmar* y *Wallace*. En ella se postula que el origen de los haplogrupos sería la consecuencia de la adaptación a nuevos ambientes geográficos y climáticos donde se asentaron las poblaciones. Estas



adaptaciones fueron fijando las mutaciones del ADNmt más beneficiosas para la supervivencia de la población (218,219). El haplogrupo J, por ejemplo, presenta una serie SNPs característicos que reducen la eficiencia del acoplamiento del sistema OXPHOS reduciendo la producción máxima de ATP, manteniendo la CTE más oxidada, y disminuyendo así la producción de ROS a cambio de producir más energía en forma de calor (170,220). Este comportamiento podría ser perjudicial en el caso de patologías que se caractericen por un déficit energético, pero a la vez sería beneficioso en el caso de enfermedades degenerativas relacionadas con el estrés oxidativo (170,221).

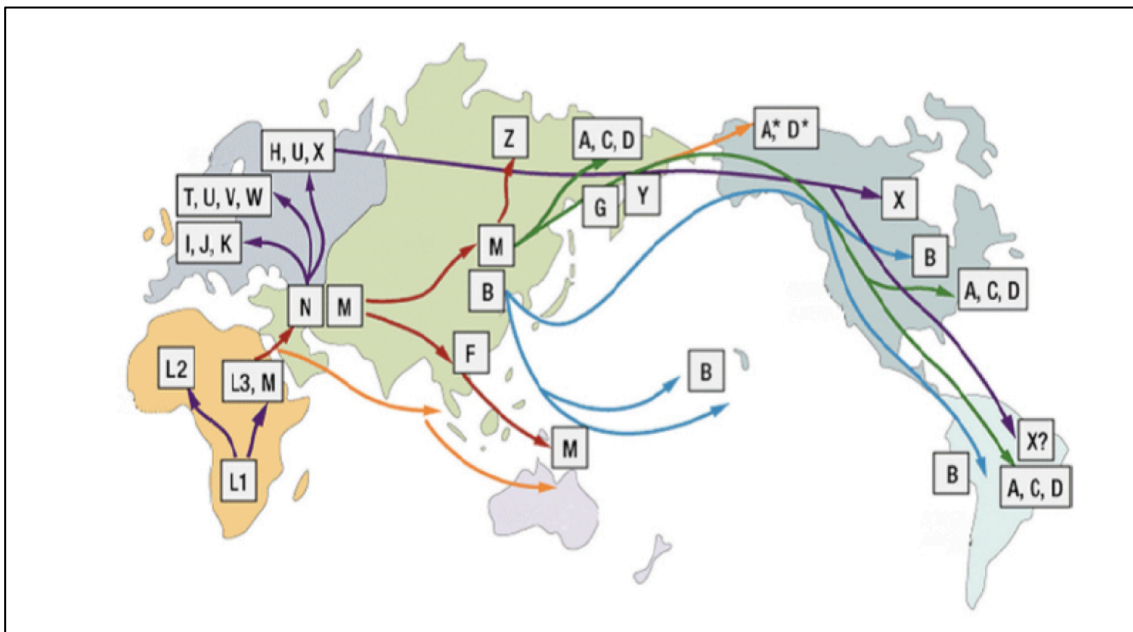


Figura 9. Distribución global de los haplogrupos. Mapa de la distribución de los haplogrupos desde el origen africano de la “Eva mitocondrial”, representando con flechas las distintas migraciones humanas. Tras el asentamiento de las poblaciones, las mutaciones se fueron acumulando en el ADNmt y se asociaron a una área geográfica dando lugar a los diferentes haplogrupos que existen en la actualidad. Imagen adaptada de *Family tree DNA* (<https://www.familytreedna.com>).

La asociación de las variantes genéticas del ADNmt con la susceptibilidad a ciertas enfermedades se ha identificado en un amplio rango de fenotipos clínicos (222); en la Tabla 4 se han resumido algunas de las asociaciones encontradas en la literatura. Se ha indicado que el riesgo de desarrollar enfermedades complejas está influenciado por múltiples factores genéticos y ambientales, que por lo general se comparten entre distintos fenotipos. Esto explica la posibilidad de que un determinado SNP se asocie con más de un fenotipo, revelando que ciertos haplogrupos se encuentren asociados con una serie de fenotipos, evento que se denomina como pleiotropismo (222), lo que subraya los límites difusos entre los fenotipos en general y las enfermedades en particular (223–225). Esto es especialmente cierto para trastornos complejos que comparten características

fenotípicas y que por lo tanto pueden también compartir los mismos mecanismos moleculares (226). La variación genética en el genoma mitocondrial humano constituye un caso extremo de pleiotropismo y subraya su implicación en un diverso repertorio de fenotipos (222).

Tabla 4. Asociación de variantes genéticas del ADNmt con ciertas enfermedades descritas en la bibliografía.

Patología	Haplogrupo	Efecto	Referencias
Aterosclerosis coronaria	A, M7a y T	Riesgo	<i>Sawabe et al (227), Kofler et al (228)</i>
Accidente cerebro vascular isquémico, Enfermedad coronaria	B5	Riesgo	<i>Jia et al (229)</i>
Progresión en SIDA	Cluster UK y H	Protección	<i>Hendrickson et al (230), Micheloud et al. (231)</i>
Longevidad (Asiáticos)	D	Prevalencia	<i>Alexe et al (232)</i>
Diabetes	D4	Protección	<i>Martikainen et al. (233)</i>
Cáncer de tiroides	D4a	Riesgo	<i>Fang et al. (234)</i>
Hipertensión	D5a y G2a1	Riesgo	<i>Chen et al. (235), Lu et al. (236)</i>
AMD (degeneración macular)	H	Protección	<i>Jones et al. (237)</i>
Parkinson	H y cluster HV	Riesgo	<i>Khusnutdinova et al (238), Gaweda-Walerych et al (239)</i>
Retinopatía diabética	KU	Protección	<i>Estopinal et al (242)</i>
Ataxia de Friedich	U	Retrasa la edad de aparición	<i>Giachetti et al (243)</i>
Sepsis	cluster TJ	Protección	<i>Lorente et al (244)</i>
Aterosclerosis e infarto de miocardio, cáncer nasofaríngeo, miocardiopatía dilatada idiopática, hipertrófica o isquémica, retinopatía diabética	H	Riesgo	<i>Palacin et al. (245); Hu et al. (246); Fernández-Caggiano et al. (32); Hagen et al (247); Fernández-Caggiano et al (248), Estopinal et al. (242)</i>
Distrofía endotelial de Fuchs	I	Protección	<i>Li et al. (249)</i>
Artrosis de cadera	J	Protección	<i>Rego-Perez et al. (250)</i>
Enfermedad de Lhon	J	Riesgo	<i>Brown et al. (251); Torroni et al (252)</i>
Hipertensión	J	Menor presión arterial	<i>Rea et al. (253)</i>
Artrosis de rodilla	J, B	Protección	<i>Rego-Perez et al (208), Fang et al</i>
Obesidad	T	Riesgo	<i>Nardelli et al (254)</i>
Alzheimer y Parkinson	tRNAGln 4336A>G	Riesgo	<i>Santoro et al (240), Coskun et al (241)</i>

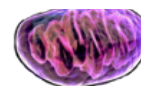


Tabla 4. (continuación) Asociación de variantes genéticas del ADNmt con ciertas enfermedades encontradas en la bibliografía.

Patología	Haplogrupo	Efecto	Referencias
Alzheimer y Parkinson, Miocardiopatía hipertrófica	J + Cluster UK	Protección	<i>Chezzi et al (260); van der Walt et al (261); van der Walt et al (262); Christiansen et al (263)</i>
Longevidad (Europeos)	J	Prevalencia	<i>De Benedictis et al (255); Niemi et al (256); Rose et al (257)</i>
Longevidad (Europeos)	J2 & U3, CR 150C>T	Prevalencia	<i>Chen et al (258)</i>
Melas, miocardiopatía isquémica	J	Protección	<i>Pierron et al. (259); Fernández-Caggiano et al (248)</i>
Progresión en SIDA	J y T	Riesgo	<i>García-Álvarez et al (264)</i>
AMD, pigmentación de retina	J y U	Riesgo	<i>Udar et al (265); Jones et al (237)</i>
Diabetes	J, B4, G3, E2, V y U	Riesgo	<i>Crispim et al (266), Soini et al (267), Loo et al (268), Liou et al (269)</i>
Diabetes (Asiáticos)	N9a	Protección	<i>Fuku et al (270)</i>
Cáncer de mama	N, 10398G>A (A>T); M, D5, H, X y K	Riesgo	<i>Darvishi et al (271), Fang et al (234), Gutierrez-Povedano et al (272), Tipirisetti et al (273)</i>
Cáncer de mama	U	Protección	<i>Bai et al (274)</i>
Ataxia de Friedich y Enfermedad de Huntington	H	Adelanta la edad de aparición	<i>Arning et al. (275)</i>
Cáncer renal y de prótata, diátesis atópica, Esclerosis Múltiple, pérdida auditiva, obesidad	U	Riesgo	<i>Booker et al (276); Raby et al (277); Ban et al (278); Manwaring et al (279); Knoll et al (280); Yang et al (281)</i>

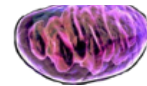
En cuanto a la patología artrósica se ha observado que los portadores del haplogrupo mitocondrial J muestran un menor riesgo de padecer artrosis de rodilla e incluso en aquellas personas que la manifiestan, la severidad es menor (208). El efecto protector del haplogrupo J fue replicado en una cohorte de pacientes con artrosis de cadera (250) y posteriormente en una cohorte de pacientes de cadera y rodilla (84,282). También se ha descrito en una cohorte española que los pacientes que pertenecen al *cluster* TJ presentan una progresión radiológica significativamente más lenta y, en el caso del haplogrupo H, se observó que estos pacientes tenían un mayor riesgo de sufrir una operación de reemplazo articular (283). Otro estudio prospectivo a 4 años realizado en la cohorte americana de la *Osteoarthritis Initiative* (OAI) demostró que los portadores del haplogrupo T presentaban una menor tasa de progresión, tanto a

nivel del grado K-L, como de la reducción de espacio articular, presencia de osteofitos y desarrollo de esclerosis subcondral. Además, se observó que los portadores de este haplogrupo también mostraban una menor tasa de pérdida de volumen y grosor de cartílago en comparación con el H en diferentes zonas del compartimento medial de la articulación (83,84,283,284).

Por otro lado, se ha publicado que los haplogrupos H y J modulan de manera diferencial los niveles séricos de biomarcadores del colágeno tipo II. Los sujetos portadores del haplogrupo H muestran niveles más altos y los portadores del haplogrupo J niveles más bajos (285). Además, los haplogrupos mitocondriales también condicionan los niveles en suero de algunas MMPs, de manera que sólo los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo H muestran niveles más elevados de metaloproteinasa 3 (MMP-3) en comparación con los sanos con el mismo haplogrupo; mientras que, para la MMP-13, aún mostrando valores significativamente más elevados en pacientes con artrosis que en individuos sanos, estos niveles eran menores en los portadores del haplogrupo J en comparación a los portadores del haplogrupo H. (286).

El supuesto menor daño oxidativo asociado a determinados haplogrupos mitocondriales se refleja también en la longitud de los telómeros y en la producción de NO; un estudio reciente puso de manifiesto que los portadores del haplogrupo J mostraban un menor acortamiento en la longitud de sus telómeros, así como una menor producción de NO en condrocitos articulares (170). El diferente metabolismo mitocondrial asociado a los haplogrupos podría explicar los hallazgos previamente descritos, ya que un funcionamiento diferente del sistema OXPHOS puede causar que los portadores del haplogrupo J presenten un menor consumo de O₂ así como un menor daño oxidativo (84,287–289).

Los haplogrupos tienen unas características genéticas comunes con un número sustancial de mutaciones no patológicas que les confieren unas características metabólicas particulares, pudiendo influir tanto de manera positiva como negativamente en el desarrollo de una patología (290). Recientemente, el uso de cíbridos transmitocondriales se ha revelado como un modelo celular interesante para evaluar el efecto funcional de las alteraciones genéticas mitocondriales en un fondo nuclear común en aspectos relacionados con el comportamiento de la célula como el metabolismo, la expresión génica, la respiración celular, etc. Los cíbridos transmitocondriales son líneas celulares que consisten en mitocondrias de distintas fuentes en un fondo nuclear definido y uniforme, que permiten el estudio real del papel de diferentes SNPs del ADNmt en un fondo nuclear idéntico y también proporcionan información sobre las primeras etapas de la



patogénesis de la enfermedad que no están disponibles a partir de especímenes patológicos (84).

En diferentes estudios se encontraron diferencias en los niveles de ADNmt así como en la expresión de genes mitocondriales, la síntesis de proteínas mitocondriales, la actividad y cantidad de citocromo oxidasa, el consumo de O₂ y el potencial de membrana interna entre los híbridos portadores del haplogrupo H frente a los portadores de los haplogrupos Uk, asociándose con un mayor riesgo a desarrollar enfermedades complejas los portadores del haplogrupo H (287). También se ha asociado el haplogrupo J con la disminución de la expresión de genes específicos relacionados con la respuesta inflamatoria, el complemento y la apoptosis en comparación con el haplogrupo H (291). En la artrosis se ha observado que los híbridos con el haplogrupo J, muestran un comportamiento fisiológico que podría condicionar el desarrollo de la enfermedad desde el punto de vista de una menor producción de ROS, una menor tasa de apoptosis así como una mayor supervivencia ante el estrés oxidativo en comparación con el haplogrupo H (84). Desde un punto de vista metabólico los haplogrupos H y J tienen también un comportamiento distinto: el haplogrupo H, en comparación con el J, presenta una mayor tasa de respiración mitocondrial y capacidad glucolítica, lo cual se refleja en una mayor generación de ATP; este hecho, unido a que el haplogrupo H presenta unos niveles elevados de aminoácidos conservados (218), podría determinar su eficiencia de acoplamiento y producción de ATP en el sistema OXPHOS (289), aumentando así la producción de ROS y el consumo de O₂ (84,220,289).

1.5.6 INTERACCIONES MITOCONDRIA-NÚCLEO

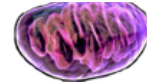
La mitocondria contiene su propio genoma pero depende del genoma nuclear para codificar el 99% de sus proteínas. Se cree que muchos de estos genes han migrado desde la mitocondria al genoma nuclear en un pasado lejano. Tras el descubrimiento de secuencias mitocondriales en el genoma nuclear del ratón, se han identificado las denominadas secuencias mitocondriales nucleares (NUMTs) en una amplia variedad de organismos eucariotas (292). En la especie humana, se han identificado en torno a 452 NUMTs, algunos de los cuales proceden de eventos de inserción independientes de la mitocondria, mientras que otros son el resultado de duplicaciones en tándem. De hecho el mayor NUMT humano encontrado cubre el 90% del genoma mitocondrial humano (293).

Por otro lado, el genoma mitocondrial codifica para 13 proteínas esenciales de las subunidades de los complejos de la CRM (294) y, aunque se desconoce el motivo

por el cual esta información genética no se transfirió al genoma nuclear, existen diferentes teorías que intentan dar una explicación al respecto. Una de ellas sugiere que esos genes mitocondriales no eran interpretables por el sistema citosólico y se “congelaron” en el ADNmt, mientras que otra teoría postula que esas proteínas se mantienen para asegurar que los complejos OXPHOS sólo se ensamblen en la membrana mitocondrial interna; una última teoría mantiene que las proteínas del ADNmt son demasiado hidrófobas para ser traducidas en el citosol y luego incorporadas a la membrana mitocondrial interna (174).

El genoma nuclear, además, codifica para las proteínas mitocondriales responsables de regular la expresión y la replicación del ADNmt, desempeñando así un importante papel en la regulación de la función del genoma mitocondrial (295). Esta vía se complementa con la regulación retrógrada de la expresión génica nuclear en respuesta a diversas señales originadas en la mitocondria (296,297). Así, el aumento de la expresión de genes nucleares en respuesta a un estado bioenergético mitocondrial alterado para compensar los efectos del estrés mitocondrial, se conoce como señalización retrógrada (294) (Figura 10). Diversas moléculas liberadas por las mitocondrias pueden actuar como mensajeros en la señalización retrógrada entre las que se incluyen ROS, Ca^{+2} , ATP, NAD^{+} o NADH (298). Estas señales pueden activar una amplia variedad de cascadas a través de una regulación génica o metabólica que, en última instancia, activa los sistemas de respuesta necesarios en cada caso: el sistema de defensa antioxidante, la activación de quinasas dependientes de Ca^{+2} , el aumento de la biogénesis mitocondrial, la regulación de OXPHOS o la autofagia (299). Estos sistemas de respuesta se han considerado además como un control de calidad que se basa en el mantenimiento de la integridad funcional a nivel molecular y celular. El control de calidad mitocondrial comienza con la biogénesis donde una transcripción deficiente del ADNmt genera una sobreproducción de proteínas mitocondriales codificadas por el núcleo (297) y su finalidad principal es restaurar la homeostasis mitocondrial y subsanar el fallo bioenergético y la muerte celular (213).

El estrés oxidativo es una condición ambiental donde los ROS producidos exceden la capacidad de las defensas antioxidantes para neutralizarlo. El incremento de los niveles de producción de ROS o RNS superiores a los necesarios para la señalización celular, son detectados por la célula y provocan la activación de distintos mecanismos para su eliminación (294). La primera línea de defensa está formada por enzimas antioxidantes como la SOD2, que convierte el O_2^- en H_2O_2 , para evitar que reaccione con el NO y forme ONOO^- , un potente RNS (300). Para evitar el daño oxidativo, el H_2O_2 es secuestrado y transformado por las enzimas peroxiredoxinas (Prx), GPxs o la catalasa. Las Prx tienen la



habilidad de oxidar otras proteínas, lo que se cree que forma parte de un mecanismo de señalización de respuesta a cambios ambientales, que modula procesos mitocondriales como el ciclo de los TCA y OXPHOS (301,302). En mamíferos se han identificado hasta ocho GPx distintas que son oxidadas por el H_2O_2 (303); ambas enzimas (Prx y GPx) se cree que funcionan como tampones que limitan los niveles de H_2O_2 en la inducción del estrés oxidativo. La catalasa convierte el H_2O_2 en H_2O y oxígeno y, aunque no está directamente relacionada con la función mitocondrial, forma parte de la defensa frente al estrés oxidativo y se ha demostrado que una disfunción en esta enzima afecta a la función mitocondrial (304).

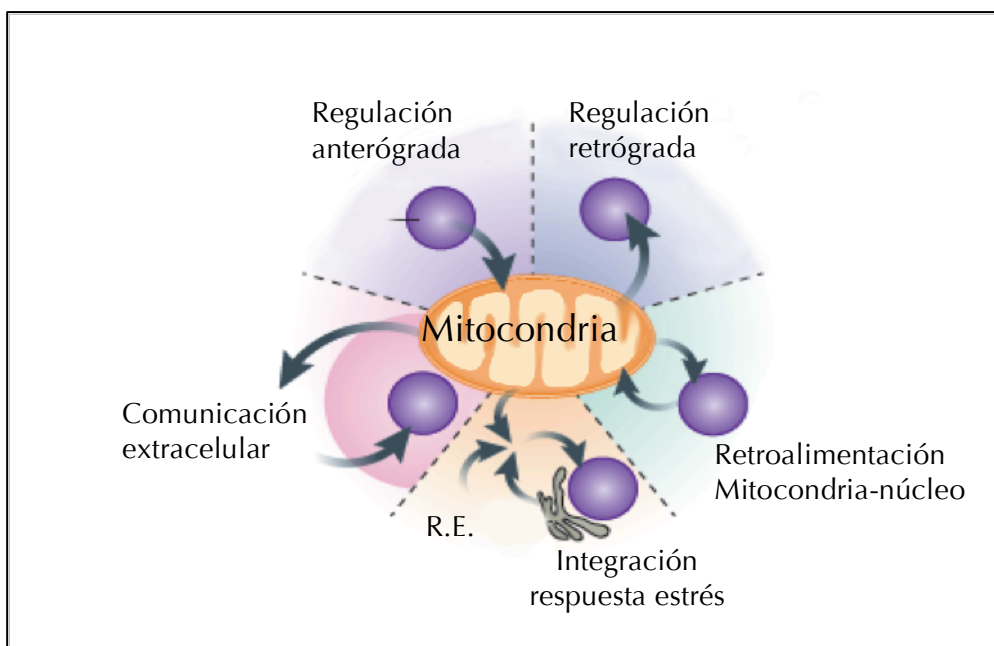


Figura 10. Esquema de comunicaciones entre la mitocondria y el núcleo. Tomando como centro la mitocondria, las señales enviadas desde el núcleo se consideran anterógradas y las enviadas desde la mitocondria se consideran retrógradas. A pesar de que las respuestas de retroalimentación mitocondria-núcleo pueden ser orquestadas bidireccionalmente, generalmente se originan en la mitocondria, y consecuentemente inducen una respuesta nuclear que está específicamente orientada hacia las mitocondrias. La integración de la respuesta al estrés es en general una vía de estrés celular que controla la síntesis de proteínas citosólicas; esta respuesta al estrés puede desencadenarse en las mitocondrias, en el retículo endoplásmico o en el citosol. La comunicación mitocondria-núcleo puede ser también extracelular así, la mitocondria puede enviar señales extracelulares conocidas como mitoquinas, que afectan a la regulación nuclear de una manera no autónoma a las células. Modificado de *Quiros PM, Mottis A, Auwerx J, Nature Rev. Mol. Cell Biology, 2016, 17: 213-226.*

La capacidad de detoxificación de ROS de las enzimas antioxidantes está influenciada por SNPs en los genes que las codifican. Se han descrito diferentes polimorfismos que pueden influir en la intensidad de los procesos inflamatorios (305). Durante la inflamación, las citoquinas aumentan la producción de ROS y activan la enzima iNOS para producir NO (306,307). La transcripción de iNOS está regulada por una repetición en tándem en el promotor del gen NOS2A

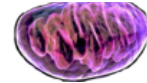
(Óxido Nítrico Sintasa 2A) de un pentanucleótido (CCTTT) que dependiendo del número de repeticiones totales modifica la producción de NO (308). Las citoquinas inflamatorias también estimulan otros procesos celulares como la vía del triptófano (vía de las quinureninas), esencial para la síntesis de proteínas. Recientemente, se ha relacionado esta vía con el estrés oxidativo ya que se ha descubierto que el ácido picolínico, producto principal de la enzima KYNU (*Quinureninasa*) potencia la expresión de la enzima iNOS (309).

La producción de H₂O₂ mitocondrial tiene un papel importante en la inducción de la autofagia (310). La autofagia es un sistema de defensa antioxidante esencial para la supervivencia, que elimina o recicla orgánulos dañados, englobándolos en un autofagosoma de doble membrana para su degradación en los lisosomas (311,312). En períodos de estrés, la autofagia es estimulada para mantener la función celular, evitando la acumulación de orgánulos no funcionales y potencialmente tóxicos, como por ejemplo la mitocondria, en cuyo caso el proceso se denomina mitofagia (294,313). Aunque se ha descrito que el gen CYTIP (proteína de interacción con citohesinas 1) actúa como una proteína de supervivencia celular en condiciones de estrés oxidativo, aumenta su expresión génica para proteger a la célula de las señales de muerte celular (314).

Otro mecanismo de control de calidad mitocondrial es la mitopsis, que se trata de un sistema en el que las células pueden eliminar las mitocondrias dañadas (315); un estado de baja energía celular generado por un estrés mitocondrial provoca un aumento de ROS que puede dañar la mitocondria y así activar la mitopsis, un proceso que puede actuar de forma independiente o en sintonía con la autofagia (316).

Para contrarrestar el estrés oxidativo y proteger a las células, la mitocondria también genera una respuesta temprana por medio de proteínas mitocondriales no empaquetadas (UPR^{mt}), que activan la expresión de chaperonas mitocondriales, requeridas para la activación de la fisión/fusión mitocondrial. La fusión puede compensar daños en orgánulos sanos por medio de la unión de partes dañadas del orgánulo, que se aíslan por fisión y eliminan por autofagia. Si la función mitocondrial no puede ser restaurada, se libera una señal de muerte desde la mitocondria para iniciar la mitopsis (317). Además se ha descubierto que la suplementación de cofactores como NAD, nicotinamida (NAM) y NAM ribosa induce la producción de UPR^{mt} y la respuesta oxidante (318).

Dentro del conjunto de señales de estrés mitocondrial que se generan dentro del genoma mitocondrial se encuentran los péptidos derivados de las mitocondrias (PDMs). La humanina es el primer PDM descubierto, y se libera durante el mal



funcionamiento de la mitocondria generando un aumento de las actividades citoprotectoras y la adaptación metabólica (319). Su secuencia tiene una similitud del 99% con el ARNr 16s mitocondrial (320), suprime la apoptosis, promueve la supervivencia celular durante el estrés (321) y está presente en el plasma humano por lo que se cree que las células humanas la secretan. Entre las actividades citoprotectoras descubiertas de la humanina se encuentra que es neuroprotector, que previene la progresión de placas ateroscleróticas, que protege frente a la diabetes en modelos de ratón, y además, se ha encontrado que los descendientes de individuos centenarios poseen unos niveles de humanina hasta tres veces más altos (322–325).

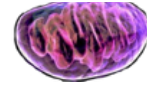
Las variaciones del genoma mitocondrial están específicamente asociadas con los fenotipos de una enfermedad. Las alteraciones de secuencia específicas en los componentes mitocondriales pueden afectar de distinta forma a la funcionalidad del orgánulo y su generación de energía (211). Se ha sugerido también que estas variaciones del ADNmt están sometidas a un efecto de epistasis mitocondrial-nuclear que podría explicar los diferentes efectos fenotípicos del ADNmt en los distintos individuos eclipsando los efectos reales del ADNmt en el envejecimiento o en una enfermedad (326). El ADNmt codifica para factores críticos del sistema OXPHOS y alteraciones a nivel molecular causan una variedad de enfermedades humanas mitocondriales y se relacionan también con el proceso de envejecimiento (327). Existe un gran número de mutaciones en el ADNmt que afectan a la función de la cadena respiratoria y a la síntesis de ATP (328), pero también en genes nucleares que codifican para subunidades estructurales (complejos I, II, III, IV y V) y factores de ensamblaje de OXPHOS (329). Estas alteraciones pueden afectar al sistema de mantenimiento, reparación y expresión del ADNmt (330), al transporte de nucleósidos (331) o a las proteínas de la membrana mitocondrial interna (332). Además, el genoma nuclear puede controlar la expresión fenotípica de mutaciones patológicas en el ADNmt potenciándola o reprimiéndola (329).

La capacidad del genoma mitocondrial para comunicarse y funcionar sinérgicamente con la expresión nuclear puede estar determinada también por alteraciones en secuencias específicas de los haplogrupos de ADNmt, que por un lado no son mutaciones patogénicas, pero se ha demostrado que tienen un impacto considerable en la función mitocondrial (333,334). Se ha propuesto que el haplogrupo heredado actúa como un “modificador” del genoma nuclear, con una interacción constante entre el ADNmt y el ADN nuclear, estableciendo el haplogrupo, una “línea base” bioenergética (producción de energía, rotación de ATP, etc.) que de alguna forma afecta a los niveles de expresión del ADN nuclear

de genes de vías específicas (inflamación, apoptosis, etc.) (291). Un ejemplo de esto son las mutaciones que diferencian a los subhaplogrupos J1 y J2, en los que sus variantes alteran los sitios de unión del complejo III de la bomba de protones del ciclo Q mitocondrial, lo que reduciría la eficiencia de acoplamiento del sistema OXPHOS disminuyendo la producción de ATP, aumentando así la generación de calor (219,220) y manejando de manera diferente el estrés oxidativo que el haplogrupo H (291). Además el haplogrupo J está asociado con una esperanza de vida mayor que el resto de haplogrupos lo que sugiere que el proceso de envejecimiento se ralentiza en este haplogrupo (256).

Un estudio realizado en atletas estudió el papel de los genotipos del gen ACTN3 (α -actinina 3), que ha mostrado una distribución diferente entre atletas de resistencia y velocistas, y los haplogrupos mitocondriales. Entre los velocistas, se encontró una alta frecuencia de los haplogrupos K y J2 que no estaba presente entre los atletas de resistencia, sugiriendo que el mayor desacoplamiento de la CTE de estos haplogrupos no era beneficioso para un alto rendimiento en deportes de resistencia. En cuanto a la distribución de los genotipos de ACTN3 reveló que, el genotipo RR estaba sobre-representado en los velocistas y ausente en los atletas de resistencia, sin embargo no se encontró una asociación significativa con los haplogrupos mitocondriales (129). Por otro lado, en la enfermedad de alzheimer se ha relacionado el papel de los genotipos de APOE con los haplogrupos mitocondriales, siendo el alelo APOE4 un conocido factor genético de riesgo para la enfermedad. En este trabajo se asoció el *cluster* HV con un mayor riesgo de desarrollar alzheimer según la presencia o ausencia del alelo ϵ 4, sugiriendo que el alelo del gen APOE tiene un efecto sinérgico con los haplogrupos mitocondriales (335).

Un estudio reciente resalta la influencia del ADNmt en el comportamiento del núcleo celular con resultados donde muestran que la sustitución del ADNmt es clave para promover diferencias en la respuesta adaptativa celular. Este fenómeno es orquestado por la compleja red de vías de respuesta al estrés mitocondrial en las que la proteostasis, las UPRmt y la señalización de ROS conducen a respuestas adaptativas que afectan al rendimiento metabólico y al envejecimiento del organismo (336). Se ha postulado también que las mitocondrias afectan directamente al *splicing* alternativo (AS), bien a través del impacto del suministro de energía en la maquinaria molecular como, indirectamente, a través de mecanismos altamente energéticos que juegan un papel esencial en el AS como son los mecanismos epigenéticos (337).



1.6 EPIGENÉTICA

La epigenética (literalmente, más allá de la genética) se define como cambios heredables en la expresión génica o en el fenotipo sin que ello implique cambios subyacentes en la secuencia del ADN (338). El término heredable se refiere a cambios principalmente entre células en división y a veces entre distintas generaciones, aunque en los mamíferos, la herencia trans-generacional es limitada ya que sólo las células germinales (gametos) pueden reiniciar su epigenoma antes de ser reprogramadas a células totipotentes (339). El código genético es idéntico para cada célula somática en el cuerpo, pero los cambios epigenéticos son confinados a células o tejidos específicos o incluso a células dentro de un mismo tejido (340).

1.6.1 MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Los mecanismos epigenéticos de regulación génica modulan la estructura de la cromatina y contribuyen a la regulación de procesos moleculares en el núcleo incluyendo transcripción, reparación y procesamiento del ARN (341). Existen tres mecanismos principales involucrados en la regulación epigenética: i) modificaciones post-transcripcionales de histonas, que alteran la conformación de la cromatina, ii) ARN no codificante (ej: los micro-ARNs) y iii) metilación del ADN (338).

1.6.2 MODIFICACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL DE HISTONAS

En los eucariotas, el ADN genómico está fuertemente enrollado alrededor de las histonas (H3, H4, H2A y H2B) para formar los nucleosomas. Se ha considerado a los nucleosomas como represivos de la transcripción, ya que regulan la expresión génica a través de la modificación enzimática post-traduccionales por procesos como la acetilación y la metilación (342). Estos procesos controlan las vías de señalización mediante el reclutamiento de factores de transcripción y coactivadores de regiones promotoras específicas (343) (Figura 11A).

La acetilación se produce en determinados residuos de lisina en las colas N-terminales de la histona, está mediada por las histonas acetiltransferasas (HAT), que aflojan la estructura formada por la histona y el ADN permitiendo el acceso de la maquinaria transcripcional (344). Las histonas desacetilasas (HDA), que revierten la acetilación eliminando el grupo acetilo resultando en una hipoacetilación, se engloban en dos tipos, las HDA clásicas (HDAC) que utilizan un mecanismo con zinc (345) y las HDA de sirtuina que requieren de NAD⁺

(346). La existencia de una interacción tan compleja entre las modificaciones en las histonas y el ADN aparece descrito en el cartílago articular, por ejemplo, a nivel de la regulación de la expresión de NFAT1 (factor nuclear 1 de activación de células T) (347) y SOX9 (*SRY-Box 9*) (348); ambos son importantes factores de transcripción que se unen a regiones promotoras de genes relacionados con la matriz extracelular. También se ha detectado una expresión diferencial de la histona HDAC-7, que es la histona encargada de regular la expresión de la MMP-13, entre el cartílago artrósico y el cartílago sano en rodilla (349). Por otro lado se ha descubierto que HDAC-1 y HDAC-2 están sobre-expresadas en condrocitos artrósicos (350), aunque la actividad HDAC es similar entre el tejido sinovial artrósico y normal (351). La actividad de las HDAC disminuye durante la desdiferenciación de los condrocitos asociado a una reducción de la expresión de COL2A1 (colágeno tipo II, cadena alfa 1), lo que sugiere que la actividad de HDAC es crucial en el mantenimiento del fenotipo del condrocito (352).

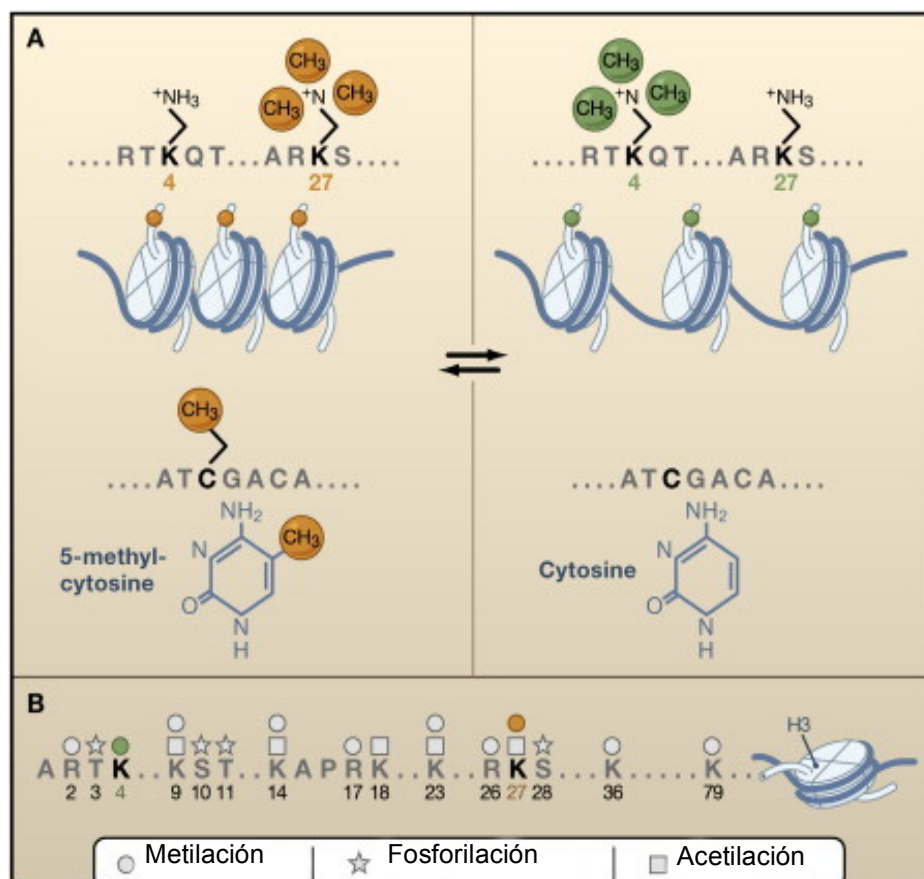
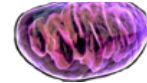


Figura 11. Modificaciones epigenéticas en citosina e histonas. A: Estructuras y efectos de la metilación de citosina: marcas naranjas indican represión y marcas verdes indican activación. B: diversidad de las modificaciones de las histonas H3 (acetilación, metilación y fosforilación). Modificado de *Bernstein E B, Meissner A, Lander E, Cell, 2007, 128: 669-681*.



La metilación histónica es importante para la formación de regiones genómicas inactivas y se asocia con la activación transcripcional y el silenciamiento (344) (Figura 11B). Este proceso es catalizado por las histonas metil transferasas (HMTs) y la proteína metiltransferasa de arginina (PRMTs), que añaden uno o más grupos metilos en las colas de las histonas con residuos de lisina o arginina, para regular la transcripción. Estas modificaciones son reversibles por la acción de las histonas desmetilasas (353). En términos de metilación de histonas en condrocitos, la IL-1, induce la di y tri-metilación de la histona H3K4 (histona 3 metilada en la lisina 4) en las regiones promotoras de COX2 e iNOS activando su expresión génica (354).

1.1.1.2. ARN NO CODIFICANTE

Los ARNs no codificantes (ncARNs) representan otro mecanismo importante de control epigenético y se clasifican, en base a su longitud, en pequeños ARNs no codificantes (sncARNs) con menos de 200 nucleótidos, y largos ARNs no codificantes (lncARNs) con más de 200 nucleótidos. Los ncARNs son importantes reguladores postranscripcionales que actúan por la unión a sitios específicos del ARNm diana para establecer la degradación del ARNm, inhibición de la traducción, o una combinación de ambos (355). Dentro de los sncARNs, los micro-ARNs (miARNs) son moléculas de ARN cortas (20-25 nucleótidos), que derivan de los transcritos de lncARNs. Los miARNs se procesan en el núcleo a pre-miARNs por la acción de la RNasa *Drosha*, a continuación se exportan al citoplasma, donde la enzima RNasa III *Dicer* procesa el miARN. En el tejido artrósico se han identificado tres lncARN: PACER (ARN extragénico COX2 asociado a p5) y dos lncARN asociados a la inflamación (CILinc01 y CILinc02), los cuales mostraron una expresión disminuida en cartílago artrósico (356).

Los miARNs desempeñan un papel importante en el silenciamiento de genes mediante la regulación de la estabilidad o la eficacia de la traducción del ARNm diana. Dependiendo del nivel de complementariedad entre las bases de los miARN y el ARNm diana, el complejo de inducción de silenciamiento (RISC) reprime la traducción del ARNm (emparejamiento imperfecto) o escinde los ARNm (complementariedad perfecta), aunque en el caso de los mamíferos, estos mecanismos son temas de debate (357,358). Diversos estudios han mostrado que algunos miARNs están abundantemente presentes en el cartílago y sus genes diana suelen estar involucrados en las vías de señalización del catabolismo. Uno de los más estudiados es el miR-140, un miARN exclusivo de cartílago que fue identificado en el pez zebra (359), y cuya expresión en humanos aumenta durante la condrogénesis y se ha encontrado que es muy abundante en cartílago articular, pero está reducido en cartílago artrósico. Entre sus funciones destaca

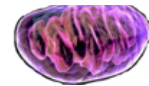
que reprime la expresión de ADAMTS5 (Desintegrina y metaloproteínasa con motivos de trombospondina S5) e IGFBP5 (Proteína 5 de unión al factor de crecimiento de insulina), y aumenta los niveles de expresión del gen ACAN (agrecano) (358).

1.6.3 LA METILACIÓN DEL ADN

La metilación del ADN es el proceso mediante el cual se añade un grupo metilo (CH_3), por parte del donante S-adenosilmetionina (SAM), a un residuo de citosina para formar 5-metilcitosina (5mC) (360) (Figura 12). La incidencia de la metilación del ADN depende del contexto genético local, es decir, los nucleótidos de citosina son más propensos a ser metilados cuando se localizan, de manera contigua en 5', a los nucleótidos de guanina, a nivel de las denominadas islas CpG (361). La metilación de las islas CpG proporciona un mecanismo para transmitir patrones de metilación del ADN tras su replicación y perpetuar así los patrones de regulación epigenética en las siguientes generaciones celulares (362).

Las islas CpG, o sitios CpG, están a menudo localizadas en las regiones promotoras o reguladoras de los genes (363). Las islas CpG tienen un tamaño de 200 pb, suponen menos del 1% del genoma y por lo general no se encuentran metiladas, son trascendentales para el descubrimiento de genes ya que la localización particular de estas islas en la región promotora o reguladora, ha facilitado el descubrimiento de más del 50% de los genes en mamíferos (364,365). La metilación de los sitios CpG, especialmente aquellos que colocalizan con regiones promotoras o reguladoras, está asociada con la represión del gen correspondiente. Así mismo, las regiones contiguas a las islas CpG de hasta 2 Kb, contienen también dinucleótidos CpG, pero en densidades menores y representan también una zona importante de metilación. La mayoría de la metilación específica de tejido parece ocurrir en estas regiones y se asocia con la represión transcripcional del gen correspondiente (341,366).

Los patrones de metilación del ADN se establecen y modifican en respuesta a los factores ambientales por medio de 3 tipos de ADN metiltransferasas (DNMT): la DNMT1, que es la más abundante en las células y se ha sugerido que actúa como una DNMT de mantenimiento primario, es decir, se encarga de metilar el ADN que sólo tenga metilada una de sus hebras (hemimetilado) tras la replicación del ADN, y preservar así los patrones de metilación parentales. Por otro lado, DNMT3a y DNMT3b funcionan como metiltransferasas *de novo*, principalmente durante el desarrollo para establecer patrones de metilación del ADN como



remodelación epigenética y reprogramación durante la diferenciación (341,366,367); DNMT3a y 3b, también desempeñan un papel en la metilación de mantenimiento para preservar completamente los patrones parentales (362).

Existen diferentes trabajos que ponen de manifiesto la alteración de los patrones de metilación asociados a la patología artrósica y que los condrocitos poseen un fenotipo modulado por la represión o sobre-expresión de varios genes regulados epigenéticamente (368). Un ejemplo de ello es la sobre-expresión de MMPs y ADAMTS4 (Metalopeptidasa 4 con motivo de trombospondina tipo 1) que, por defecto, presentan unos niveles bajos de expresión en el cartílago sano, mientras que su expresión aumenta de manera importante en el cartílago artrósico. Varios promotores de las MMPs muestran una metilación disminuida, lo cual podría inducir el cambio de expresión que está asociado con el desarrollo de la enfermedad (369,370). Se ha observado también que la expresión de DNMT3b está disminuida en el cartílago sano mientras que DNMT1 y DNMT3a están sobre-expresadas en cartílago artrósico apoyando la existencia de una regulación epigenética por metilación durante el desarrollo de la enfermedad (371).

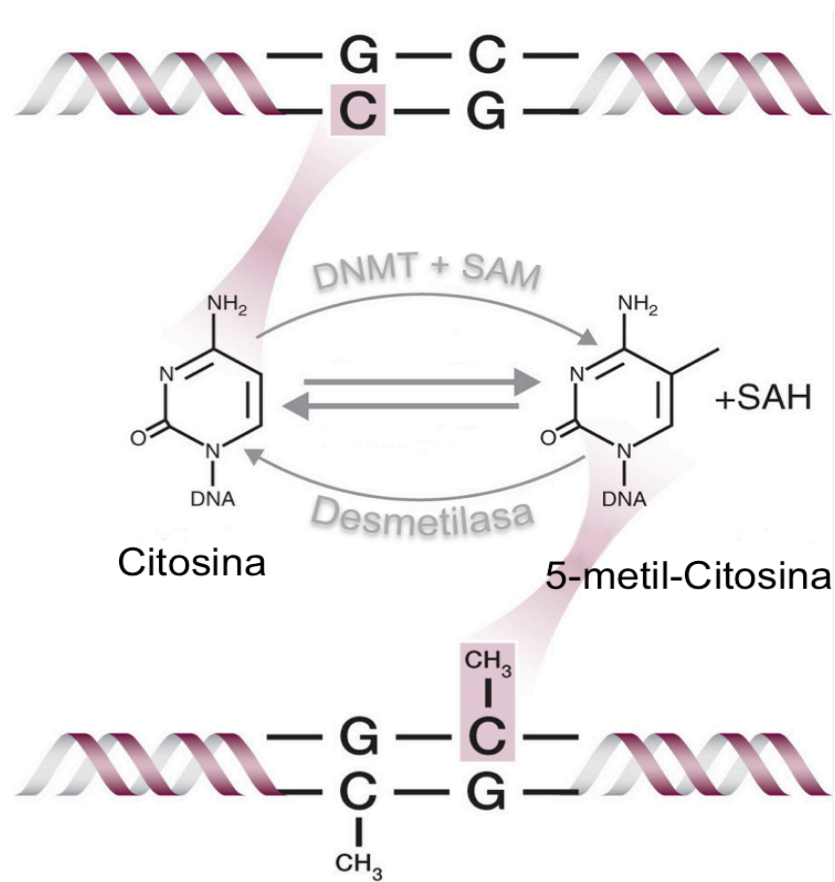


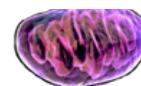
Figura 12. Metilación del ADN. Modificaciones en el ADN en la posición del carbono 5 de la citosina por las DNMTs donde SAM dona un grupo -CH₃ y es convertida a SAH. Esta reacción es potencialmente reversible por las desmetilasas. Modificado de <https://www.caymanchem.com/article/2153>.

Los estudios centrados en perfiles de metilación del ADN de genes individuales en la patología artrósica revelaron una hipometilación en el promotor de COL10A1 (colágeno tipo X cadena alfa 1) durante la hipertrofia y la maduración de los condrocitos, (372) así como en la citoquina IL8 en condrocitos artrósicos estimulados con IL1- β (373), y en los genes LEP (leptina), PHLPP1 (proteína fosfatasa 1 rica en repeticiones de leucina y dominio PH) y SOST (esclerostina) asociados con una mayor expresión génica en el cartílago artrósico (374–376). Además, la menor metilación de NF- κ B (factor nuclear kappa B subunidad 1) se ha relacionado con una sobre-expresión de la enzima iNOS (377). Por otro lado, se ha descrito que la hipermetilación de la región promotora del gen de la enzima SOD2 y del gen COL9A1 (colágeno IX cadena alfa 1), provocaba la represión de la expresión génica en cartílago artrósico de la enzima (193), y atenuaba la unión de SOX9 al promotor del gen COL9A1(378).

Recientemente, diversos estudios analizaron el metiloma global de cartílago con artrosis de rodilla y/o cadera y han observado que el perfil de metilación en ambas articulaciones es diferente (379,380), resaltando que no sólo los tejidos de partes distintas del esqueleto son diferentes genéticamente, sino que también lo son a nivel epigenético (338). El trabajo realizado por nuestro grupo, y que sirve de punto de partida para explorar uno de los objetivos de esta Tesis, destaca dos aspectos muy importantes que fueron confirmados por un estudio posterior (379); por un lado muestra claras diferencias en el perfil de metilación entre el cartílago artrósico y el sano y, por otro lado, refleja la existencia de un subgrupo de pacientes cuyo perfil de metilación global afecta principalmente a genes involucrados en el proceso inflamatorio e inmune, lo que refuerza la existencia de lo que se denomina un fenotipo inflamatorio de la enfermedad (381). Por otro lado, estos y otros estudios de metilación global concluyen que genes previamente asociados a la enfermedad albergan sitios CpG diferencialmente metilados entre el cartílago artrósico y el sano (379–383), lo que indica que la regulación de la expresión génica por la metilación del ADN es un factor importante en el proceso de la enfermedad artrósica (338).

1.6.4 IMPACTO DE LA MITOCONDRIA EN LA METILACIÓN DEL ADN

Los tres principales mecanismos epigenéticos que se acaban de describir no sólo modulan la expresión génica sino que también controlan los procesos de desarrollo, diferenciación y envejecimiento. No obstante, también se debe tener en cuenta el ambiente y la nutrición, ya que ambos juegan un papel importante en la estimulación de ciertos patrones de expresión génica que también son modulados epigenéticamente.



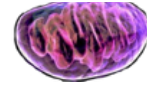
La mitocondria representa la maquinaria por la cual los estímulos del ambiente pueden traducirse en la regulación epigenética de la expresión génica (384) y es crítica en el funcionamiento normal de la célula, juega un papel importante en la homeostasis metabólica, en parte por su papel central en la producción de energía (Figura 13) (385). El metabolismo mitocondrial controla los niveles de moléculas clave de señalización (ATP, NADH, ROS, acetil Coenzima A (acetil Co-A) o SAM) (176), así como enzimas del ciclo TCA, como la isocitrato deshidrogenasa o la succinato deshidrogenasa (386). El ATP y el estado redox fosforila las colas de las histonas, lo que abre la cromatina promoviendo la transcripción y la replicación. Con niveles reducidos de ATP y acetil Co-A disminuye la reducción de NADH a NAD (176), lo que activa a las HDA (387). Asimismo, los niveles bajos de ATP disminuyen la capacidad de fosforilación de proteínas, lo que afecta a las vías de transducción de señales. En la mitocondria, el ciclo TCA produce citrato, que se exporta al citosol donde es transformado por la ATP-citrato liasa (ACL) en acetil-Co A y oxaloacetato (OOA) (388). El acetil Co-A es usado por las HAT para la acetilación del ADN (389), de modo que unos niveles bajos de acetil Co-A podría disminuir la acetilación de las histonas (390), y la ausencia de acetil Co-A disminuiría también la acetilación de la DNMT1 aumentando así el nivel de metilación del ADN por medio de la DNMT1(391).

El principal donante de metilos es SAM, cuya producción es regulada por el metabolismo mitocondrial mediante la síntesis de ATP y folato (392). El ciclo del folato ocurre tanto en la mitocondria como en el citosol, siendo el intercambio de serina a glicina la reacción de unión entre las dos vías compartimentalizadas. Los aminoácidos son interconvertidos por la serina hidroximetiltransferasa (SHMT) mitocondrial y citosólica a través del metileno tetrahidrofolato (MTHF). La disponibilidad de MTHF mitocondrial rige el cambio entre SAM y la síntesis de nucleóticos a través de la enzima mitocondrial bifuncional (MBE), bloqueada en las células adultas para promover la metilación del ADN dependiente de SAM (384). La SAM sintetizada en el citosol se transporta a las mitocondrias para proporcionar el grupo metilo para los procesos de metilación que se producen en la mitocondria, metilación de varios tipos de ácidos nucleicos presentes en la mitocondria (393) y metilación del ADNmt (394).

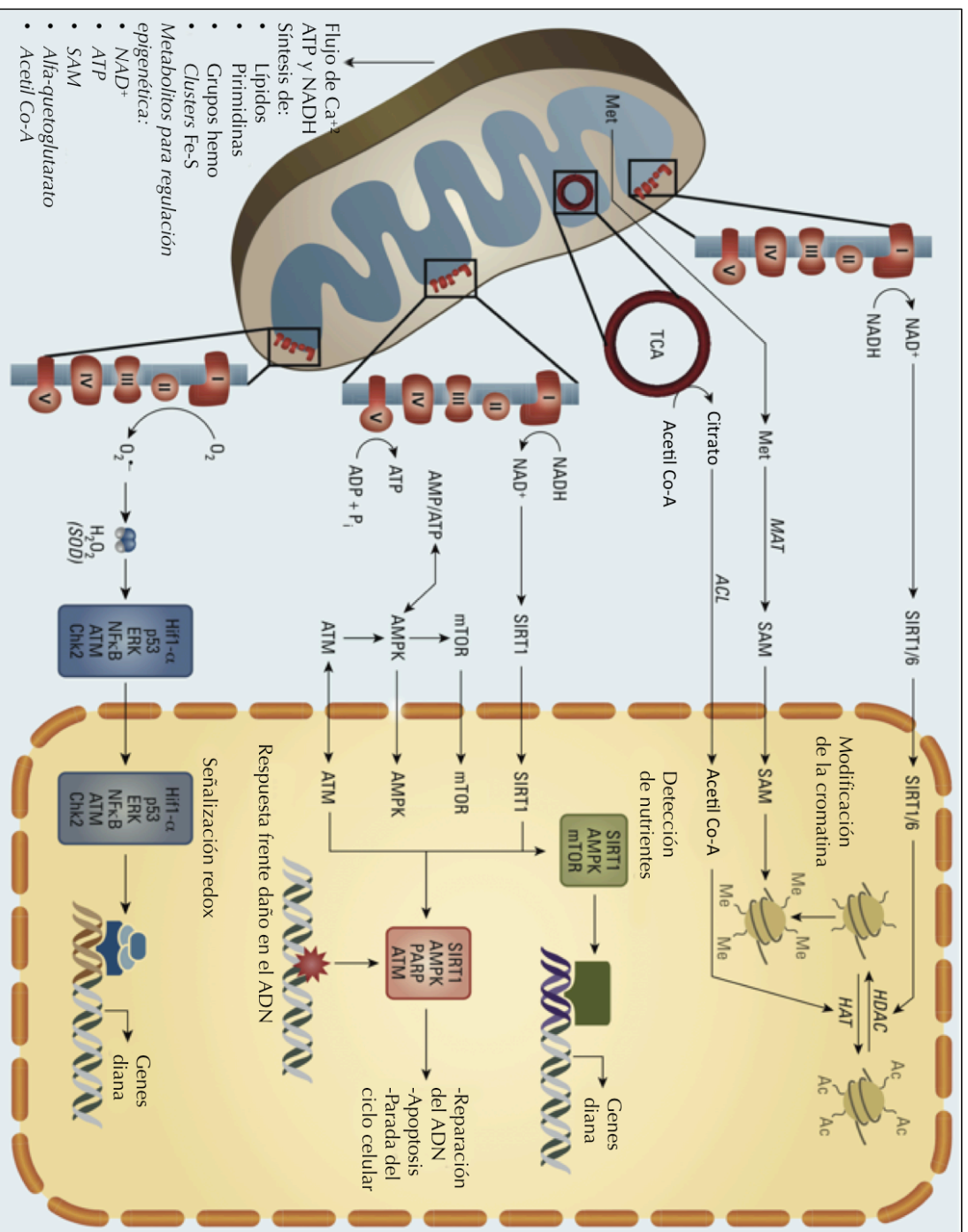
Como se ha descrito previamente, la mitocondria carece de la maquinaria necesaria para la metilación del ADN sin embargo, nuevas evidencias sugieren que existe metilación en el ADNmt (394). La metilación puede atribuirse a la acción de tres ADN metiltransferasas (79), y recientemente se ha encontrado que la DNMT1 contiene una secuencia de orientación mitocondrial y se transloca a la mitocondria, permitiéndole acceso directo al ADNmt (395).

La metilación del ADNmt se describió en ratones como un proceso no aleatorio (396) y hasta la fecha, existen evidencias contradictorias sobre la posible presencia de citosinas metiladas en el ADNmt. En el trabajo de *Bellizzi et al.* se analizó el estatus de metilación de la región control del ADNmt (D-loop) y encontraron citosinas metiladas e hidroximetiladas en la cadena-L. Observaron que la metilación del ADNmt ocurría particularmente dentro de las regiones ricas en CG pero sin unión fosfato (regiones no-CpG) sino por uniones covalentes, principalmente en la región promotora de la cadena pesada y en regiones con secuencias conservadas, lo que sugirió su implicación en la regulación de la replicación del ADNmt y/o transcripción. Además, en este mismo estudio, se reportó la presencia de ADN metiltransferasas dentro de la mitocondria y se mostró que la inactivación de DNMT1, DNMT3a y DNMT3b en células madre murinas, resultó en la reducción de la metilación de las CpG, mientras que las regiones no-CpG metiladas no se vieron afectadas. Estos hallazgos indicaron que la modificación epigenética en la región D-loop se realiza parcialmente con estas enzimas pero los mecanismos responsables de estos patrones de metilación no se han descubierto (397). Se ha publicado que la DNMT1, una vez translocada en la mitocondria, se une al ADNmt dentro de la matriz y que su expresión está regulada por genes conocidos por regular la biogénesis mitocondrial como NRF1 (factor respiratorio nuclear 1) y PGC1- α (receptor activado de proliferación de peroxisomas y coactivador α 1) (395), sugiriendo un mecanismo de regulación intra-mitocondrial de la expresión génica por medio de la metilación de citosinas del ADNmt (394).

Un aspecto clave es la modulación de la metilación del genoma mitocondrial en respuesta al estrés oxidativo (394). La inducción de ROS con H₂O₂ ha mostrado una disminución de la metilación del ADNmt (398) y además, existen evidencias de que el aumento de la producción de ROS está implicado en algunas enfermedades mitocondriales (399). De hecho, un estudio global de metilación del ADN mostró que en células con el ADNmt depleccionado, la metilación del genoma nuclear se veía alterada y el patrón de metilación se restauraba tras la repleción del ADNmt, implicando a la mitocondria como un factor determinante en el estado epigenético celular (395). Las respuestas epigenéticas a niveles elevados de ROS pueden resultar a su vez en la expresión alterada de los genes que regulan el metabolismo mitocondrial (400) lo que establecería un círculo vicioso generando más ROS y en última instancia el fallo bioenergético (394). Por tanto, los síntomas de las enfermedades mitocondriales se podrían atribuir, al menos en parte, a cambios epigenéticos (176).



En la regulación epigenética del ADN nuclear se ha identificado la influencia que ejerce sobre el ADNmt; un ejemplo de ello es la enzima nuclear polimerasa gamma (Pol- γ), responsable de la replicación y reparación del ADNmt, que tras la metilación su expresión génica se ve disminuida (401). Se ha descrito también que el número de copias del ADNmt es una de las señales por la cual las mitocondrias afectan a los patrones de metilación nuclear en cáncer (402). Además, los haplogrupos del ADNmt también afectan a la expresión génica del ADN nuclear, la diferenciación celular y el metabolismo de la mitocondria. De hecho, existen distintos estudios que ponen de manifiesto que el haplogrupo J induce unos niveles más altos de metilación global del ADN nuclear que el resto de los haplogrupos (403,404).



Estudio de regiones génicas relacionadas con el estrés oxidativo.
Papel en la artrosis



Figura 13: Señalización mitocondria-núcleo y epigenética. Las funciones mitocondriales incluyen la producción de energía celular a través de la generación de ATP, el metabolismo del Calcio, la síntesis de macromoléculas y la generación de metabolitos para la regulación epigenética. La señalización mitocondria-núcleo está mediada por numerosas vías, incluyendo la regulación epigenética / modificación de la cromatina a través de sirtuinas, HDACs y HATs, que requieren de acetil Co-A producido en el ciclo de los TCA, la detección de nutrientes por medio de las vías de señalización AMPK y mTOR, DDR mediada por PARP, ATM, SIRT1 y AMPK, y la señalización redox a través de vías superpuestas, mediadas por ATM/Chk2, p53, Hif1 - α , ERK y NF κ B. Abreviaturas: ACL: ATP citrato liasa, AMPK: proteína quinasa activada por AMP, ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, MAT: metionina adenosiltransferasa, Met: metionina, mTOR: diana de rapamicina, PARP: poli (ADP-ribosa) polimerasa 1. Modificado de *Shaughnessy DT et al., Environmental Health Perspectives*, 2015, 122: 1271-1278.

Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



2.1 JUSTIFICACIÓN

La artrosis es la enfermedad reumática más prevalente e invalidante a nivel mundial, con una amplia incidencia en nuestra región. Es un trastorno que involucra las articulaciones móviles del cuerpo, generando estrés celular e inflamación y degradación de la matriz extracelular. Está considerada como una enfermedad compleja y multifactorial en la que interactúan tanto factores ambientales como genéticos. Su primera manifestación es a nivel molecular generando alteraciones anatómicas y/o fisiológicas culminando en la enfermedad. Los tratamientos existentes alivian el dolor pero no frenan la enfermedad y en último caso necesita un reemplazo articular por una prótesis para que el órgano de la articulación siga cumpliendo su función.

Recientemente se ha descubierto que la epigenética es crucial para entender la interacción gen-ambiente en las enfermedades complejas. La metilación del ADN es el mecanismo epigenético mejor caracterizado y se han correlacionado distintos patrones de metilación con la artrosis y con la articulación afectada. Por otro lado, la mitocondria y los haplogrupos mitocondriales se han rebelado como unos factores importantes en la enfermedad, ya que se ha visto que la mitocondria tiene un papel fundamental en la regulación del estrés oxidativo, y que los mecanismos y metabolismos distintivos de cada haplogrupo influyen en la predisposición y progresión de la enfermedad.

Por tanto, es de gran interés identificar la interacción de los haplogrupos mitocondriales con los distintos mecanismos epigenéticos y regiones génicas nucleares relacionadas con el estrés oxidativo, con el fin de determinar una combinación de características moleculares que sean útiles para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad afín a todas las articulaciones y poder generar así, una estrategia terapéutica eficaz y personalizada debido a la complejidad y heterogeneidad de esta patología.

2.2 OBJETIVOS

Por todo lo expuesto previamente, se propuso como objetivo principal de esta tesis la búsqueda de nuevas regiones génicas relacionadas con el estrés oxidativo y su implicación en la patología artrósica. Del objetivo principal se derivan los siguientes objetivos particulares:

1. Identificar regiones génicas relacionadas con el estrés oxidativo por medio de estudios epigenéticos en el cartílago articular.
2. Determinar la influencia de los haplogrupos mitocondriales, como agentes reguladores del estrés oxidativo, en el metiloma del cartílago articular.
3. Explorar el papel en la artrosis de las interacciones mitocondria-núcleo a nivel de genes relacionados con el estrés oxidativo

Capítulo 3

MATERIAL Y MÉTODOS



3.1 INTRODUCCIÓN DEL ANÁLISIS DE DATOS DEL ARRAY DE METILACIÓN

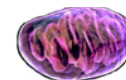
A partir del primer estudio de metilación de genoma humano completo realizado en cartílago de rodilla mediante el *array DNA HumanMethylation27* beadchip (Illumina) realizado por Fernández-Tajes y Col. (2012) (381), se determinó por primera vez la presencia de subgrupos de pacientes con perfiles de metilación diferentes y característicos.

La cohorte estudiada en el *array* de Metilación estaba compuesta por 45 muestras de cartílago, de las cuales 25 procedían de pacientes artrósicos y 20 de sujetos sanos. El promedio de edad del conjunto de sujetos fue de $64,81 \pm 7,39$ años y estaba formada por 24 (53,33%) mujeres y 21 (46,6%) varones. El grupo de muestras artrósicas presentaba una media de edad de $70,04 \pm 5,78$ con una edad mínima de 60 años y una edad máxima de 79 años y en el grupo de los controles su promedio de edad fue de $59,58 \pm 9,85$ años, con una edad mínima de 46 años y una máxima de 79 años.

Los resultados del estudio de metilación mostraron que 91 sondas estaban diferencialmente metiladas (DM) y permitían dividir las muestras entre pacientes con artrosis y controles sanos; de las 91 sondas DM, 37 sondas resultaron hipometiladas y 54 sondas hipermetiladas dentro de las muestras artrósicas al compararlas con las muestras de los controles sanos. Además, los procesos biológicos asociados a los genes menos metilados en pacientes, resultaron ser aquellos relacionados con la respuesta y defensa inflamatoria así como con la regulación positiva de la actividad de la transcripción. Por otro lado, los procesos biológicos involucrados en la regulación de la fosforilación y la actividad mitógena de la proteína quinasa se encontraron asociados a los genes más metilados en las muestras patológicas.

El filtrado no jerárquico de los datos mostró la agrupación de las sondas en 3 *clusters* diferentes de muestras, donde el *cluster* 1 estaba formado por una mayoría de pacientes artrósicos (14 muestras con artrosis y 6 controles sanos), el *cluster* 2 integrado por una mayoría de controles sanos (11 controles y 2 muestras artrósicas) y el *cluster* 3 formado casi exclusivamente por pacientes artrósicos (7 muestras artrósicas y 1 control sano).

A partir de estos datos se realizó un nuevo filtrado jerárquico solo con las muestras artrósicas, donde se encontró que de nuevo las sondas separaban en un único grupo las muestras del *cluster* 3, lo que indicó que este *cluster* en concreto poseía un perfil característico de metilación de su ADN. Al comparar el *cluster* 3 frente al resto de muestras se identificaron 1357 sondas significativas (306 sondas hipometiladas y 1051 hipermetiladas), de modo que,



entre los genes con sondas menos metiladas se encontraron aquellos relacionados en su mayoría con la respuesta inflamatoria; por el contrario, sondas pertenecientes a genes relacionados con la síntesis de colágeno, la región extracelular y la matriz extracelular del cartílago aparecieron con un mayor nivel de metilación en este subgrupo de pacientes.

El efecto de estas diferencias en la metilación se validó en una nueva cohorte de 24 pacientes con artrosis de rodilla mediante el *array* de expresión *Human Gene 1.1 st* (Affymetrix). Primero, se analizaron los datos obtenidos de la expresión mediante un análisis de componentes principales (PCA), que mostró la agrupación de la cohorte en dos subgrupos, un grupo homogéneo (*cluster A*) y un grupo heterogéneo formado por 6 muestras (*cluster B*). Al comparar estos nuevos *clusters* entre sí se encontraron 450 sondas diferencialmente expresadas, 262 sondas estaban sobre-expresadas en los pacientes del *cluster B* y 188 estaban reprimidas.

Este último análisis mostró que el perfil de expresión del *cluster B* se caracterizaba por pacientes que presentaban características similares entre ellos, especialmente a nivel de la respuesta inflamatoria, tal y como se identificó en el análisis de metilación, donde el *cluster 3* mostraba también esta misma característica. Al comparar los genes diferenciales en ambos análisis se encontraron un total de 47 genes significativamente alterados con una relación inversa entre metilación y expresión.

3.1.1 ANÁLISIS DE DATOS DE METILACIÓN

Los datos crudos del *array* de metilación se sometieron a un filtrado y normalización con el programa *R* (R-core team, (www.R-project.org) 2014) y el paquete *Bioconductor* (<http://www.bioconductor.org>). Los p-valores obtenidos miden la diferencia de las intensidades de señal entre las islas CpG interrogadas y 16 sondas definidas como control negativo incluidas en el *array*.

Para el filtrado inicial de los datos se definió un control de calidad extra de la medida donde se descartaron aquellas muestras con un p-valor mayor a 0,05 en más del 25% de las sondas y aquellas sondas diseñadas en los cromosomas sexuales. El análisis de los datos de metilación se realizó con el paquete *lumi* y *Methylumi* (R, Bioconductor) usando el valor-M, que es un método usado para medir los niveles de metilación, que asume que la varianza de los errores sobre la muestra es similar en el rango completo de metilación, siendo así más válido estadísticamente en análisis diferenciales.

El análisis de los datos del *array* de metilación y expresión se realizó con el paquete estadístico R (R-core team, (www.R-project.org) 2014). El análisis estadístico de los sitios DMs y la visualización de los datos se realizó comparando los valores-M de las sondas seleccionadas entre grupos, con el paquete Limma (<http://www.bioconductor.org>). Este paquete realiza un análisis mediante un modelo lineal con modificaciones bayesianas empíricas de la varianza para el ajuste del pequeño tamaño de los experimentos de los *micro-arrays*. Los p-valores ajustados fueron calculados por el método de *Benjamini & Hochberg* (405). Las islas CpG fueron consideradas diferencialmente metiladas si su p-valor ajustado era menor a 0,05 y el valor B del análisis estadístico obtenido por *Limma* era mayor que 1. El estadístico B se calculó como el logaritmo de las probabilidades de que un gen estuviera diferencialmente metilado. Los valores-M de metilación fueron representados gráficamente usando *Heatmaps* generados con el paquete *Heatmap* y *Heatplus* (<http://www.bioconductor.org>).

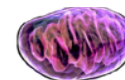
Para realizar la agrupación no supervisada de los datos de metilación se usaron 23.837 sondas con un rango intercuartil mayor a 0,1 en todas las muestras, excluyendo las sondas diseñadas para los cromosomas X e Y. El número óptimo de *clusters* se estableció basándose en la interacción de las medias-K tras 1000 muestras para K=2,3,4,5, siendo la correlación de *Pearson* la distancia métrica usada tal como se describe en el paquete *Consensus Cluster Plus* (<http://www.bioconductor.org>).

3.1.2 BÚSQUEDA DE GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS

RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

Tal y como se describió anteriormente, al realizar el filtrado jerárquico de las sondas del *array* de metilación sólo con las muestras artrósicas, se encontró que estas sondas eran capaces de identificar de nuevo un grupo de pacientes con un perfil característico de metilación (*cluster 3*). Por tanto, al comparar las sondas DMs entre los dos grupos de muestras artrósicas se encontró que 1.357 sondas eran significativas, de las cuales 306 estaban hipometiladas y 1.051 hipermetiladas en el *cluster 3*.

Las sondas DMs y significativas se filtraron por su proceso biológico (*Gene Ontology*) y se seleccionaron aquellas sondas en base a los siguientes criterios: i) que estuvieran relacionadas con el estrés oxidativo, ii) que tuvieran un p-valor ajustado menor de 0,05 y iii) que su diferencia en el valor- β entre el *cluster 3* y no *cluster 3* fuera mayor que 0,1.



3.1.3 SELECCIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS COMO NUEVAS DIANAS EN ARTROSIS

Para la selección de nuevas dianas en artrosis se examinaron los resultados reflejados en la publicación de *Fernández-Tajes et al.* (2012) (381) mencionada anteriormente, y se seleccionaron las sondas en genes de potencial interés en base a los siguientes criterios: i) que no hubiera descrita en la literatura científica una relación con la artrosis, ii) que resultaran hipometilados en el *cluster 3* con una diferencia superior a 0,1 en su valor- β y iii) sobre-expresados en el *cluster B* con un ratio de expresión mayor o igual a 1.

Los genes que cumplieron estos criterios fueron un total de 5 (LAPTM5, KYNU, PLEK, CYTIP y MARCO), en los que se analizó su expresión génica en una nueva cohorte de casos y controles, mediante PCR cuantitativa a tiempo real en extractos de cartílago articular de cadera. La característica principal de estos genes es que no se han descrito antes en la artrosis y que, además, también están relacionados con el estrés oxidativo y la detoxificación celular. Las funciones principales de estos genes se pueden resumir de la siguiente forma:

- ◇ La proteína transmembrana lisosomal 5 (LAPTM5), se sabe que reside en los endosomas tardíos y es una proteína similar a LAPTM4 (proteína transmembrana lisosomal 4), que es clave en el transporte de pequeñas moléculas nocivas para el organismo en los lisosomas para proteger a la célula de sus efectos dañinos (406).
- ◇ La enzima Quinureninasa (KYNU) es fundamental en la ruta de degradación del triptófano y se ha descrito que un aumento de triptófano genera más productos de la peroxidación lipídica provocando un aumento de estrés oxidativo (407).
- ◇ El sustrato de la Quinasa C de plaquetas, pleckstrina (PLEK), su función *in vivo* no está clara, sin embargo se sabe que afecta a la señalización de segundos mensajeros en las rutas mediadas por la Fosfolipasa C, la Quinasa fosfatidil-inositol 3 gamma (PI3K γ) y la fosfatasa 5 del inositol, y además induce cambios en la forma celular por su interacción con fosfolípidos, integrinas y proteínas de la familia Rho (408).
- ◇ La proteína 1 de interacción con Citohesinas (CYTIP) se está revelando como una proteína con una función importante en la epigenética de diversos genes, ya que se ha descrito que la pérdida de metilación en los factores de transcripción inducidos por hipoxia (HIFs) aumenta la

expresión de CYTIP para proteger a la célula de las señales de muerte celular, obteniendo un nuevo papel como proteína de supervivencia en condiciones de estrés (314).

- ◇ El receptor de Macrófagos con estructura de Colágeno (MARCO) es esencial para la unión de las LDL (grasas de baja densidad) acetiladas, células apoptóticas y lípidos oxidados y además posee un papel fundamental en la respuesta inmune (409).

3.1.4 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE CARTÍLAGO

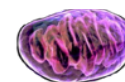
3.1.4.1 *Origen y procesamiento de las muestras de cadera*

Las muestras de tejido articular de cadera (cartílago) proceden de los quirófanos del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) y del Hospital San Rafael, donde se realizan las operaciones de reemplazo total de cadera tanto para las artroplastias (donantes artrósicos) como para las fracturas del cuello femoral sin antecedentes de artrosis ni signos macroscópicos evidentes de patología (controles sanos). Las piezas extraídas se recogen en quirófano, donde se separa un trozo de cartílago para su congelación *in situ* en nitrógeno líquido y luego la pieza se traslada al laboratorio de cultivos celulares del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), donde se procesa para el cultivo celular de condrocitos articulares tal como se describe posteriormente en el apartado 3.1.5.

3.1.4.2 *Origen y procesamiento de las muestras de rodilla*

En cuanto a las muestras de rodilla, éstas proceden, además de los quirófanos del CHUAC y del Hospital San Rafael, de la sala de autopsias del CHUAC. Las muestras de tejido se obtienen a partir de pacientes que son diagnosticados con artrosis de rodilla severa y son sometidos a una cirugía para la incorporación de una prótesis de rodilla. Una vez extraídas, las piezas son transportadas al laboratorio de cultivos celulares del INIBIC, donde se recogen dos biopsias de cartílago que son congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido para su conservación. El tejido restante se procesa para llevar a cabo el cultivo celular de condrocitos articulares tal como se describe posteriormente en el apartado 3.1.5.

Las muestras de rodilla de controles sanos se obtienen a partir de autopsias de cadáveres o amputaciones del miembro inferior sin signos macroscópicos de artrosis ni antecedentes en su historial médico. La extracción se realiza en la



sala de autopsias del CHUAC, donde se recogen varias piezas de tejido y se transportan al laboratorio de cultivos celulares del INIBIC. Allí se procesan para realizar el cultivo celular de condrocitos articulares tal como se describe más adelante en el apartado 3.1.5.

Este estudio se llevó a cabo conforme a la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007 del 3 de Julio) y cumple los principios de la Declaración de Helsinki. El estudio y uso de las muestras utilizadas fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de Galicia. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado y todas las muestras fueron anonimizadas (Anexo I).

3.1.5 CULTIVO DE CONDROCITOS Y ESTIMULACIÓN CON IL1- B

Tras la obtención del cartílago a partir de la pieza articular de la cadera ésta se trocea en pequeños trozos para facilitar la digestión del tejido. La extracción de los condrocitos se basa en una doble digestión enzimática, primero se incuba durante 10 min en una estufa con agitación a 37°C con tripsina al 1x diluida en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza®), la tripsina procede de páncreas bovino y está en una proporción de 0,025% y 0,01% de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) disuelto en PBS. A continuación, se retira la solución que contiene tripsina y se añade una solución con colagenasa tipo IV (2 mg/mL, SIGMA) y se deja en un agitador durante 12-16 h.

La mezcla se transfirió por un filtro con un diámetro de poro de 20 micras y se recogió el filtrado con el medio y las células, que se cultivaron en placas adherentes con medio de cultivo DMEM suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF, Life Technologies) al 10%, glucosa (4,5 g/L), L-glutamina (584 mg/L), piruvato sódico (110 mg/L), penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL). Las células se incubaron en una estufa a 37°C con una mezcla de aire humidificado con un 5% de dióxido de carbono (CO₂) hasta una confluencia del 80% (410).

Para realizar el estudio funcional de condrocitos estimulados con IL1-β, se sembraron 50.000 células por pocillo en un volumen de 200 µL de medio DMEM con Glucosa (4,5 g/L), L-glutamina (584 mg/L), piruvato sódico (110 mg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/mL) y 10% SBF por duplicado. Se dejaron crecer en un incubador a 37°C con una mezcla de aire humidificado con un 5% de CO₂ durante 24h. A continuación se depleccionaron los pocillos con medio DMEM con glucosa (4,5 g/L), L-glutamina (584 mg/L), piruvato sódico (110 mg/L), penicilina (100 U/mL),

estreptomycin (100 µg/mL) y 0,5% SBF y se estimularon con IL1-β (Sigma) a una concentración de 1ng/mL y se dejaron en el incubador 48h. A continuación se retiró el medio con el estímulo, se lavó con 150 µL de solución salina, se retiró y se añadieron 20 µL de tripsina al 2x diluída en una solución salina para levantar las células y se incubó un minuto en la estufa a 37°C. La tripsina fue neutralizada con el medio DMEN utilizado para el cultivo con un 10% de SBF; las células resuspendidas se transfirieron a un tubo de 1,5 mL (eppendorf®) y se realizó un *pellet* de células por centrifugación (2.500 rpm durante 10 min), a continuación se retiró el medio y se resuspendió el *pellet* celular en tampón fosfato salino (PBS) filtrado y se centrifugó de nuevo a 2.500 rpm/10 min; este proceso se realizó dos veces. Finalmente se retiró el PBS y se dejó secar el *pellet* celular a temperatura ambiente durante 15 min con el tubo invertido; una vez seco, se congeló a -20°C para su posterior extracción de ARN tal como se indica en el apartado siguiente (3.1.6).

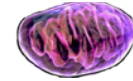
3.1.6 EXTRACCIÓN DE ARN

De cada una de las piezas de cadera o rodilla recibidas en el laboratorio de cultivos celulares, se retiró un trozo de cartílago y se tomaron biopsias con un sacabocados de 6 mm de diámetro (Kai Medical®), en una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad. Las biopsias del cartílago una vez extraídas, fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C, para evitar la degradación de la muestra, para su almacenamiento y posterior procesamiento.

3.1.6.1 A partir de tejido

Para la extracción de ARN se tomó una biopsia (50-70 mg) y se pulverizó en un mortero de acero descontaminado de RNAsas (*RNase-Zap*TM, SIGMA) y enfriado en nitrógeno líquido; el polvo se transfirió a un tubo de 2 mL (eppendorf®). A continuación, se añadió el reactivo de lisis Qiazol® (Qiagen®) a razón de 1 mL de *Qiazol* por 100 mg de tejido. Este reactivo es una solución monofásica de tiocianato de guanidina y fenol, diseñado para facilitar la lisis de tejidos complejos, eliminar el ADN genómico e inhibir las RNAsas para conseguir una calidad óptima del ARN extraído.

En el caso de una mala pulverización de las muestras con el mortero, se realizaba un nuevo disgregamiento rápido en frío con el homogenizador de mano *Ultra-Turrax*® (IKA, Sigma) hasta que no se apreciaran restos del tejido en la mezcla. A continuación, la muestra se centrifugó durante 3 min a 14.000 rpm para precipitar los restos de tejido, se recogió el sobrenadante y se



añadieron 200 μL de cloroformo (Sigma). Al añadir el cloroformo, el homogenizado se separó en tres fases por centrifugación (12.000 rpm durante 15 min a 4°C); en la fase acuosa se encontraría el ARN, en la interfase estaría retenido el ADN y en la fase orgánica quedarían disueltas las proteínas.

A continuación se transfirió la fase acuosa a las columnas *Qiashredder*[®] (Qiagen[®]) y se centrifugó 2 min a 14.000 rpm en una micro-centrífuga. Estas columnas tienen un sistema único de homogenizado por biopolímeros en un formato de columnas de vacío por micro-centrifugación. Sus funciones principales son las de reducir la pérdida del material de partida, retirar los detritos insolubles y reducir su viscosidad. Tras la centrifugación se recuperó el homogenizado del tubo colector, se añadió un volumen de etanol al 70% igual al recolectado y se mezcló bien con un vórtex.

La etapa final de la extracción consistió en una purificación del ARN utilizando el kit *RNeasy Mini Spin* (Qiagen[®]), donde el homogenizado con etanol se transfirió a las columnas del kit para su purificación. Este kit permite una purificación eficiente de ARN total de pequeñas cantidades de material de partida. Posee una tecnología basada en las membranas de silicato que junto con la combinación de la lisis astringente del tiocianato de guanidina consigue obtener un ARN purificado en poco tiempo. Se transfirieron 700 μL del homogenizado con etanol a la columna (su capacidad máxima) y se centrifugó a 8.000 rpm durante 15s en una microcentrífuga, descartándose el eluido; este proceso se repitió hasta filtrar todo el homogenizado. A continuación se realizaron lavados de la membrana con tampones para purificar el ARN. Primero se añadieron 700 μL del tampón *RW1* (Qiagen[®]) que contiene sales de guanidina y etanol y es utilizado como un tampón de lavado astringente que elimina moléculas que no se han unido a la membrana de forma eficiente como carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, etc, mientras que permite y mantiene la unión de las moléculas de ARN mayores de 200 pb, y se centrifugó a 8.000 rpm/15s. Tras este lavado se añadieron 500 μL del tampón *RPE* (Qiagen[®]), cuya función principal es la de eliminar sales procedentes de los tampones anteriores, y finalmente se centrifugó a 8.000 rpm/15s. Este lavado se repitió de nuevo, añadiendo 500 μL del tampón *RPE* pero centrifugando durante 2 min a 8.000 rpm. Por último, se realizó una centrifugación en vacío para ayudar a secar la membrana a 14.000 rpm durante 1 min y el ARN se eluyó en 30 μL agua libre de RNAsas.

3.1.6.2 A partir de células en cultivo

El ARN fue aislado de las células con el reactivo *Trizol*[®] (Invitrogen[®], Thermo Fisher Scientific[®]), que tiene como principio activo el fenol, hidroxiquinoleína, tiocinato de guanidina, tiocianato de aminio y glicerol. Su función principal es mantener la integridad de los ácidos nucleicos gracias a la hidroxiquinoleína, que es un inhibidor de las RNAsas, romper las células y los componentes celulares (411).

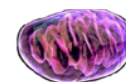
Primero se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se realizó un lavado con 500 μ L de solución salina. Se añadió 1 mL de *Trizol*[®] para los pocillos de 35 mm de diámetro y se procedió a la recogida de las células pipeteando las células varias veces para facilitar la lisis. A continuación, se añadieron 200 μ L de cloroformo al lisado celular que, mediante centrifugación, separó el homogenizado en tres fases; en la fase acuosa se encontraría el ARN, en la interfase quedaría retenido el ADN y en la fase orgánica estarían disueltas las proteínas.

Se recuperó la fase acuosa y se provocó la precipitación del ARN con 500 μ L de Isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min para permitir que se formase el precipitado, y se centrifugó para obtener un *pellet* de ARN. Por último, se realizó un lavado con etanol al 75% enfriado a -20°C y se dejó secando durante 10 min en hielo; una vez seco se resuspendió en un volumen de 30 μ L de agua libre de RNAsas.

3.1.6.3 Cuantificación del ARN por espectrofotometría

El ARN extraído se cuantificó por espectrofotometría usando el *Nanodrop*[®] *ND-1000* (Thermo Fisher Scientific[®]); usando 1 μ L de muestra se obtiene una medición muy precisa y con una alta reproducibilidad. Mediante tensión superficial se consigue mantener la gota en un extremo del cable de la fibra óptica, que al ponerse en contacto con el otro extremo hace que la gota actúe como puente entre ambos extremos. La lámpara de xenón de luz pulsada proporciona la fuente de luz y se utiliza como espectrofotómetro que mediante un algoritmo analiza la luz que pasa a través de la gota de la muestra.

Además de la concentración de ARN de la muestra se obtienen unos ratios, el ratio de absorbancias a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$) nos indica la presencia de proteínas, y el ratio de absorbancias a 260 y 230 nm ($A_{260/230}$) nos indica la contaminación por solventes orgánicos. Las muestras seleccionadas para el estudio obtuvieron un ratio 260/280 de 1,7 – 2 y un ratio 260/230 entre 1,5 y 2.



3.1.7 ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL ARN

Las muestras de ARN se cuantificaron usando un *Bioanalizador 2100* (Agilent®) para determinar su integridad (*RNA Integrity Number* (RIN)) y verificar su calidad. El bioanalizador es una plataforma basada en la microfluídica diseñada para la determinación del tamaño, la cuantificación y la calidad de los ácidos nucleicos, mediante una electroforesis en pequeños chips. El algoritmo creado para estimar la integridad del ARN total de las muestras (RIN), no sólo tiene en cuenta el ratio entre las bandas de las subunidades ribosómicas, sino que también considera la marca electroforética completa del ARN, incluyendo la presencia o ausencia de productos degradados. El valor del RIN asignado es independiente de la concentración de la muestra, está considerado como un control de calidad y asegura la reproducibilidad de los experimentos (412).

Los valores de RIN presentan un rango de 1 a 10, siendo 1 un ARN muy degradado y 10 un ARN intacto, para experimentos de biología molecular en ARN extraído de células, el valor mínimo de RIN aconsejado es 7 aunque, este valor es orientativo ya que varía dependiendo del material de partida (413). En nuestro caso, debido a las características particulares de este tejido, una gran matriz extracelular calcificada y una baja cantidad de células, se estableció como un valor mínimo de RIN adecuado un 5, para los estudios de expresión génica.

3.1.8 ENSAYO DE EXPRESIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A TIEMPO REAL

El ARN aislado fue retrotranscrito a ADN complementario (ADNc) usando el kit *SuperScript® VILO™ MasterMix* (Invitrogen, Life Technologies®). Partiendo de una concentración de 1 µg de ARN en un volumen final de 16 µL se añadieron 4 µL de *SuperScript® VILO™ MasterMix*. Esta mezcla contiene la retrotranscriptasa *SuperScript® III RT*, un inhibidor recombinante de Ribonucleasas (*RNase OUT™*), una proteína ayudante patentada, cebadores, cloruro de magnesio y dNTPs.

La enzima retrotranscriptasa del kit tiene una actividad reducida de la RNasa H y una estabilidad térmica incrementada, lo que facilita realizar la transcripción reversa en un rango de temperaturas de 42-55°C ya que no se ve inhibida por los ARN ribosómicos o transferentes. El programa de temperaturas consistió en una incubación inicial a 25°C durante 10 min, una nueva incubación a 42°C

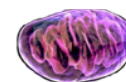
durante 60 min donde actúa la transcriptasa inversa y una reacción de terminación de 85°C durante 5 min; el ADNc obtenido fue diluido 1/10 en agua libre de RNasas y almacenado a -20°C.

La expresión génica se analizó por PCR cuantitativa en un termociclador *Lightcycler® 480 II* (Roche®) en placas de 96 pocillos. Se tomaron 5 µL de ADNc y se amplificaron en paralelo con 15 µL de la mezcla *Lightcycler® 480 Probes Master* (Roche®). Esta mezcla contiene ADN polimerasa *FastStart Taq*, tampón de reacción, dNTPs y cloruro de magnesio (MgCl₂). Los cebadores específicos para cada gen se añadieron a una concentración final de 0,7 µM y la sonda de hidrólisis *Taqman® UPL (Universal ProbeLibrary Probes, Roche®)* correspondiente al gen, a una concentración final de 1 µM, y se completó con agua para PCR (Roche®) hasta un volumen final de 15 µL.

El programa de temperaturas consistió en una pre-incubación a 95°C durante 10 min donde se activa la Taq polimerasa, seguido de 50 ciclos con 3 etapas para la amplificación (desnaturalización, anillamiento y elongación), la primera a 95°C durante 10 s para la desnaturalización, la segunda a 60°C durante 30 s para la hibridación de los cebadores y la sonda, la tercera, a 72°C durante 1s, para la extensión y liberación de la fluorescencia de la sonda. Tras los 50 ciclos se realizó un último ciclo de enfriamiento a 40°C durante 20 s.

La hibridación y la hidrólisis de las sondas se basan en el principio de transferencia de energía entre fluorocromos (FRET, del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), el cual consiste en la transferencia de energía desde un fluoróforo (el donador) a otro fluoróforo adyacente (aceptor). Los ensayos con sondas de hidrólisis se pueden describir como ensayos de nucleasa-5' ya que solo se utiliza una sonda 3' no extensible, que se escinde durante la amplificación por PCR detectando la acumulación de la secuencia diana del ADN. Las sondas tienen dos marcajes, un donador y un aceptor ambos fluorescentes y muy próximos, de modo que cuando la sonda está intacta el aceptor está "apagado" debido a que el donador suprime la transferencia de fluorescencia. Durante la PCR la actividad 5'-nucleasa de la polimerasa escinde la sonda de hidrólisis separando el donador del aceptor y este comienza a emitir una señal fluorescente (414).

Los cebadores fueron diseñados utilizando la plataforma *Universal Probe Library Assay Design Center* (Roche®); en esta plataforma se realizaron los ensayos *in silico* para los genes a estudio para determinar la sonda específica de hidrólisis que le correspondía. Todos los ensayos fueron realizados utilizando la opción de *intron spanning assay* para evitar la amplificación de aquellas muestras con posibles "contaminaciones" con ADN genómico. Las



sondas de hidrólisis *Taqman*[®] utilizadas en este ensayo pertenecen a la librería UPL (Universal Probe Library Set, Human, Roche[®]) que esta formada por 90 sondas que dan cobertura al 98% de los transcritos génicos humanos incluidos en la base de datos de referencia de secuencias del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

3.1.9 GENES RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO. VALIDACIÓN EN CARTÍLAGO DE RODILLA

Tal y como se describió en el apartado 3.1.2, se aplicaron una serie de criterios para obtener un listado de genes implicados en el estrés oxidativo a partir del análisis del *array* de metilación. El análisis de expresión de los genes resultantes de este filtrado se llevó a cabo en ARN aislado a partir de explantes de rodilla de 5 pacientes con artrosis y 4 sujetos sanos mediante PCR cuantitativa. El análisis de expresión se realizó en un termociclador a tiempo real modelo *Lightcycler*[®] 480 II (Roche), siguiendo las indicaciones del apartado 3.1.8, con los cebadores y sondas especificados en la Tabla 5 y el gen de la proteína ribosomal L13A (RPL13A) como gen de referencia.

Tabla 5. Genes a estudio relacionados con el estrés oxidativo junto con las secuencias de sus cebadores y la sonda utilizada

Gen	Sentido (5' -> 3')	Antisentido (5' -> 3')	Sonda UPL
PKD2	ttgctgggaattcaaccaat	caagaaaatgtctggctgga	#37
IPCEF1	gccagcactgcttgaagg	agcaatcatgaccatcttactgtc	#40
INS	cacaatgccacgcttctg	aggcttctctacacaccaag	#27
EGLN1	gttcattgcccggataac	cgacctgatacgccactgt	#44
CASP8	tctcccaggatgacccttt	tccaaatgcaaactggatga	#62
PYCR1	cacctgctcctggtcagc	tgctcatcaacgctgtgg	#24
SCARA3	ttcggagagagagtccactttt	tgcgattctttaccttcc	#49
GPX3	gccagcactgcttgaagg	ggggacaagagaagtccaaga	#52
RPL13A	caagcggatgaaccaac	tgtggggcagcatacctc	#28

UPL (*Universal Probe Library*, Roche): sonda específica de hidrólisis para el gen diseñado por la plataforma *Universal Probe Library Assay Design Center* (Roche[®]) con la opción de *intron spanning assay*. PKD2: Policistina 2, receptor transitorio del canal de potencial de cationes; IPCEF1: proteína de interacción para factores de intercambio de citohesinas; INS: insulina; EGLN1: Familia Egl-9, familia 1 de los factores inducibles por hipoxia; CASP8: caspasa 8; PYCR1: pirrolina-5-reductasa de carboxilato; SCARA3: receptor *scavenger* clase A miembro 3, GPX3: glutatión peroxidasa 3.

3.1.10 NUEVOS GENES EN ARTROSIS. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN UNA COHORTE DE CADERA

La cohorte de cadera estaba compuesta por 62 muestras, 39 pacientes no relacionados, diagnosticados con artrosis de cadera según los criterios del ACR (15), y 23 controles sanos que habían sufrido una fractura de la cabeza femoral y sin antecedentes de artrosis ni signos macroscópicos evidentes de la patología. Esta cohorte estaba formada por 42 (67,74%) mujeres y 20 (32,26%) varones con un media de edad de $77,52 \pm 9,96$ años con una edad mínima de 48 años y una máxima de 96 años. En el grupo de controles sanos, su promedio de edad fue de $77,44 \pm 10,68$ años, con un mínimo de 48 y un máximo de 96 años y el grupo de artrósicos su media de edad fue de $77,58 \pm 9,64$ años con un mínimo de 57 años y un máximo de 95 años.

La expresión cuantitativa de los genes LPTM5, KYNU, PLEK, CYTIP, MARCO y ALOX5, utilizando como gen de referencia el RPL13A, se realizó por PCR cuantitativa en un termociclador *Lightcycler® 480 II* (Roche®) con los cebadores y sondas especificados en la Tabla 6 y siguiendo las indicaciones del apartado 3.1.8.

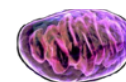
Tabla 6. Genes a estudio junto con las secuencias de sus cebadores y la sonda utilizada.

Gen	Sentido (5' -> 3')	Antisentido (5' -> 3')	Sonda UPL
LPTM5	atgggctacctcaggatcg	caggctgatgatgaagagca	#4
PLEK	ttgagaggctgtgtgggac	tgctgtgatgatctcaaaaagg	#4
KYNU	gcctgctggtgttctaca	aatgaaggcaccagcaattc	#68
CYTIP	ctgcagttacaggaacatcgtc	ttcctaactggggcaattag	#9
MARCO	gggagaaaaagggtgaaagagg	tccccagggtaccactgtag	#41
ALOX5	aaacagaccctgcacactc	cgggatttggtgagctg	#72
RPL13A	caagcggatgaacaccaac	tgtggggcagcatacctc	#28

UPL (Universal Probe Library, Roche): sonda específica de hidrólisis para el gen diseñado por la plataforma *Universal Probe Library Assay Design Center* (Roche) con la opción de *intron spanning assay*.

3.1.11 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Los datos obtenidos de la expresión cuantitativa fueron analizados con el programa estadístico *Qbase plus®* v. 2.5 (Biogazelle, Ghent University) utilizando pruebas no paramétricas como el test de Mann-Whitney que se aplica a dos muestras independientes. Los p-valores inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los valores de expresión se representaron con el programa *Prism®* v. 5.0a (GraphPad Software Inc.).



3.2 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE METILACIÓN EN FUNCIÓN DE LOS HAPLOGRUPOS

Con los datos obtenidos del *array* de metilación descrito en el apartado 3.1, se estudió el papel de los haplogrupos mitocondriales H y J en el patrón de metilación del ADN. Los datos normalizados y las características de las distintas muestras (metadata) se descargaron del portal NCBI *Gene Expression Omnibus* (GEO) (*submission number* GSE43191) y se sometieron a un filtrado y normalización con el programa R con el paquete Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>).

Se calcularon los p-valores, que miden la diferencia de las intensidades de señal entre las islas CpG interrogadas y 16 sondas definidas como control negativo incluidas en el *array*. Se eliminaron aquellas sondas con un p-valor mayor a 0,05 en más del 25% de las sondas y aquellas en las que su secuencia estaba situada en los cromosomas sexuales. Para los análisis de metilación diferencial se calculó el valor-M con el paquete *lumi* y *Methylumi* (<http://www.bioconductor.org>) y como resultado del filtrado de los datos, una muestra con el haplogrupo mitocondrial J obtuvo un p-valor mayor a 0,05 en más del 25% de las sondas, siendo eliminada del análisis.

3.2.1 ANÁLISIS DE LOS PROCESOS BIOLÓGICOS. DAVID

El análisis enriquecido de los procesos biológicos se realizó con la herramienta online DAVID v6.7 (<https://david.ncifcrf.gov>), que es una base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado del significado biológico de un gran listado de genes. Este programa calculó el p-valor esperado de los diferentes procesos biológicos representados en las sondas seleccionadas. El p-valor esperado indica la representación de una lista de genes seleccionados frente a otra lista de referencia, frente al genoma o parte del genoma indicando con un p-valor la presencia o ausencia de los genes seleccionados frente al total. El p-valor se calcula como la probabilidad de que alguno de los genes de la lista aparezcan en un proceso del GO dividido por el total de los genes que aparecen relacionados con ese proceso del genoma completo. Para realizar el análisis se confeccionó una lista con los genes DMs entre los haplogrupos mitocondriales H y J.

3.2.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CARTÍLAGO Y EXTRACCIÓN DE ARN

A partir del banco de tejido del INIBIC se realizó una búsqueda equitativa de muestras de pacientes con artrosis de rodilla y controles sanos, con los haplogrupos H y J. De las muestras disponibles, se obtuvo un grupo con una distribución de 2 controles sanos y 5 pacientes artrósicos con haplogrupo J y, para el haplogrupo H, 4 controles sanos y 5 pacientes artrósicos.

Este grupo de muestras de rodilla tiene una media de edad de $68,43 \pm 15,03$ años con una edad mínima de 25 años y una máxima de 87 años, el promedio de edad para los controles fue de $56,5 \pm 17,58$ años, con una edad mínima de 25 y una máxima de 73 años. En el caso de los pacientes artrósicos su edad media fue de $76 \pm 7,26$ años, con una edad mínima de 62 y una máxima de 87 años. Este grupo está compuesto por 7 mujeres y 9 varones.

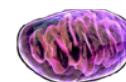
De todos ellos se aisló el ARN a partir de cartílago, siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 3.1.6.1. El ARN extraído fue utilizado para el estudio de expresión diferencial y para la obtención de perfiles transcriptómicos asociados a los haplogrupos mediante la técnica de secuenciación masiva *RNA-Seq* (Illumina®).

3.2.3 ESTUDIO DE VALIDACIÓN POR *RNA-SEQ*

El *RNA-Seq* es una técnica cuantitativa que se utiliza para determinar los niveles de expresión más fehacientemente que con los *micro-arrays*. En teoría es posible determinar la cuantificación absoluta de cada molécula en una población celular y comparar resultados entre experimentos directamente, siendo la expresión génica determinada comparable con una PCR cuantitativa. Además puede capturar la dinámica del transcriptoma a través de distintos tejidos o condiciones sin una normalización sofisticada de los datos. (415)

Esta técnica se basa en la secuenciación directa del ADNc usando tecnologías de secuenciación de alto rendimiento seguido del mapeo de las lecturas secuenciadas del genoma. Esto genera una mayor comprensión del transcriptoma y permite la identificación de exones e intrones, el mapeo de sus límites, la identificación de las terminaciones 3' o 5' de los genes y el descubrimiento de nuevas variantes de *splicing* y monitorizar la expresión alélica (416).

El transcriptoma es la parte del genoma que se expresa en una célula en una etapa específica de su desarrollo y se le denomina así a todo el conjunto de transcritos que se expresan y su cantidad. Su comprensión es esencial para interpretar las funciones elementales del genoma y para entender su desarrollo y la enfermedad. El estudio del transcriptoma, la transcriptómica, posee dos



funciones principales, catalogar todas las especies de transcritos que existen y determinar la estructura transcripcional de los genes (416).

De forma general, el *RNA-Seq* se basa en que a partir de una muestra de ARN (total o fraccionado (colas poli-A) se convierte en una librería de fragmentos de ADNc con adaptadores unidos a sus extremos. Cada molécula con o sin amplificación se secuencian para obtener pequeñas secuencias con un extremo (*single-end*) o con dos extremos (*paired-end*). Tras la secuenciación las lecturas resultantes, que suelen poseer un tamaño de 30 a 300 pb, pueden mantener la orientación de la cadena original de la que se transcribió (*stranded*), o no ofrecer la orientación de la cadena original (*unstranded*), dependiendo del tipo de secuenciación que se haya realizado (417). A continuación, estas lecturas secuenciadas se alinean con un genoma de referencia o con transcritos de referencia, o incluso, son ensamblados *de novo* sin una secuencia genómica para producir un mapa de transcripción a escala del genoma que consiste en la estructura transcripcional y/o los niveles de expresión de cada gen (415) (Figura 14).

El estudio de *RNA-Seq* se realizó utilizando la tecnología de secuenciación a gran escala de Illumina®, que tiene como base la amplificación clonal de moléculas individuales de ARN que sirven como matrices de secuenciación. En este proceso de secuenciación por síntesis se utilizan nucleótidos marcados con fluorescencia y con terminación reversible.

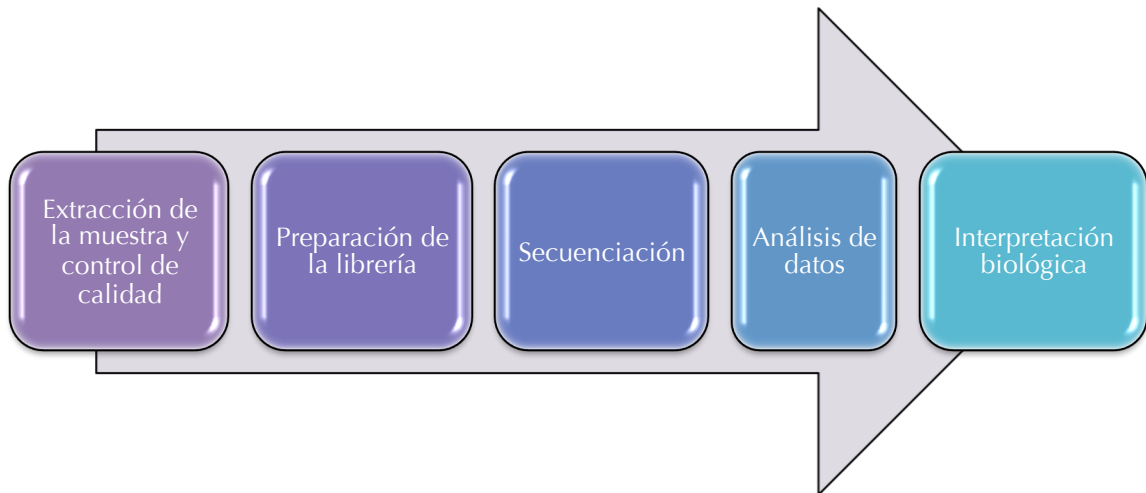
La cantidad, calidad e integridad de las muestras de ARN se comprobaron mediante el espectrofotómetro *Nanodrop*® *ND1000* y con el *Bioanalizador*® *2100* (Agilent). Para la preparación de la librería se partió de 30 ng de ARN y se utilizó el kit *Ovation*® *Universal RNA-Seq System* (NuGEN), este kit de amplificación del transcriptoma total, es específico para amplificar ADNc de ARN total o ARN mensajero (ARNm) con gran cantidad de colas poli-A y con concentraciones entre 100-500 pg. Este kit aumenta varios microgramos la cantidad inicial de ADNc y los deja preparados para el análisis por *RNA-Seq*. Una vez realizadas las librerías se comprobó su calidad mediante su cuantificación con *Qubit*® (Invitrogen) y con el bioanalizador. En este paso se comprueba el rango de tamaños obtenidos tras la fragmentación del ADNc que para la secuenciación con la tecnología de *Illumina* debe estar en un rango de 150-1000pb.

Las muestras se dividieron en 2 grupos o *pools*, en el *pool1* se incluyeron las muestras de ARN con cierto grado de degradación y en el *pool2* las que poseían su ARN más intacto. Este proceso es necesario debido a la capacidad

Material y métodos

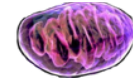
de las *line* del secuenciador y por otro lado para favorecer la cobertura al comparar ambos *pooles*. Las librerías se desnaturalizaron con hidróxido de sodio (NaOH) y se diluyeron para su posterior incorporación en el soporte físico de las muestras durante el proceso de secuenciación (*flow cell*).

Figura 14: Flujo de trabajo del RNA-Seq.



A continuación, se procedió a la generación de *clusters* dentro de la *flow cell*, donde los moldes de secuenciación son inmovilizados para facilitar el acceso a las enzimas mientras se asegura una alta estabilidad de la unión al molde y una mínima unión no específica de los nucleótidos marcados fluorescentes. La amplificación de la fase sólida crea hasta 1.000 copias idénticas alcanzando una densidad del orden de 10 millones de moléculas por cm^2 en cada *cluster*.

Posteriormente se procedió a su secuenciación en el secuenciador *HiSeq 4000* (Illumina®), donde los *clusters* sirven como matrices de secuenciación y en cada ciclo se incorpora 1 nucleótido que es registrado por el aparato. El protocolo utilizado realizó un programa de 101 ciclos de lectura pareada (*pair-end*) incluyendo 6 ciclos para la secuenciación. Los resultados de la secuenciación masiva se chequearon con el programa *HCS (HiSeq Control Software v3.3, Illumina®)* y la asignación de bases por el programa *RTA (Real Time Analysis v2.5.2, Illumina®)*. Posteriormente, se realizó el proceso mediante el cual se infiere un orden de nucleótidos en un molde durante la reacción de secuenciación que se denomina *Base Calls (BCL)*, el informe de BCL se obtiene en lenguaje binario, que se transformó a archivos *.fastq* con el paquete *bcl2fastq v2.16.0.10 (Illumina®)*. El resultado de este proceso es un archivo de texto plano en formato *.fastq* que contiene la secuencia de cada uno de los fragmentos secuenciados e información acerca de su calidad (418).



3.2.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS DEL *RNA-SEQ*

En un típico análisis de datos de *RNA-seq* el modelo más utilizado implica dos pasos: a) alineamiento de las lecturas a un transcriptoma o genoma de referencia y b) el cálculo de la abundancia de los diferentes transcritos. En este trabajo, se ha optado por un análisis menos tradicional, el método *kallisto* (419), que se basa en el “pseudoalineamiento” de las lecturas y fragmentos de secuenciación, el cual se centra solamente en identificar las lecturas que pueden haber originado los transcritos y no en precisar como las secuencias de las lecturas y los transcritos alinean.

El método *kallisto* se basa en la metodología de los gráficos de *Bruijn*, la teoría de *Bruijn* se basa en encontrar una secuencia cíclica de letras, en un alfabeto dado, para el cual cada palabra de una cierta longitud (*k*) es posible y aparece como una cadena de caracteres consecutivos en la secuencia cíclica exactamente una vez. La aplicación de los gráficos de *Bruijn* ha demostrado ser indispensable en el ensamblamiento de ADN y ARN, para lidiar con el problema de ensamblar miles de millones de secuencias cortas con un único genoma (420). El método *Kallisto* usa como referencia un gráfico del transcriptoma de *Bruijn* contruido a partir de pequeños fragmentos de secuencia (*k-mers*), presentes en el transcriptoma y diferentes rutas para unir todos los vértices del gráfico de *Bruijn*, siendo estas rutas los diferentes transcritos (Figura 15).

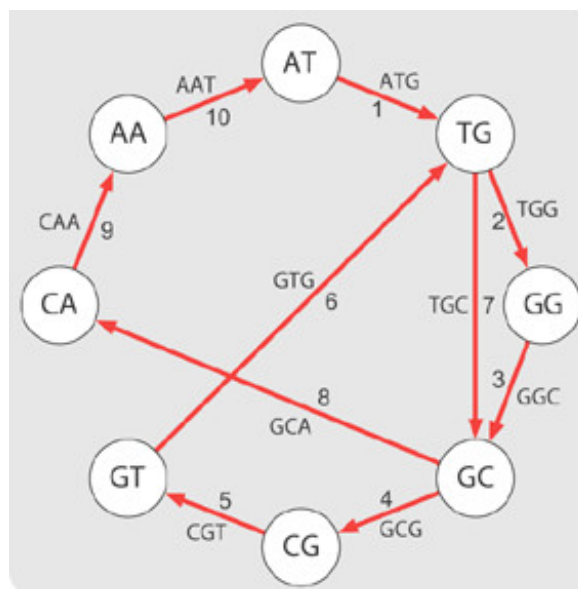


Figura 15. Ejemplo de un gráfico de *Bruijn*. Los nodos (círculos) son secuencias cortas (*k-mers*), los números marcan cada paso a seguir en un ejemplo de ruta para representar la secuencia ATGGCGTGCAATG. (Modificado de P E C Compeau, P A Pevzner, G Tesler. *How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. Nature Biotechnology* 29, 987–991 (2011)).

Como paso previo al alineamiento, las secuencias fueron analizadas con el paquete FastQ (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) a modo de pre-tratamiento y control de calidad. Una vez que el alineamiento es realizado, la cuantificación de los transcritos se produce mediante el algoritmo de *expectation-maximization* (EM) aplicado a las clases de equivalencia o pseudoalineamientos conseguidos en el paso anterior. Aunque la función de verosimilitud (*likelihood*) es simple, incluye un modelo para distintos tipos de sesgo lo que permite aplicar el EM de una manera muy rápida y eficiente.

Para la ejecución de *kallisto* primero se generó un índice del transcriptoma humano usando como referencia la versión 88 del *GRCh38* ubicado en el servidor *Ensembl* (www.ensembl.org). *Kallisto* fue ejecutado con 50 bootstraps en un portátil con 16GB de RAM y un procesador Intel Core I7 a 3.1Ghz.

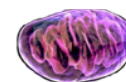
3.2.4.1 Análisis de expresión diferencial

Todos los análisis de expresión diferencial se realizaron mediante el empleo del software R (<https://cran.r-project.org>). Para convertir y cuantificar la abundancia a nivel génico se utilizó el paquete *tximport* (421), como unidad de cuantificación se utilizaron transcritos por millón (TPM) y los TPMs obtenidos fueron escalados usando la longitud media del transcrito teniendo en cuenta la media de todas las muestras y el tamaño de la librería, posteriormente fueron colapsados a gen como unidad.

Para la cuantificación de la expresión diferencial, se siguió el método *limma-voom* (422), que permite una estimación de manera robusta y no paramétrica de la relación entre la media y varianza en experimentos de *RNA-Seq* basados en los recuentos (*counts*) simplificado en el acrónimo *voom* (del inglés, variance modeling at the observational level). Esta estimación entre la media y la varianza es incorporada posteriormente por medio de un *weight* (peso cuantitativo) para cada observación individual normalizada. Estas observaciones pueden ser usadas en aplicaciones estadísticas posteriores como “limma” (422).

Realizamos un modelo para averiguar las diferencias entre los haplogrupos mitocondriales utilizando como variable independiente el haplogrupo mitocondrial y como covariables el diagnóstico, el sexo, la edad y el *pool* de secuenciación.

$$\text{TPMs} \sim \text{Haplogrupo} + \text{diagnóstico} + \text{sexo} + \text{edad} + \text{pool}$$



El modelo fue incorporado al método *empirical Bayes* del paquete *limma* en el programa R (<https://cran.r-project.org>), para producir una matriz de genes diferencialmente expresados. La elección de esta metodología se basó en su amplio uso en la literatura y en la habilidad del test empírico de *Bayes* del paquete *limma* (423).

Se consideraron estadísticamente significativos aquellos transcritos con un p-valor ajustado menor a 0,005 y con un *log Fold Change* (Log.Fc) mayor que 4. La visualización de los genes diferencialmente expresados se realizó por medio de *volcano plots* y *heatmaps* (R, <https://cran.r-project.org>). El análisis enriquecido de los procesos biológicos se realizó con la herramienta online DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) tal como se describe en el apartado 3.2.1.

3.3 PROPUESTA Y JUSTIFICACIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS Y SUS POLIMORFISMOS

Se realizó un estudio de genes candidatos implicados en la detoxificación celular o en la regulación/producción de ROS y RNS para explorar su papel en el desarrollo de la artrosis; de todos ellos se seleccionaron aquellos que tuvieran descrito un polimorfismo que modificara su expresión y/o actividad. El objetivo era buscar un genotipo específico que, en combinación con el fondo genético mitocondrial, modulara la respuesta frente al estrés oxidativo, mejorando la detoxificación celular y, en consecuencia, protegiendo frente al desarrollo de la artrosis.

Los genes seleccionados y sus respectivos polimorfismos fueron:

- a. El gen de la Superóxido Dismutasa 2 (SOD2); es una proteína mitocondrial muy importante que cataliza la dismutación del O_2^- en O_2 y H_2O_2 . El polimorfismo **rs4880** es el más ampliamente estudiado y causa una substitución de una Alanina por una Valina (Ala-9Val), provocando una proteína secundaria alterada que genera una disminución en la importación mitocondrial de la enzima (305).
- b. La enzima Catalasa (CAT) metaboliza los radicales libres de O_2 descomponiendo el H_2O_2 en H_2O y O_2 lo que protege a las células del daño oxidativo. El polimorfismo estudiado (-262C/T, **rs1001179**) se encuentra en la región promotora del gen, lo que produce cambios en sus niveles de expresión (424).
- c. La proteína desacoplante 2 (UCP2), desacopla la entrada de protones en la mitocondria desde la síntesis de ATP regulando la producción de ROS y NO. Uno de los polimorfismos de este gen es el **rs659366** (866

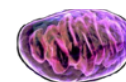
- G/A) situado en la región promotora, está asociado con la expresión de ARNm así como con el riesgo de estrés oxidativo (425).
- d. La Glutación Peroxidasa 1 (GPX1) se encuentra ampliamente expresada y es una enzima clave para la descomposición del H_2O_2 en la mitocondria. Su polimorfismo **rs1050450** (599 C/T) modifica la actividad de la enzima y provoca un desajuste del equilibrio oxidante/antioxidante debido a que la substitución del aminoácido inicial cambia la conformación estructural del sitio activo de la enzima (426).
 - e. La 8-Oxoguanina Glicosilasa 1 (OGG1) cataliza la descomposición de Oxodeoxiguanosina del ADN, que es la lesión más abundante causada por el estrés oxidativo. Existen muchos polimorfismos en este gen, en este estudio nos centramos en el SNP **rs1052133**, localizado en el codón 326 exon 7 (Ser326Cys). La presencia de este polimorfismo reduce la actividad reparadora del ADN por parte de la enzima (427).
 - f. La enzima Óxido Nítrico Sintasa inducible 2A, (NOS2A) posee variantes génicas que se han asociado con alteraciones en la producción de NO en enfermedades inflamatorias. Esta asociación está relacionada con la repetición corta en tándem de un pentanucleótido, (CCTTT)_n, localizado en su región promotora que influye en el nivel de expresión de ARNm de este gen (428).

3.3.1 COHORTE DE PACIENTES Y CONTROLES DEL ESTUDIO

EPIDEMIOLOGICO. DESCRIPCIÓN

Para la realización del estudio epidemiológico se realizó el cálculo del tamaño muestral necesario para detectar un *Odd Ratio* (OR) de 0,6, con una potencia estadística del 80%, una seguridad del 95% y teniendo en cuenta la frecuencia esperada de exposición de casos (0,15) y controles (0,23) en relación al *cluster* mitocondrial Tj, se determinó que la cohorte debería estar formada, al menos, por 574 pacientes artrósicos y 300 controles sanos radiológicos.

Finalmente, la cohorte de cadera PROCOAC estaba constituida por 956 sujetos no relacionados, que se sometieron a un reemplazo articular de cadera para la colocación de una prótesis articular en el CHUAC. Del total, 608 fueron diagnosticados con artrosis de cadera según los criterios del ACR y con un grado III o IV según la escala K-L (12); los restantes 348 se clasificaron como controles sanos ya que son sujetos que, habiendo sufrido una fractura de cadera, se comprobó que estaban libres de artrosis en esa articulación mediante un estudio radiográfico.



3.3.2 COHORTES DE VALIDACIÓN. DESCRIPCIÓN

3.3.2.1 *Cohorte Santiago*

La cohorte de cadera está formada por 304 pacientes que se han sometido a un reemplazo articular total de cadera en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) debido a una artrosis primaria severa según los criterios de la ACR. El grupo control está formado por los controles sanos radiológicos procedentes de la cohorte PROCOAC.

3.3.2.2 *Cohorte del OAI*

La cohorte de rodilla empleada forma parte de la *Osteoarthritis Initiative* (OAI), que es una iniciativa creada en el año 2002 por el Instituto Nacional de Salud norteamericano y sectores privados. Se trata de un estudio multicéntrico donde se recogen y almacenan los datos clínicos, radiológicos y muestras biológicas de 4796 participantes (429). Los integrantes de este estudio fueron clasificados en tres grupos: participantes con artrosis radiológica de rodilla y síntomas evidentes de dolor articular en al menos una de las rodillas, **cohorte de progresión** (n=1396); participantes con dolor articular pero sin signos radiográficos definidos de artrosis, **cohorte de incidencia** (n=3278) y participantes que no presentaban signos ni riesgo de desarrollar artrosis, **cohorte de sanos** (n=122).

De estas cohortes se realizó una selección aleatorizada de los participantes con los siguientes criterios: para ser tratado como un control sano, el sujeto debía tener una edad mínima de 55 años y que no se identificaran signos radiológicos de artrosis en ninguna de las dos rodillas, así como tener un grado K-L igual a 0 en las sucesivas visitas (hasta 6 visitas). Para ser considerado como un paciente artrósico debía tener un grado K-L igual o mayor que 3 en las primeras visitas.

Tras la selección de sujetos de la cohorte, se llevó a cabo el cálculo del tamaño muestral necesario para detectar un OR de 0,5, con una potencia estadística del 80%, una seguridad del 95% y teniendo en cuenta que la frecuencia del alelo recesivo era del 8,7%. Con estos criterios se determinó que la nueva cohorte debería estar formada, al menos, por 429 pacientes artrósicos y 429 controles sanos. Con los criterios establecidos, se seleccionó una subcohorte del OAI formada por 482 pacientes artrósicos reclutados de la cohorte de progresión y 460 pacientes sanos pertenecientes a las cohortes de incidencia y sanos.

3.3.3 EXTRACCIÓN DE ADN

El aislamiento de ADN se realizó a partir de las muestras disponibles que se obtenían de cada paciente, es decir, a partir de sangre periférica, cartílago articular o cultivo primario de condrocitos.

3.3.3.1 A partir de sangre

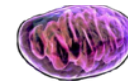
Para el aislamiento de ADN se partió de 250 μ L de sangre total y se usó el kit *QIAmp[®] DNA Blood Mini kit plus* (QIAGEN); este kit usa el principio de membranas de silica-gel donde el ADN se une específicamente y permite que los restos de cationes divalentes y proteínas pasen a través de las membranas quedando un ADN purificado. Este proceso está automatizado con el robot *QIAcube[®]* (QIAGEN).

3.3.3.2 A partir de tejido

El aislamiento de ADN se realizó con el tampón CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) elaborado en el laboratorio; este tampón es una solución muy adecuada para la extracción de ADN genómico ya que forma complejos con las proteínas y polisacáridos pero no precipita los ácidos nucleicos.

Para ello se tomaron 50 mg de tejido y se le añadió 500 μ L de tampón CTAB y con unas tijeras *Noyes* se disgregó el tejido en pequeños trozos, se añadieron 5 μ L de proteinasa K (*Protease*, QIAGEN[®]) y se incubó a 60°C con agitación durante toda la noche. Tras este proceso se añadió una mezcla de RNasas para eliminar las cadenas simples de ARN de la muestra (*RNAse DNase-free*, procedente de páncreas bovino, Roche[®]) a una concentración de 1 μ g/ μ L y se incubó a 37°C durante 20 min.

A continuación se usó el método de separación con cloroformo para conseguir distinguir las distintas fases por centrifugación. Se añadieron 500 μ L de cloroformo, se incubó 5 min a temperatura ambiente en una noria y a continuación se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C. Debido a la solubilidad del ADN, éste queda disuelto en la fase soluble que se recogió y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadió isopropanol (Sigma) en una proporción de 2/3 del volumen recogido en el paso anterior, se mezcló por inversión generando la precipitación de los ácidos nucleicos en forma de ovillo. La mezcla se dejó 24h a -20°C para permitir que el ADN precipitara en su totalidad, luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C y se retiró el



sobrenadante. Finalmente se realizó un lavado con 1 mL de Etanol al 70% frío, se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C y se dejó secar el *pellet* y una vez seco, se resuspendió en 30-50 µL de tampón de elución para ADN, *Buffer AE* (QIAgen®), para su mejor conservación.

3.3.3.3 A partir de *pellet* celular de condrocitos

Para realizar la extracción de ADN a partir de células se realizó un *pellet* celular procedente de un cultivo en monocapa de 100.000 condrocitos crecidos como mínimo durante 48h, con el kit *Spin Tissue Mini* (Invisorb®). Primero se lisaron las células, para lo cual se añadieron 400 µL del tampón de lisis G y 40 µL de proteinasa K; esta mezcla se incubó a 52°C en un incubador con agitación durante 15 min y luego se centrifugó a 11.000 rpm durante 2 min. A continuación se recuperó el sobrenadante y se le añadieron 200 µL del tampón Binding A, se dió un vortex y se transfirió a las columnas del kit que contienen una membrana de silica-gel con una gran afinidad por el ADN donde queda retenido.

A continuación se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 11.000 rpm durante 2 min. Se añadieron 550 µL del tampón de lavado y se centrifugó a 11.000 rpm durante 1 min, este paso se realizó dos veces para eliminar los restos de proteínas. Además, para eliminar los restos de etanol de los tampones de lavado se centrifugó en vacío a 14.000 rpm durante 4 min. Por último, se añadieron 50 µL del tampón de elución precalentado a 52°C y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min, luego se centrifugó a 11.000 rpm durante 1 min para eluir el ADN que estaba retenido en la membrana.

3.3.4 TÉCNICAS DE GENOTIPADO DE LOS DIFERENTES POLIMORFISMOS

ESTUDIADOS

Se realizaron 3 abordajes diferentes para llevar a cabo el genotipado de los polimorfismos; estas estrategias se basaron principalmente en la naturaleza de los mismos así como en la idoneidad en función de las complicaciones técnicas derivadas de la metodología.

3.3.4.1 *Single Base Extension (SBE)*

Esta técnica se basa en el anillamiento de un cebador específico y complementario a la región inmediatamente contigua al extremo 3' de la secuencia que contiene el SNP que queremos interrogar. Así, en el momento

en el que la Taq polimerasa comience a sintetizar la cadena complementaria a partir del cebador, ésta incorporará la base complementaria correspondiente, desvelando de esta forma la identidad del SNP de interés. Para impedir la elongación de la cadena sólo se usan dideoxinucleótidos terminadores (ddNTPs) que carecen del grupo OH en el carbono 3' del azúcar (Figura 16).

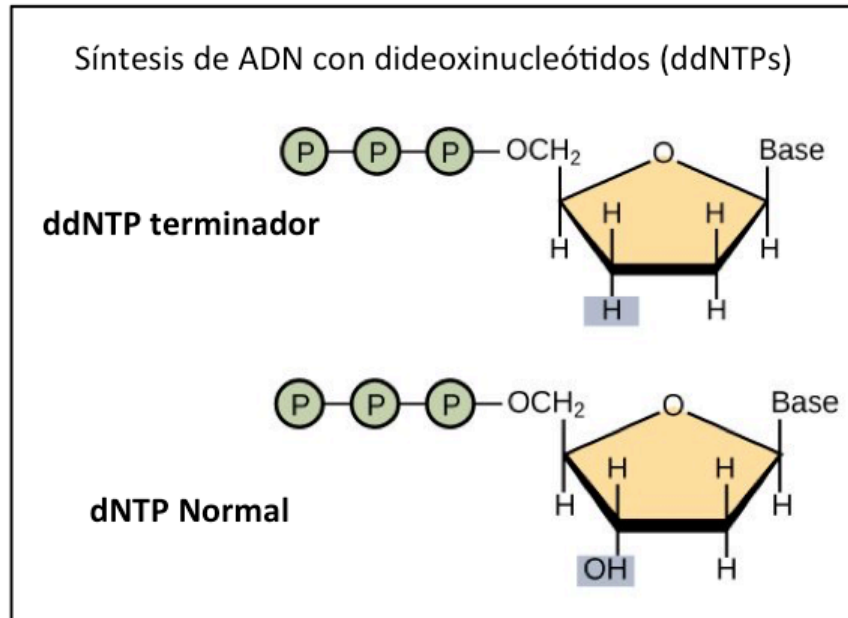
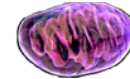


Figura 16. Esquema mostrando las diferencias entre deoxinucleótido normal (dNTP) y dideoxinucleótido terminador (ddNTP). (figura modificada de www.ubooks.pub/books/on/b0/e25r5678/p3c7s4u25.html)

En primer lugar se realizó una amplificación de los fragmentos que contienen los polimorfismos, de modo que la mezcla de reacción de la PCR contiene una concentración final de 1X del tampón de reacción, 0,2 mM de cada deoxinucleótido (dNTP), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,025 U/ μL de *BioTaq DNA polimerasa* (Bioline®), 0,2 μM de cada cebador y 100 ng de ADN genómico en un volumen final de 20 μL . La amplificación se realizó en un termociclador *Veriti* (ThermoFisher) con el siguiente programa de temperaturas: una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 60 s, 55°C durante 60 s, 72°C durante 60 s y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Para comprobar la amplificación, los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en Tampón TBE (Tris-Borato-EDTA).

A continuación se realizó una purificación de los productos de PCR con *ExoSap-IT* (illustra™ ExoProStar™ 1-Step, Healthcare) tomando 2 μL de la mezcla de la enzima para 5 μL del producto de PCR. Este producto es una mezcla de dos enzimas, una exonucleasa, que desnaturaliza los fragmentos de los cebadores no anillados, y una fosfatasa alcalina, que desnaturaliza los



dNTPs no incorporados. El programa consta de 2 rampas de temperatura, donde primero se activan las enzimas a 37°C y luego se inactivan a 80°C.

Para realizar la técnica del SBE se siguieron las indicaciones descritas por Rego y Col. (2008) (430) que consistió en realizar una mezcla con 1 µL del reactivo *SNaPshot® Multiplex Kit* (ThermoFisher) que posee el tampón, los ddNTPs y la polimerasa, a la cual se añadieron los cebadores específicos para el SBE a una concentración de 0,2 µM y agua hasta completar un volumen de 10 µL. El programa de temperaturas consta de una desnaturalización inicial a 96°C durante 60 s y 25 ciclos de 96°C durante 10 s, 60°C durante 5 s y 60°C durante 30 s.

Los productos resultantes de la reacción del SBE se purificaron con el reactivo *Fast-AP®* (ThermoFisher) que incluye también un tampón específico para la enzima fosfatasa alcalina que degrada los ddNTPs sobrantes no incorporados. La mezcla se realizó con 1 µL de enzima, 2 µL de tampón y se completó con agua hasta un volumen de 10 µL y se le añadió a los 10 µL de volumen de reacción de los productos de SBE. El programa de temperaturas conlleva dos rampas diferentes, una a 37°C durante 15 min para activar la enzima y otra a 75°C durante 15 min para inactivarla. Para cargar las muestras en el secuenciador, éstas se mezclaron con formamida (*Hi-Di™ Formamide* (ThermoFisher) y un marcador de peso molecular interno (*GeneScan™ 120 LIZ™ dye Size Standard*, ThermoFisher) según las siguientes proporciones: 9,35 µL de formamida, 0,15 µL del marcador y 0,5 µL del producto purificado. La formamida actúa como vehículo para separar los fragmentos en el interior de los capilares del secuenciador (*ABI 3130XL Genetic Analyzer*, ThermoFisher). A continuación, para desnaturalizar el marcador, la mezcla se sometió a 95°C durante 5 minutos antes de cargar las muestras en el secuenciador.

El secuenciador utilizado posee capilares de 36 cm que tienen en su interior un soporte polimérico especial denominado polímero (*Performance Optimized Polymer 4 (POP4)*, ThermoFisher) que contiene urea. El módulo estándar de la carrera para el SBE consiste en 22 s como tiempo de inyección, 7,5 min de tiempo de carrera con un voltaje de 15 KVolts. Tras la secuenciación de las muestras los datos fueron analizados con el programa *Genemapper v4.0* (ThermoFisher) para asignar los alelos (SNPs) en cada *locus* a partir de una secuencia de referencia. Los SNPs OGG1 y SOD2 se amplificaron juntos en una reacción *multiplex* ya que la diferencia de tamaño de sus amplicones era suficiente para diferenciarlos en la misma reacción, mientras que el resto de SNPs (CAT, UCP2 y GPX1) se realizaron en reacciones de *singleplex* por separado. Los cebadores utilizados en este paso se describen en la Tabla 7.

Material y métodos

Tabla 7. Secuencia de los cebadores y tamaño del amplicón para las reacciones de PCR.

Gen	SNP	Sentido (5' -> 3')	Antisentido (5' -> 3')	Tamaño del amplicón
SOD2	rs4880	GGCTGTGCTTTCTC GTCTTCA	TCTGCCTGGAGCCCAG ATAC	<100 nt
CAT	rs1001179	CCAAGATTGGAAGC CCAA	GAGCTGAGAAAGCATA GCTA	295 nt
UCP2	rs659366	CCTACACACAGACA AGCA	CAGGGTGTAAAGTGTGT GA	516 nt
GPX1	rs1050450	GTTGCCTGGAACCTT TGAGA	GACACAGGACATACAC ACA	367 nt
OGG1	rs1052133	ACTGTCACTAGTCTC ACCAG	CCTTCCGGCCCTTTGG AAC	156 nt

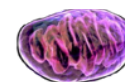
Los cebadores para la reacción del SBE se diseñaron de forma que para poder identificar el SNP, los fragmentos originados deberían de tener diferente tamaño, por lo que se le añadió una cola inespecífica en el extremo 5'. En la Tabla 8 se muestra la secuencia de los cebadores utilizados para el SBE y las colas inespecíficas.

Tabla 8. Secuencia de los cebadores de SBE en mayúscula y secuencia de la cola inespecífica en minúscula.

Gen	Cebador SBE
SOD2	5'-gactgactgactgactgactgactgactgactTGGAGCCCAGATACCCCAAA-3'
CAT	5'-aagactgactgactgactgactgactgactGCCCTGGGTTCGGCTAT-3'
UCP2	5'-aaaagactaaaaCAATTGTTGGCTGTTACGC-3'
GPX1	5'-gactgactgactgactgactgactAAGCCCTGCTGTCTCAAGGGC-3'
OGG1	5'-TTCAGTGCCGACCTGCGCCAAT-3'

3.3.4.2 Electroforesis capilar empleando cebadores marcados

Para determinar las repeticiones cortas en tándem, primero se realizó una amplificación por PCR del fragmento donde se sitúan las repeticiones a partir de 20 ng de ADN. En este caso se utilizó un programa de temperaturas que consta de: una desnaturalización inicial de 94°C durante 10 min, 40 ciclos de



94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min, 72°C durante 1 min y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Uno de los cebadores tiene un marcaje *FAM*TM en su extremo 5' para su posterior detección en la electroforesis capilar. Los cebadores utilizados en este paso se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9: Secuencia específica para los cebadores del microsatélite del gen NOS2A.

Gen	Sentido (5' -> 3')	Antisentido (5' -> 3')	Tamaño del amplicón
NOS2A	6FAM TM -ACCCCTGGAA GCCTACAACACTGCAT	GCCACTGCACCCTAGCC TGTCTCA	>136 nt

Por electroforesis en gel de agarosa, al 1,5% en TBE, se comprobó la correcta amplificación de la PCR. Este producto se diluyó a razón de 1:40 en agua destilada, debido a que éste se obtiene en una alta concentración y es necesario diluir el producto de la PCR para que la lectura en el secuenciador esté dentro del rango adecuado.

A continuación, los productos diluidos se mezclaron con 9,35 µL de formamida (*Hi-Di*TM *Formamide*, ThermoFisher) y 0,15 µL del marcador de peso molecular interno (*GeneScan*TM *500 LIZ*TM *dye Size Standard*, ThermoFisher). Antes de cargar las muestras en el secuenciador, la mezcla fue introducida en un termociclador durante 5 min a 95°C para desnaturalizar el marcador de peso molecular. El módulo estándar de la carrera para la secuenciación con cebadores marcados consiste en 20 s como tiempo de inyección, 40 min de tiempo de carrera con un voltaje de 15 KVolts.

Para el análisis de la repetición en tándem del gen NOS2A se utilizó el programa *Peak Scanner v1.0* (ThermoFisher) para determinar el número de repeticiones que presentaba cada alelo.

3.3.4.3 Asignación de los haplogrupos mitocondriales

Para llevar a cabo la asignación de los haplogrupos mitocondriales, en primer lugar se amplificó por PCR la región donde se encuentran los polimorfismos de una sola base que permiten identificar los haplogrupos mitocondriales Europeos más comunes (430) (Tabla 10).

Material y métodos

Tabla 10: Sitios polimórficos interrogados para asignar los 6 haplogrupos mitocondriales mayoritarios Europeos.

Sitios Polimórficos						
Haplogrupo	7028	14766	10398	4580	12308	4216
H	C	C	A	G	A	T
V	T	C	A	A	A	T
K	T	T	G	G	G	T
U	T	T	A	G	G	T
T	T	T	A	G	A	C
J	T	T	G	G	A	C

La reacción de la PCR multiplex se realizó siguiendo las indicaciones detalladas en el apartado 3.3.4.1, aunque en este caso se partió de una concentración de 50 ng de ADN genómico en un volumen final de 20 μ L. La amplificación se realizó en un termociclador Veriti (ThermoFisher) con el siguiente programa de temperaturas: una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos, 45 ciclos de 94°C durante 60 s, 55°C durante 60 s, 72°C durante 60 s y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Se utilizaron 6 cebadores específicos (Tabla 11) descritos anteriormente por Rego y col. (2008) (430), para amplificar los fragmentos del ADNmt que contienen los SNPs informativos que caracterizan los seis haplogrupos mayoritarios Europeos (Figura 17).

Para comprobar la amplificación, los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en Tampón TBE. El genotipado de los haplogrupos mitocondriales se realizó mediante la técnica del SBE descrita en el apartado 3.3.4.1. Tras la secuenciación de las muestras los datos fueron analizados con el programa Genemapper v4.0 (ThermoFisher) para asignar los haplogrupos mitocondriales a partir de una secuencia de referencia.

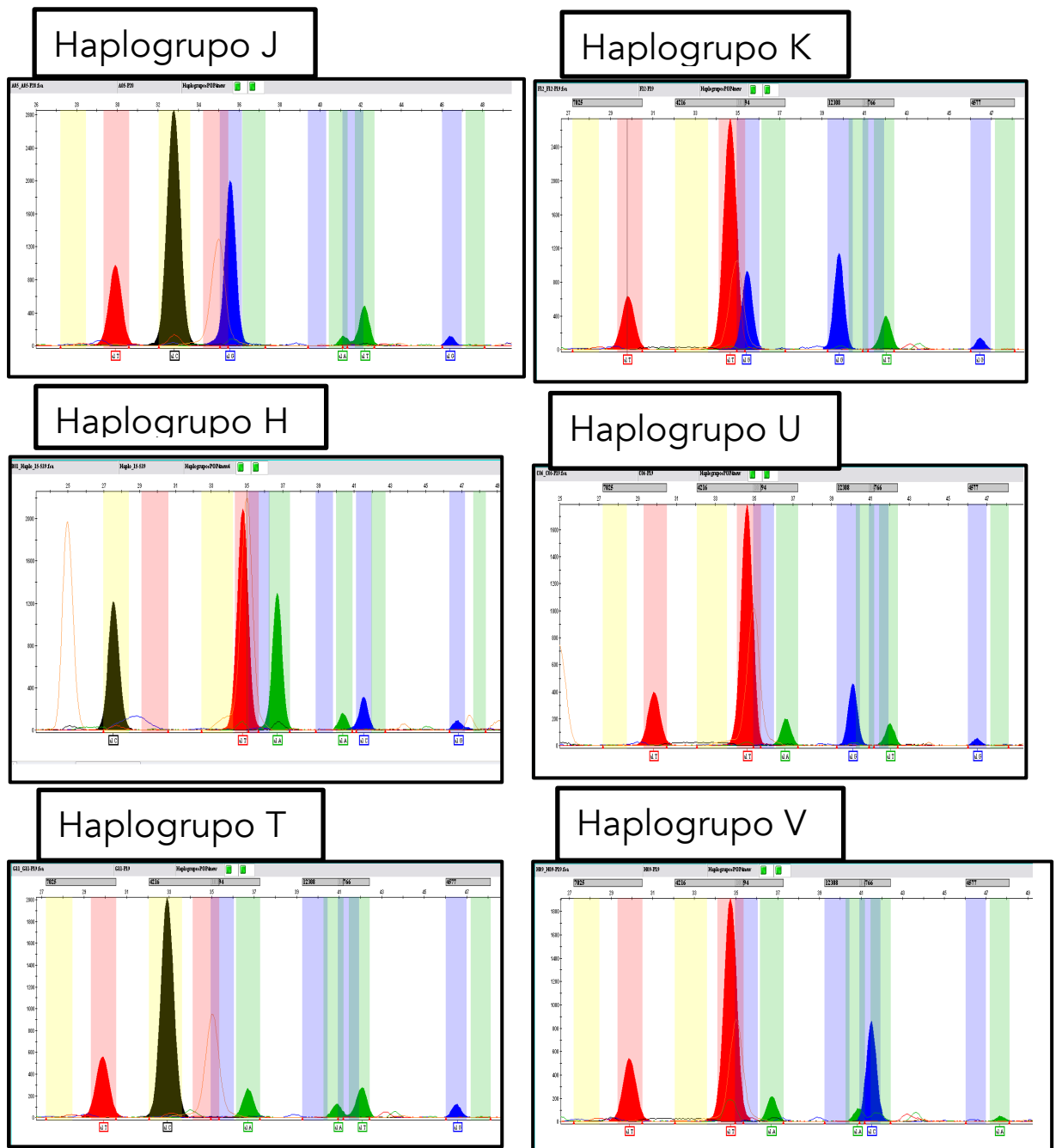
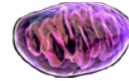


Figura 17. Electroferogramas de los haplogrupos de ADNmt Europeos más comunes.

Material y métodos

Tabla 11. Secuencias de los cebadores específicos usados en la PCR *multiplex* para determinar los haplogrupos de ADNmt.

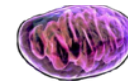
Polimorfismo	Cebador Sentido 5'→3'	Cebador Antisentido 5'→3'	Posición *
m. 7028C>T	CTGACTGGCATTGTAT TAGCA		6960F
		GTATACGGGTTCTTCGAA TG	7433R
m.14766T>C	GAGAAGGCTTAGAAG AAAACCCAC		14601F
		GTGGGCGATTGATGAAA AGGC	14950R
m.10398A>G	GGCCTATGAGTGACT ACAAAAA		10364F
		TATTCCTAGAAGTGAGAT GGT	10526R
m.4580G>A	CCTACCACTCACCTA GCATTAC		4185F
		TAGGAATGCGGTAGTAG TTAG	5120R
m.12308A>G	CAACCCCGACATCATT ACCGGGT		12106F
		GGGTTAACGAGGGTGGT AAGG	12413R
m.4216T>C	CCTACCACTCACCTA GCATTAC		4185F
		GCGAGCTTAGCGCTGTG ATGAG	4542R

* R: Orientación reversa del cebador, F: Orientación directa del cebador.

3.3.5 ESTUDIO FUNCIONAL

3.3.5.1 Justificación de las dos fuentes de carbono

La glucólisis, o ruta de *Embden-Meyerhof*, es la ruta metabólica en la que se oxida la glucosa, esencial para la obtención de energía celular en forma de



ATP. Consiste en una secuencia de nueve reacciones enzimáticas que producen dos moléculas de piruvato y dos equivalentes reducidos de NADH, los que, al introducirse en la cadena respiratoria mitocondrial, producen cuatro moléculas de ATP. En condiciones aerobias, el piruvato generado, previa transformación a Acetil Co-A, entra a formar parte del Ciclo de Krebs en la matriz mitocondrial, donde se generará el poder reductor utilizado para la obtención de ATP a través de OXPHOS, con un rendimiento total de 36-38 moléculas de ATP (Figura 18A).

La Galactosa es, al igual que la glucosa, un monosacárido formado por seis átomos de carbono o hexosa, a partir del cual la célula puede obtener ATP. Para ello es necesario un paso previo que consiste en tres reacciones enzimáticas cuyo producto final es la Glucosa-6-P (Figura 18B), que ya puede incorporarse a la ruta glucolítica anteriormente descrita. Esta transformación previa requiere por cada molécula de galactosa, el consumo de una molécula de ATP, lo que supone un esfuerzo oxidativo extra para la célula. Es por esto que el cultivo con galactosa como fuente principal de carbono, resulta útil como método para el diagnóstico de células que puedan tener comprometido su sistema OXPHOS (431).

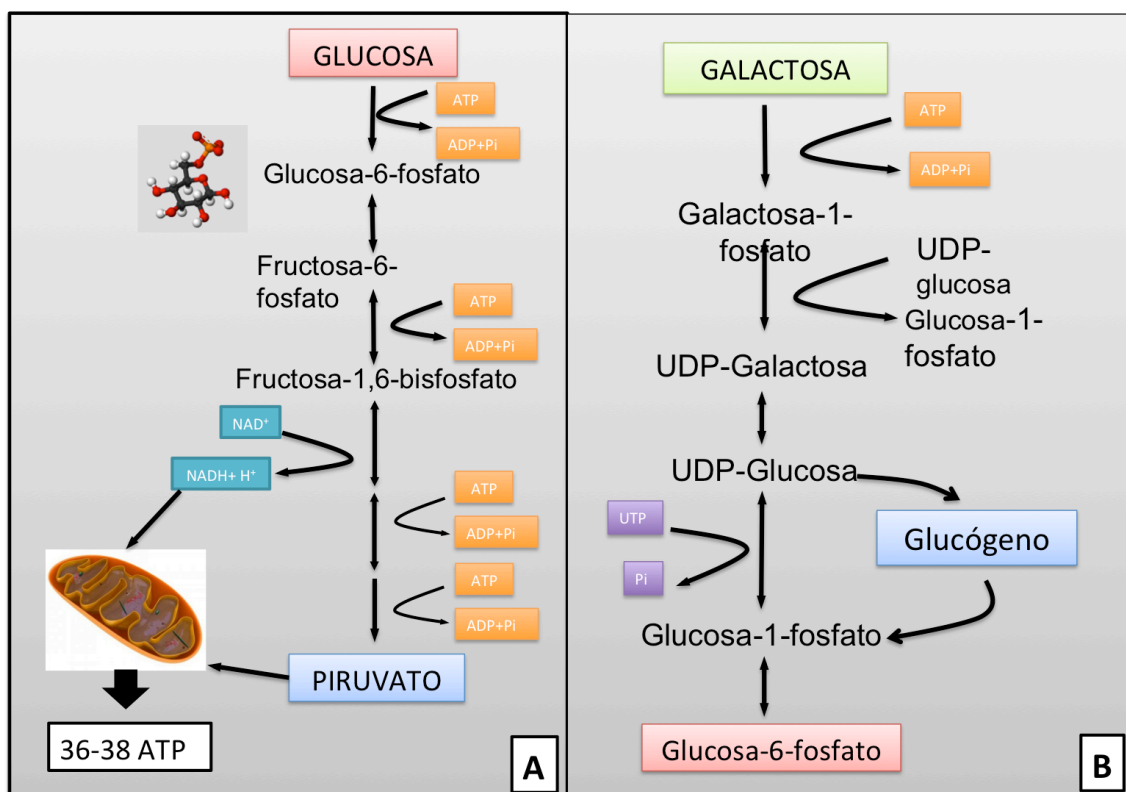


Figura 18. Diagramas representativos del metabolismo de la Glucosa (A: Aerobio y Anaerobio) y la Galactosa (B).

3.3.5.2 Producción de ROS por citometría de flujo

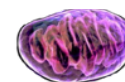
La producción de ROS en condrocitos se evaluó por medio de dos tipos de fluoróforos distintos: el diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, SIGMA®) y el MitoSOX™ (*red mitochondrial superoxide indicator*, ThermoFisher). Además el cultivo se realizó con diferentes fuentes de carbono (glucosa y galactosa) para determinar si el uso en exceso del metabolismo mitocondrial, descrito en el apartado 3.3.5.1 (Figura 18), genera de por sí una diferencia en la producción de ROS que, por otra parte, pudiera estar condicionada por alguno de los genotipos estudiados.

El DCFH-DA es utilizado para detectar estrés oxidativo (ROS y RNS). Es un compuesto con gran capacidad de difusión celular y una vez en el citosol las esterasas inespecíficas lo desacetilan a diclorodihidrofluoresceína (DCFH). En presencia de H_2O_2 , el DCFH es oxidado a diclorofluoresceína (DCF), compuesto que emite fluorescencia en el rango de 488 nm.

El *MitoSOX Red* es una sonda fluorescente desarrollada por la conjugación del ión trifenilfosfonio (TPP^+) y un catión lipofílico. Este compuesto es altamente selectivo para la detección del O_2^- en la mitocondria de células vivas, ya que es permeable y su orgánulo diana es la mitocondria. Una vez en su interior es oxidado exclusivamente por el O_2^- emitiendo fluorescencia roja a 580 nm.

Para este experimento se cultivaron 185.000 condrocitos por pocillo en medio DMEN con un 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), con glucosa (4,5 g/L), L-glutamina (584 mg/L) y piruvato sódico (110 mg/L) y en medio sin azúcar (GIBCO® ThermoFisher) con L-glutamina (584 mg/mL), 10% SBF, con galactosa (4,5 g/L) y sin piruvato sódico. Las células se sembraron en paralelo para realizar la medida de ROS celulares (DCFH-DA) y mitocondriales (MitoSOX), con un control negativo sin ninguno de los fluoróforos para cada condición y dos controles positivos con H_2O_2 para cada fluoróforo.

Los condrocitos se crecieron en una estufa a 37°C con una mezcla de aire humidificado con un 5% de CO_2 durante 48h. A continuación se depleccionaron los medios de glucosa y galactosa al 0,5% de SBF y se incubaron durante una hora en la estufa, transcurrido el tiempo de incubación se añadieron los fluoróforos, los pocillos correspondientes al MitoSOX se lavaron con una solución salina y se añadió el fluoróforo disuelto en medio HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, GIBCO® ThermoFisher), medio que no posee el colorante rojo fenol que puede interferir con el fluoróforo. Los fluoróforos se añadieron a una concentración final de 5 μM para el caso del MitoSOX y de 10 μM para el caso del DCFH-DA, dejándolos en oscuridad en



la estufa durante media hora. Por último, se añadió el H₂O₂ (Sigma®) a una concentración final de 14 mM para el control positivo y se incubó 15 min en oscuridad en la estufa.

Una vez terminado el tiempo de incubación se levantaron las células con 100 µL de tripsina (GIBCO®) diluida al 2x en una solución salina. Para ayudar a levantar las células más rápido se usó una espátula de plástico, con la que se rasparon los pocillos, se inactivó la tripsina con 500 µL de medio con glucosa al 10% de SBF, se recogieron las células y se pasaron a tubos de citómetro previamente rotulados. Los tubos se centrifugaron a 2.500 rpm durante 10 min, se volcaron los tubos para retirar el medio y se resuspendieron en 300 µL de PBS filtrado.

La suspensión de células se pasó por un citómetro *FACSCalibur™* (bdBiosciences) haciendo un recuento de 10.000 eventos. Los datos se analizaron con el programa *Cell Quest Pro™* (bdBiosciences) recogiendo la mediana para cada fluoróforo.

3.3.5.3 Determinación de NO por medio del reactivo de Griess

Para la cuantificación de NO en sobrenadantes celulares se utilizó la reacción de diazotación de *Griess*, que detecta específicamente los nitritos formados mediante una reacción colorimétrica, descrita por *Peter Griess* en 1858. Esta reacción se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de la sulfanilamida, presente en el reactivo de *Griess*, y el nitrito en un ambiente ácido.

Se realizó un cultivo celular en una placa adherente de 96 pocillos para cuantificar la producción de NO en condrocitos procedentes de controles sanos y pacientes con artrosis de cadera en diferentes fuentes de carbono, para comprobar, por una parte, si una utilización en exceso del metabolismo mitocondrial, descrita en el apartado 3.3.5.1, comprometía la producción de NO y, por otra parte, si el microsatélite de NOS2A influía significativamente en dicha producción.

Para ello se sembraron 50.000 células por pocillo en un volumen de 200 µL de medio DMEM con un 10% de SBF, con glucosa (4,5 g/L), L-glutamina (584 mg/L) y piruvato sódico (110 mg/L) y en otro pocillo con medio sin azúcar (GIBCO® ThermoFisher) con L-glutamina (584 mg/mL), 10% SBF, con galactosa (4,5 g/L) y sin piruvato sódico. Se dejaron crecer en una estufa a 37°C con una mezcla de aire humidificado con un 5% de CO₂ durante 24h. Una vez transcurrido el tiempo se depleccionaron los pocillos con los medios de

glucosa y galactosa al 0,5% de SBF y se dejaron en la estufa durante 24h. Una vez pasado el tiempo de incubación, se recogieron 100 μ L del sobrenadante y se pasaron a la placa de lectura del espectrofotómetro por duplicado, estas placas se almacenaron en un congelador a -80°C hasta que se completaron para realizar la lectura de la placa completa.

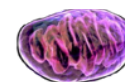
Para saber la concentración de nitritos presentes en la muestra utilizamos la técnica de *Lambert Beer* ya que el producto obtenido absorberá la luz de una determinada longitud de onda. Se realizó una curva de calibración por triplicado con Nitrito Sódico a 10 mM, los puntos de la curva se realizan con diluciones seriadas del Nitrito Sódico tomando valores entre un rango de 1 mM y 0,3125 μ M disuelto en el medio DMEM con glucosa. Se añadieron 50 μ L por pocillo del reactivo de Griess (Enzo Life Sciences), se agitó la placa durante 10 min y se procedió a su lectura a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (*Nanoquant Infinite M200, Tecan[®]*).

3.3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

3.3.6.1 *Estudio epidemiológico de asociación a nivel de clusters mitocondriales y polimorfismos relacionados con el estrés oxidativo*

El análisis estadístico de los SNPs y de la repetición corta en tándem de los genes estudiados fueron analizados con el paquete estadístico SPSS v19 (*IBM[®] Statistics*) por medio de tablas de contingencia Chi-cuadrado que se utilizan para estimar la relación entre dos variables categóricas o explorar la distribución que posee una variable categórica entre diferentes muestras. La prueba de independencia Chi-cuadrado contrasta la hipótesis de que las variables son independientes frente a que una variable se distribuye de modo diferente para diversos niveles de la otra, o lo que es lo mismo identificar si las diferencias observadas son atribuibles al azar.

Para conseguir una mayor potencia estadística con el tamaño muestral del estudio y habida cuenta de la extraordinariamente baja frecuencia de algunos de los haplogrupos en la población, los datos fueron agrupados en *clusters* mitocondriales, agrupando aquellos haplogrupos que presentan un origen filogenético común, formando así 4 *clusters* de ADNmt (HV, KU, TJ y Otros). Por otro lado, se tomó como referencia el *cluster HV*, ya que son los haplogrupos predominantes en esta cohorte, y el *cluster TJ* ya que es el que se ha descrito que está asociado con la enfermedad (84,207,282). Además de estructurar los datos por *clusters*, también se hizo en función de los genotipos así, se analizaron los genotipos según su condición de dominante, recesivo y



homocigoto para cada uno de los polimorfismos estudiados. De todos ellos se calcularon los OR y sus Intervalos de Confianza (I.C.) al 95% para asignar la probabilidad de padecer la enfermedad en función de los *cluster* de ADNmt o genotipos de los genes estudiados.

En cuanto al análisis de la repetición corta en tándem del gen NOS2A, se realizó el análisis estadístico con el programa específico de análisis de microsatélites CLUMPP (del inglés, *cluster matching and permutation*) (Universidad de Michigan). Este programa se usa en estudios de asociación y estudios de caso-control, se basa en los test Chi-cuadrado pero su principal característica es que analiza tablas de contingencia 2xn (siendo *n* cualquier valor positivo), realizando el cálculo del p-valor mediante la aproximación de Montecarlo. Realiza una simulación aleatorizada de los datos para contrastar la Chi-cuadrado inicial lo cual se puede considerar como una hipótesis *post hoc* obteniendo un valor imparcial (432).

Finalmente se diseñaron modelos de regresión logística corregidos por sexo y edad, con su respectivo coeficiente de regresión (B), OR e IC al 95% analizando la influencia de los *clusters* de ADNmt y de los distintos genotipos como variable categórica, considerando como *cluster* de referencia el *cluster* HV. El modelo de regresión logística nos permite predecir el resultado de una variable categórica en función de las variables independientes o predictoras, estos análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS® v. 20 (IBM® *Statistics*).

3.3.6.2 Estudio de las interacciones entre los clusters mitocondriales y los polimorfismos nucleares relacionados con el estrés oxidativo

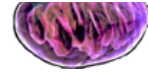
En este estudio se utilizó el modelo de regresión tal como se detalló en el apartado 3.3.6.1, pero se incorporó como covariable la interacción de los diferentes genotipos de los SNPs con los *clusters* mitocondriales TJ y HV. Para estudiar la interacción se deben jerarquizar las covariables, en nuestro caso los genotipos, lo más común es que el genotipo salvaje sea el más frecuente y el mutado el menos común, para ello se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar estas jerarquías. Estos análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS® v. 20 (IBM® *Statistics*).

3.3.6.3 Estudio funcional

El análisis de la producción de ROS, los datos obtenidos de la citometría de flujo se analizaron con el programa *Cell Quest Pro™* (bdBiosciences),

recogiendo la mediana para los dos fluoróforos. En la determinación de la producción de NO, los datos de absorbancia obtenidos se extrapolaron a la recta de calibración según la ecuación de la recta, obteniendo así la concentración a partir de la absorbancia de la muestra. Se usó un factor de corrección entre los distintos experimentos para normalizar los datos y evitar así las diferencias inter-experimento, estos cálculos se realizaron con el programa de cálculo Excel (Microsoft®).

Para llevar a cabo el análisis estadístico del estudio funcional, se aplicó la prueba *t* de *Student* para determinar diferencias entre los dos medios de cultivo. Por otra parte, para analizar la influencia de los *clusters* mitocondriales y de los diferentes polimorfismos analizados, así como las posibles interacciones significativas, en la producción de ROS y NO se utilizó la prueba no paramétrica de *Mann-Whitney*. Este test se aplica a dos muestras independientes para comparar su heterogeneidad y se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS® v. 20 (*IBM® Statistics*), los p-valores inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.



Capítulo 4
RESULTADOS



OBJETIVO 1: IDENTIFICAR REGIONES GÉNICAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO POR MEDIO DE ESTUDIOS EPIGENÉTICOS EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR.

4.1 GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

De entre todos los genes diferencialmente metilados entre el *cluster* de pacientes con alto componente inflamatorio (*cluster* 3) y el *cluster* de pacientes y controles sin esta característica (*no-cluster* 3), identificados tras el análisis del *array* de metilación, seleccionamos aquellos cuyo proceso biológico estuviera relacionado con el estrés oxidativo (Tabla 12). Así, entre los 44 genes resultantes se encontraron aquellos que participan en la vía de señalización intrínseca apoptótica (LGALS12 (galectina 12) ($p=1,2 \cdot 10^{-12}$), CASP8 (caspasa 8) ($p=5,8 \cdot 10^{-8}$), MLLT11 (linaje mixto linfoide/mieloide translocado al 11) ($p=1,5 \cdot 10^{-5}$) y VNN1 (Vanina 1) ($p=4,4 \cdot 10^{-7}$)), la respuesta al estrés oxidativo (SCARA3 (receptor *scavenger* clase A miembro 3) ($p=1,5 \cdot 10^{-11}$), PKD2 (policistina 2) ($p=6,7 \cdot 10^{-11}$), IPCEF1 (proteína de interacción con factores de intercambio con citohesinas 1) ($p=5,2 \cdot 10^{-8}$), WRN (helicasa del síndrome de Werner) ($p=1 \cdot 10^{-6}$), MPO (mieloperoxidasa) ($p=1 \cdot 10^{-6}$), CYGB (citoglobina) ($p=2,3 \cdot 10^{-6}$), PYCR1 (pirrolina-5-carboxilato reductasa) ($p=2,6 \cdot 10^{-6}$), ALDH3B1 (familia de la aldehído deshidrogenasa 3 miembro B1) ($p=1,4 \cdot 10^{-5}$)), la respuesta celular a las especies reactivas de oxígeno (PKD2 ($p=6,7 \cdot 10^{-11}$), APOE (apolipoproteína E) ($p=1,3 \cdot 10^{-7}$), GSTP1 (glutación S-transferasa Pi 1) ($p=3,3 \cdot 10^{-7}$), HYAL2 (hialuronoglucosaminidasa 2) ($p=5,3 \cdot 10^{-6}$)), la hidroxidación lipídica (GPX3 (glutación peroxidasa 3), $p=1,6 \cdot 10^{-6}$) y la inducción de senescencia prematura por estrés oxidativo (PLA2R1 (receptor 1 de fosfolipasa A2), $p=1,8 \cdot 10^{-5}$).

Estudio de regiones génicas relacionadas con el estrés oxidativo.
Papel en la artrosis



Tabla 12. Genes y procesos celulares diferencialmente metilados entre el *cluster 3* y no-*cluster 3* relacionados con el estrés oxidativo.

Sonda array	NOMBRE DEL GEN	ID	p-valor ajustado	B	Definición de GO	Dif. valor- β medio (<i>cluster 3</i> - no <i>cluster 3</i>)
cg11484576	Galectina 12	LGALS12	1,237E-12	24,709	Vía de señalización intrínseca de apoptosis	0,085
cg26847866	Receptor Scavenger clase A miembro 3	SCARA3	1,506E-11	21,560	Respuesta al estrés oxidativo	0,162
cg26215428	Pollicistina 2	PKD2	6,677E-11	19,688	Respuesta a ROS	0,208
cg25095814	Caspasa 8	CASP8	5,834E-08	12,020	Vía de señalización intrínseca de apoptosis	-0,198
cg14123992	Apolipoproteína E	APOE	1,292E-07	10,920	Respuesta a ROS	0,090
cg16855929	Familia del factor inducible de hipoxia 1	EGLN1	1,399E-07	10,755	Respuesta al NO	0,119
cg22224704	Glutation S-transferasa pi 1	GSTP1	3,281E-07	9,761	Respuesta a ROS	0,059
cg02184413	Vanina 1	VNN1	4,358E-07	9,358	Respuesta al estrés oxidativo	-0,096
cg09945801	Helicasa del síndrome de Werner	WRN	1,032E-06	8,383	Respuesta a la peroxidación lipídica	0,044
cg09421562	Mieloperoxidasa	MPO	1,044E-06	8,319	Respuesta a la peroxidación lipídica	-0,094
cg18849169	Glutation Peroxidasa 3	GPX3	1,591E-06	7,853	Respuesta a la peroxidación lipídica	0,119

Resultados

Tabla 12. (continuación) Genes y procesos celulares diferencialmente metilados entre el *cluster 3* y no-*cluster 3* relacionados con el estrés oxidativo.

Sonda array	NOMBRE DEL GEN	ID	p-valor ajustado	B	Definición de GO	Dif. valor-β medio (<i>cluster 3</i> - no <i>cluster 3</i>)
cg13993218	Insulina	INS	2,325E-06	7,359	Regulación negativa de la señalización intrínseca de apoptosis inducida por estrés oxidativo	-0,124
cg17040807	Citoglobina	CYGB	2,325E-06	7,342	Respuesta al estrés oxidativo	0,090
cg19202384	Pirrolina-5-Carboxilato Reductasa 1	PYCR1	2,581E-06	7,165	Respuesta celular al estrés oxidativo	0,113
cg27091787	Hialuronoglucosaminasa 2	HYAL2	5,294E-06	6,412	Respuesta a ROS	-0,092
cg19690214	Proteína de interacción para factores de intercambio de citosinas	IPCEF1	1,155E-05	5,608	Respuesta al estrés oxidativo	0,125
cg07730301	Aldehído deshidrogenasa 3 B1	ALDH3B1	1,350E-05	5,419	Respuesta celular al estrés oxidativo	0,033
cg18660898	Linaje de leucemia linfóide/mielóide o mixto	MLLT11	1,481E-05	5,294	Vía de señalización intrínseca de apoptosis	0,018
cg24235037	Receptor 1 de la Fosfolipasa A2	PLA2R1	1,810E-05	5,032	Senescencia prematura inducida por estrés oxidativo	0,019
cg25415932	Oxoguanina-8-glicosilasa ADN	OGG1	1,073E-04	3,120	Respuesta al estrés oxidativo	0,031

Estudio de regiones génicas relacionadas con el estrés oxidativo.
Papel en la artrosis



Tabla 12. (continuación) Genes y procesos celulares diferencialmente metilados entre el *cluster 3* y no-*cluster 3* relacionados con el estrés oxidativo.

Sonda array	NOMBRE DEL GEN	ID	p-valor ajustado	B	Definición de GO	Dif. valor-β medio (<i>cluster 3</i> - no <i>cluster 3</i>)
cg08418332	Ligando 19 del motivo C-C de la quimiocina	CCL19	1,745E-04	2,595	Respuesta al NO	0,124
cg03875678	Granzima B	GZMB	2,486E-04	2,193	Vía de señalización intrínseca de apoptosis	-0,104
cg15537850	Fosforibosiltransferasa nicotinada	NAPRT1	7,203E-04	1,081	Respuesta al estrés oxidativo	-0,081
cg15727249	Apolipoproteína A4	APOA4	9,562E-04	0,743	Respuesta a la peroxidación lipídica	0,166
cg19118077	Familia Aldo-Queto-Reductasa Miembro C3	AKR1C3	9,562E-04	0,725	Respuesta a ROS	-0,094
cg21144270	Quinasa Ser/Treo 25	STK25	1,245E-03	0,433	Respuesta al estrés oxidativo	0,018
cg16263182	Subunidad alfa 2 de la Hemoglobina	HBA2	1,392E-03	0,307	Respuesta a la peroxidación lipídica	0,026
cg14333454	Estratifina	SFN	1,765E-03	0,060	Vía de señalización intrínseca de apoptosis	0,096
cg04502814	Selenoproteína P de Plasma 1	SEPP1	1,837E-03	0,004	Respuesta al estrés oxidativo	-0,135
cg07056057	Cadena ligera Dineína LC8, tipo 2	DYNLL2	2,004E-03	-0,097	Vía de señalización intrínseca de apoptosis	0,068

Resultados

Tabla 12. (continuación) Genes y procesos celulares diferencialmente metilados entre el *cluster 3* y no-*cluster 3* relacionados con el estrés oxidativo.

Sonda array	NOMBRE DEL GEN	ID	p-valor ajustado	B	Definición de GO	Dif. valor- β medio (<i>cluster 3</i> - no <i>cluster 3</i>)
cg06233985	Subunidad beta de la hemoglobina	HBB	3,648E-03	-0,737	Respuesta a la peroxidación lipídica	0,071
cg12978308	DNA glicosilasa 1 Nei	NEIL1	6,013E-03	-1,260	Respuesta al estrés oxidativo	0,065
cg00318573	Receptor colinérgico subunidad alfa 4	CHRNA4	7,128E-03	-1,495	Respuesta al estrés oxidativo	0,029
cg26611683	Forkhead box O1	FOXO1	8,070E-03	-1,640	Respuesta celular al estrés oxidativo	0,015
cg16362133	Familia 11 miembro 2 de transportadores de solutos	SLC11A2	8,525E-03	-1,705	Respuesta celular al estrés oxidativo	0,027
cg15171237	Caspasa 3	CASP3	9,370E-03	-1,808	Vía de señalización intrínseca de apoptosis en respuesta al estrés oxidativo	0,040
cg12073779	Cristalin gamma D	CRYGD	1,749E-02	-2,481	Respuesta a ROS	-0,051
cg06971096	Receptor tipo N de la proteína fosfatasa de tirosina	PTPRN	1,779E-02	-2,521	Respuesta a ROS	0,025
cg08101172	Proteína de interacción 1 para PC4 y SFRS1	PSIP1	2,042E-02	-2,661	Respuesta al estrés oxidativo	-0,010

Estudio de regiones génicas relacionadas con el estrés oxidativo.
Papel en la artrosis



Tabla 12. (continuación) Genes y procesos celulares diferencialmente metilados entre el *cluster 3* y no-*cluster 3* relacionados con el estrés oxidativo.

Sonda array	NOMBRE DEL GEN	ID	p-valor ajustado	B	Definición de GO	Dif. valor- β medio (<i>cluster 3</i> - no <i>cluster 3</i>)
cg19549068	Clusterina	CLU	2,139E-02	-2,716	Vía de señalización intrínseca de apoptosis	0,008
cg10057295	Quinasa Ser/Teo 24	STK24	2,306E-02	-2,819	Vía de señalización intrínseca de apoptosis en respuesta al estrés oxidativo	0,009
cg21794225	Proteína quinasa D1	PRKD1	3,869E-02	-3,360	Respuesta celular al estrés oxidativo	0,049
cg22141781	Ubiquinona subunidad A12	NADH oxidoreductasa, NDUFA12	4,074E-02	-3,417	Respuesta al estrés oxidativo	-0,026
cg19836808	Proteína S100 de unión a calcio, A7	S100A7	4,396E-02	-3,507	Respuesta a ROS	0,014

p-valor ajustado calculado por el método de *Benjamini & Hochberg*; B: logaritmo de las probabilidades de que un gen estuviera diferencialmente metilado; GO: *Gene Ontology*; Dif: Valor medio del valor- β : diferencia de los promedios del valor- β (intensidad de metilación).



4.1.1 VALIDACIÓN POR EXPRESIÓN GÉNICA

De los 44 genes diferencialmente metilados relacionados con el estrés oxidativo se seleccionaron para su validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real aquellos genes cuya diferencia en valor absoluto a nivel de metilación entre el *cluster* 3 y el no-*cluster* 3 (valor- β) fuera mayor o igual a 0,1 y su valor B mayor o igual a 5. Los genes que cumplieron estos criterios se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Genes relacionados con el estrés oxidativo seleccionados para validación por expresión génica.

ID Gen	p-valor	p-valor ajustado	B	GO	Dif. valor- β medio (cluster 3- no cluster 3)
PKD2	4,19E-13	6,68E-11	19,688	Respuesta celular a ROS	0,208
CASP8	9,76E-10	5,83E-08	12,020	Señalización intrínseca de apoptosis	-0,198
SCARA3	6,30E-14	1,51E-11	21,560	Respuesta al estrés oxidativo	0,162
INS	1,35E-07	2,58E-06	7,157	Regulación negativa de la señalización intrínseca de apoptosis inducida por estrés oxidativo	-0,155
IPCEF1	6,52E-07	1,15E-05	5,608	Respuesta al estrés oxidativo	0,125
GPX3	6,66E-08	1,59E-06	7,853	Respuesta a la peroxidación lipídica	0,119
EGLN1	3,51E-09	1,40E-07	10,755	Respuesta al NO	0,119
PYCR1	1,34E-07	2,58E-06	7,165	Respuesta celular al estrés oxidativo	0,113

p-valor ajustado calculado por el método de *Benjamini & Hochberg's*; B: logaritmo de las probabilidades de que un gen estuviera diferencialmente metilado; GO: *Gene Ontology*; Dif. Valor medio del valor- β : Diferencia de los promedios del valor- β (intensidad de metilación).; NO: Óxido nítrico; ROS: Especies reactivas de Oxígeno; PKD2: policistina 2, CASP8: caspasa 8, SCARA3: receptor *scavenger* clase A miembro 3, INS: insulina, IPCEF1: proteína de interacción con factores de intercambio de citohesinas 1, GPX3: glutatión peroxidasa 3, EGLN1: familia *Egl-9* del factor inducible por hipoxia 1, PYCR1: pirrolina-5-carboxilato reductasa 1.

Se realizó la validación por expresión génica de los genes seleccionados asociados al estrés oxidativo en un grupo de 9 muestras procedentes de cartílago de rodilla, con una media de edad de $70,22 \pm 10,18$ años, con una edad máxima de 85 años y una edad mínima de 52 años, esta cohorte estaba compuesta por 3 mujeres (33,34%) y 6 hombres (66,66%). El grupo control, formado por 4 muestras, obtuvo un promedio de edad de $66,75 \pm 14,47$ años con una edad mínima de 52 años y una máxima de 85 años y el grupo de pacientes artrósicos formado por 5 muestras,

Resultados

su media de edad fue de $73 \pm 5,33$ años con un mínimo de 68 años y un máximo de 82 años.

4.1.1.1 Análisis de la expresión génica de los genes relacionados con el estrés oxidativo

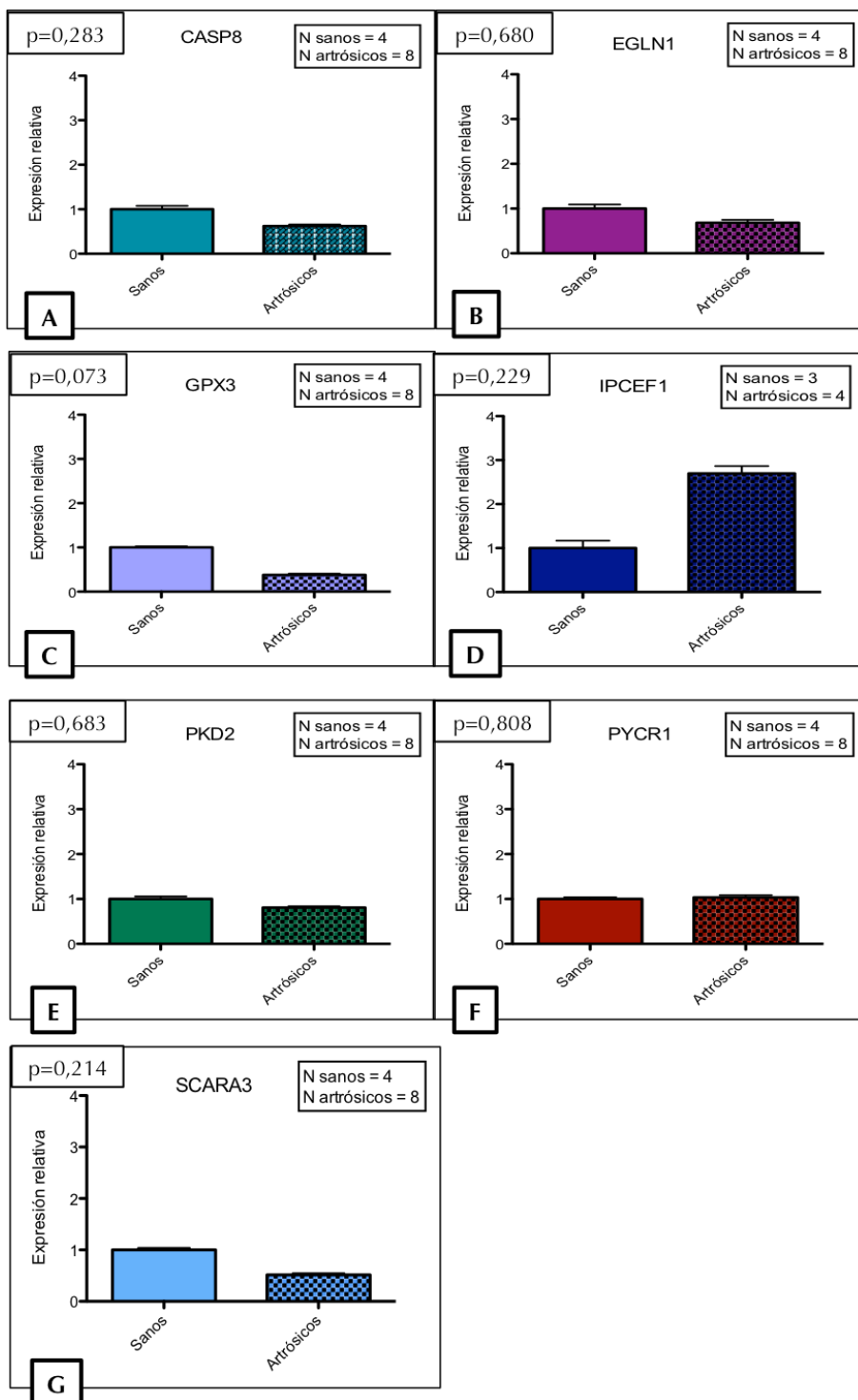


Figura 19. Expresión génica relativa de los genes seleccionados para el estudio del estrés oxidativo entre controles sanos y pacientes. Valores representados como media \pm desviación estándar, datos normalizados frente al grupo control que toma valor de 1.



Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 19 donde se puede observar que en general, los genes que estaban hipermetilados en el grupo de pacientes con un perfil inflamatorio (*cluster 3*), EGLN1 (B), GPX3 (C), PKD2 (E), SCARA3 (G), PYCR1 (F) tenían una menor expresión en las muestras artrósicas que en las muestras procedentes de los controles sanos, bordeando la significancia estadística en el caso del gen GPX3 ($p=0,073$). Por el contrario, no se observaron diferencias entre ambos grupos a nivel del gen PYCR1. En el caso del gen IPCEF1 (D) (hipermetilado en el *cluster 3*), éste mostró una mayor expresión en el grupo con artrosis que en el grupo de controles sanos, sin embargo esta diferencia tampoco llegó a ser significativa. En el caso de los genes hipometilados en el *cluster 3*, el gen CASP8 (A), mostró una menor expresión en las muestras artrósicas que en las sanas; mientras que el gen INS (no se muestra) no obtuvo ningún tipo de amplificación en ninguna de las muestras de cartílago analizadas.

4.1.2 IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS REGIONES GÉNICAS RELACIONADAS CON LA ARTROSIS MEDIANTE EL ESTUDIO DE METILACIÓN

A partir de una lista de 47 genes que mostraron, en estudios previos, una relación inversa entre metilación y expresión (381), se seleccionaron como posibles candidatos a nuevas regiones génicas asociadas con la artrosis, por un lado, aquellos para los que no hubiera descrita en la literatura ninguna asociación con la enfermedad y, por otro lado, que estuvieran involucrados en el estrés oxidativo. Además, su diferencia a nivel de valor- β debería de ser mayor o igual a $\pm 0,1$ y su diferencia en el valor de expresión (Log.Fc) mayor o igual a ± 1 (Tabla 14).

Estudios previos han señalado que la metilación en la artrosis es distinta a nivel de las articulaciones afectadas (433), por tanto es necesario identificar genes con un valor potencial como dianas terapéuticas en la patología y que además, sean independientes a la articulación. Con este objetivo, se seleccionaron aquellos genes que resultaron significativos en el estudio de metilación y definían un patrón característico de metilación en los pacientes artrósicos. Los genes seleccionados se relacionaron con el estrés oxidativo, uno de los mecanismos principales involucrados en el desarrollo de la enfermedad, y se validaron en una cohorte de cadera con el fin de identificar nuevas regiones génicas asociadas a la enfermedad, independientemente de la articulación afectada.

Resultados

Tabla 14. Genes con una relación inversa entre metilación y expresión que han sido seleccionados para su posterior validación por expresión génica.

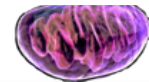
Gen	valor $-\beta$ diferencia <i>cluster 3</i> - no <i>cluster 3</i>	Log.Fc	p-valor ajustado de expresión	p-valor ajustado de metilación	Proceso Celular
LAPTM5	-0,2020	3,255	0,00017	4,99E-06	Transporte y unión de proteínas.
MARCO	-0,1419	2,430	0,00004	0,00117	Procesos del sistema inmune. Receptor de endocitosis mediada. Eliminación de células apoptóticas.
PLEK	-0,2917	2,147	0,00005	4,07E-05	Exocitosis de vesículas. Vía de señalización mediada por integrinas. Regulación negativa de la síntesis de Inositol fosfato.
CYTIP	-0,1109	1,977	0,00011	9,09E-05	Regulación de la adhesión celular.
KYNU	-0,1431	1,3398	0,00019	0,00012	Proceso catabólico del triptófano. Síntesis <i>de Novo</i> de NAD desde el triptófano.

Valor- β : niveles de metilación; Log. Fc: Log *Fold change*; p-valor ajustado calculado por el método de *Benjamini & Hochberg's*. LAPTM5: Proteína lisosomal transmembrana 5; MARCO: Receptor de macrófagos con estructura de colágeno; PLEK: Plekstrina; CYTIP: Proteína 1 de interacción con citohesinas; KYNU: Kinurenina.

4.1.2.1 Validación por expresión génica en una cohorte de pacientes de artrosis

En este estudio de validación se llevaron a cabo dos tipos de aproximaciones, por un lado se analizó la expresión génica en ARN aislado a partir de cartílago articular de cadera en una cohorte de 62 individuos y, por otro lado, se evaluó el efecto de la IL1- β en la modulación de la expresión génica de estos genes. La IL1- β es la principal citoquina pro-inflamatoria involucrada en el proceso artrósico, por lo que para determinar su efecto en los condrocitos articulares, se realizó un cultivo de 50.000 condrocitos estimulados con IL1- β a una concentración final de 1ng/mL durante 48h.

Las muestras de ARN procedían de una cohorte de 62 individuos con un promedio de edad de $77,52 \pm 9,95$ años, y con una edad máxima de 96 años y una mínima de 48 años, compuesta por 42 (67,75%) mujeres y 20 (32,25%) varones. El grupo control estaba formado por 23 muestras con una media de edad de $77,43 \pm 10,68$ años, con una edad máxima de 96 años y una edad mínima de 48 años. Para el



grupo de donantes con artrosis de cadera se analizaron 39 muestras, pertenecientes a pacientes artrósicos con una edad promedio de $77,57 \pm 9,63$ años, un máximo de 95 años y un mínimo de 57 años.

4.1.2.2 Expresión en tejido

Los valores de expresión de los genes seleccionados (Tabla 14) sólo mostró diferencias estadísticamente significativas entre controles sanos y pacientes a nivel del gen KYNU (ratio de expresión promedio=3,01; IC 95% 1,30-7,01; $p=0,01$). A pesar de la tendencia clara en el resto de los genes hacia una mayor expresión en el grupo de artrósicos, probablemente la elevada variabilidad inter-individual no permitió obtener un resultado significativo para el resto de genes (Figura 20).

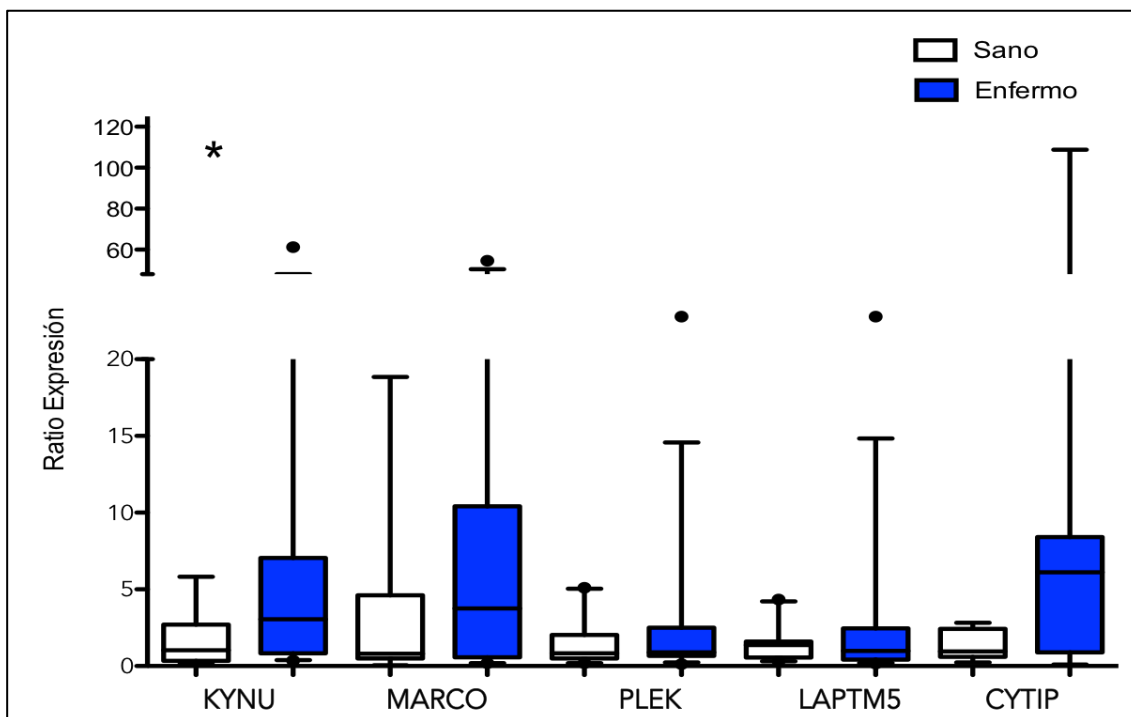


Figura 20. Expresión génica relativa de los genes seleccionados entre controles sanos y pacientes. Valores representados como media \pm desviación estándar, datos normalizados frente al grupo control que toma valor de 1. (*) Test *Mann-Whitney*, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$.

4.1.2.3 Expresión en cultivo celular primario de condrocitos estimulados con $IL1-\beta$

El estudio en cultivo celular primario de condrocitos se realizó en una subcohorta de muestras pertenecientes a la cohorte descrita en el apartado 4.1.2.2. Esta subcohorta estaba compuesta por 13 individuos, y la media de edad de este grupo fue de $73 \pm 10,85$ años con una edad mínima de 57 años y una máxima de 90 años, formado por 10 mujeres (76,92%) y 3 hombres (23,07%). El grupo control estaba constituido por 6 muestras con una media de edad de $72,83 \pm 10,10$ años, una edad máxima de 85 años y una edad mínima de 57 años. Por su parte, el grupo con artrosis estaba

formado por 7 muestras y la edad promedio era de $73,14 \pm 12,26$ años con un máximo de edad de 90 años y un mínimo de 57 años.

La estimulación con la citoquina proinflamatoria IL1- β indujo una sobre-expresión significativa en todos los genes seleccionados, de forma estadísticamente significativa (KYNU: $6,820 \pm 1,351$, $p < 0,001$; MARCO: $1,147 \pm 0,6787$, $p = 0,005$; PLEK: $2,104 \pm 0,7058$, $p = 0,04$; LAPTM5: $5,433 \pm 1,014$, $p = 0,001$; CYTIP: $2,043 \pm 0,7260$, $p < 0,001$) frente a las células en condiciones basales que no recibieron el estímulo (Figura 21).

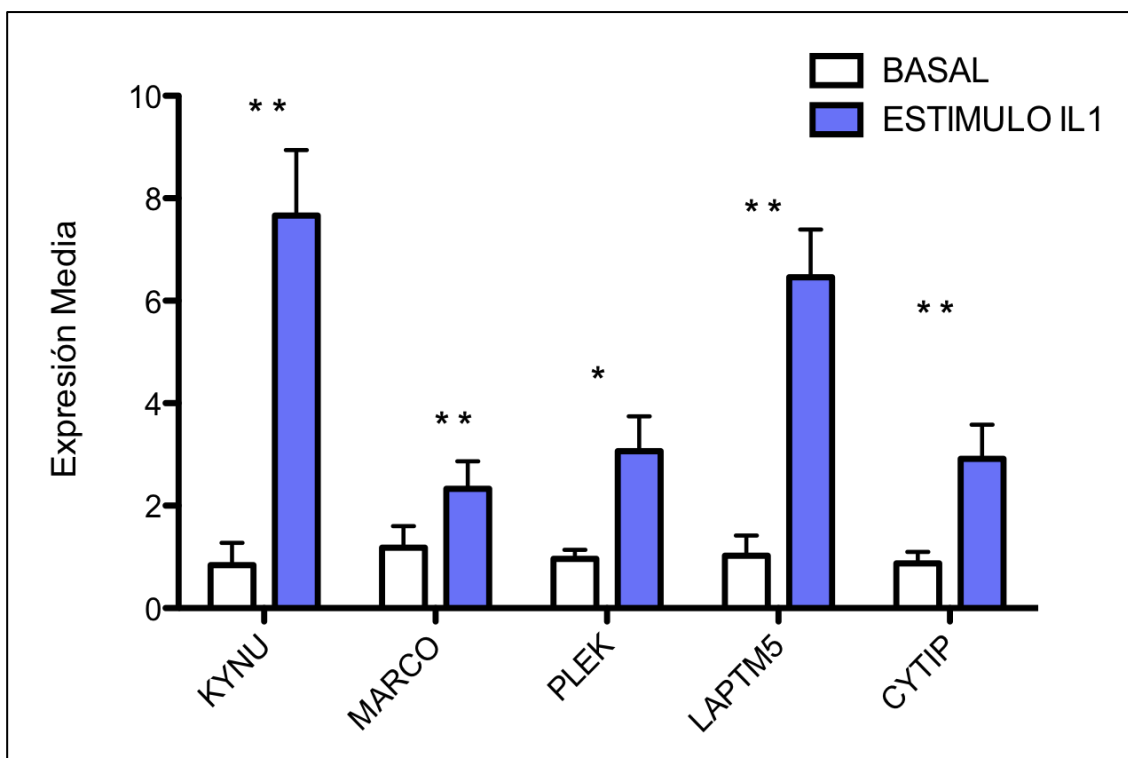
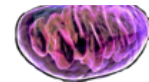


Figura 21. Expresión génica promedio de los genes seleccionados en condrocitos de cultivo primario estimulados con IL1- β . Valores representados: expresión promedio \pm desviación estándar. Test *Mann-Whitney*, significancia estadística declarada a (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,01$.

4.1.3 RESUMEN DE RESULTADOS

Tras el análisis de metilación entre todos los genes diferencialmente metilados entre el *cluster* de pacientes con alto componente inflamatorio (*cluster 3*) y el *cluster* de pacientes y controles sin esta característica (*no-cluster 3*) se seleccionaron un total de 44 genes cuyo proceso biológico estaba asociado al estrés oxidativo. Tras la selección, los genes EGLN1, GPX3, PKD2, SCARA3, PYCR1, IPCEF1, INS y CASP8 mostraron diferencia en valor absoluto del valor- β mayor o igual que 0,1 y un valor B mayor o igual que 5, siendo posteriormente validados por PCR cuantitativa en una cohorte independiente de pacientes con artrosis de rodilla y controles sanos.



En cuanto a la expresión génica no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los genes seleccionados y la enfermedad, aunque el gen GPX3 bordeó la significancia estadística. Aún así, se muestra una clara tendencia en la expresión de la mayoría de los genes que se correlaciona con su estatus de metilación.

El análisis de los *arrays* de metilación y expresión reveló un subgrupo de 47 genes que presentaban una relación inversa entre metilación y expresión. De entre todos estos genes, se seleccionaron aquellos que, no habiendo sido descritos previamente en la literatura como asociados con la enfermedad y, teniendo relación con el estrés oxidativo, mostraron una diferencia en el valor- β mayor o igual que 0,1 y una diferencia en su Log. Fc mayor o igual a ± 1 . Los genes que cumplieron estos requisitos, KYNU, LAPTM5, MARCO, PLEK y CYTIP se validaron por PCR cuantitativa en una cohorte independiente de cadera. Los resultados mostraron una mayor expresión de todos los genes en el grupo de pacientes, alcanzando la significancia estadística el gen KYNU (ratio=3,01 IC 95% 1,30-7,01, $p=0,01$).

El efecto de la citoquina proinflamatoria IL1- β en cultivo celular primario de condrocitos indujo un aumento significativo de los niveles de expresión en todos los genes estudiados en la cohorte de cadera (KYNU: $6,820 \pm 1,351$, $p<0,001$; MARCO: $1,147 \pm 0,6787$, $p=0,005$; PLEK: $2,104 \pm 0,7058$, $p=0,04$; LAPTM5: $5,433 \pm 1,014$, $p=0,001$; CYTIP: $2,043 \pm 0,7260$, $p<0,001$).

Resultados

OBJETIVO 2: DETERMINAR LA INFLUENCIA DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES, COMO AGENTES REGULADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO, EN EL METILOMA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.

4.2 ANÁLISIS JERÁRQUICO POR HAPLOGRUPOS

Los datos del *array* de metilación fueron analizados en función de los haplogrupos de ADNmt (H, U y J) de las muestras. Tras el análisis de la varianza (ANOVA) se identificaron un total de 1.926 *loci* DMs, lo cual mostró un perfil de metilación característico para cada uno de los tres haplogrupos (Figura 22). El posterior análisis *post hoc* se centró en las genes diferencialmente metilados entre los haplogrupos H y J, ya que se ha descrito que el haplogrupo J se asocia con una menor tasa de prevalencia e incidencia de artrosis (208,250), así como con unos niveles séricos más bajos de biomarcadores catabólicos de destrucción del cartílago articular, a diferencia del haplogrupo H (285).

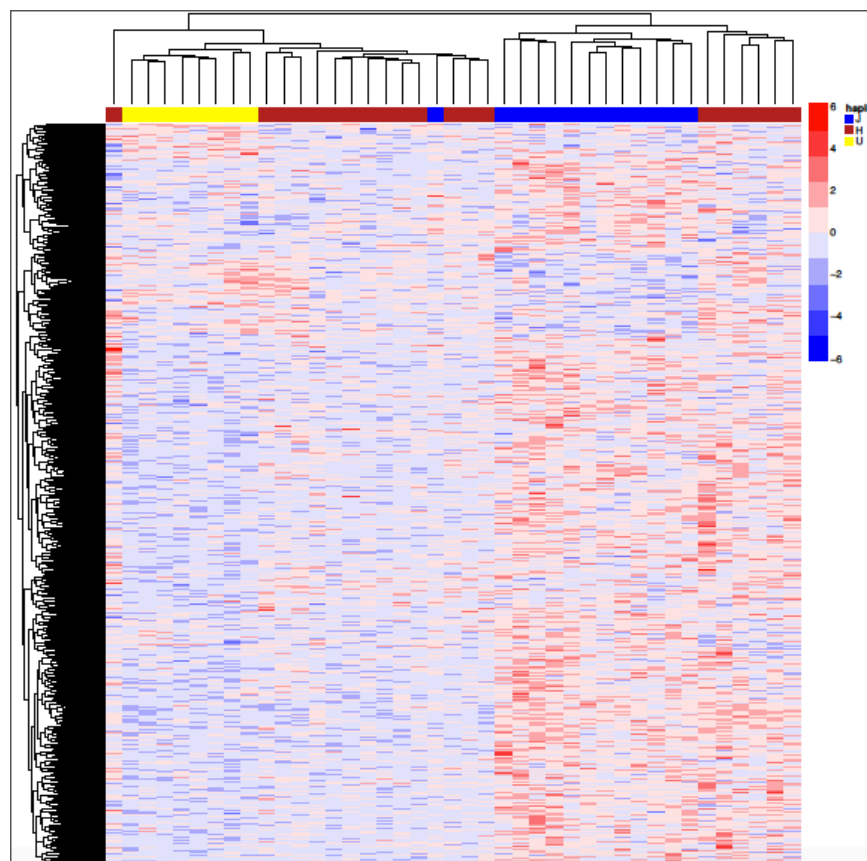


Figura 22. Análisis jerárquico de las 1.926 sondas diferencialmente metiladas entre los 3 haplogrupos mitocondriales (H, J y U) con el programa R (Bioconductor).



4.2.1 LISTADO DE GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS ENTRE EL HAPLOGRUPO H Y EL HAPLOGRUPO J

El resultado de los análisis *post hoc* de Bonferroni reveló un total de 538 regiones DMs entre el haplogrupo H y el haplogrupo J, de las cuales 451 resultaron hipermetiladas (Anexo II) y 87 hipometiladas (Anexo III) en el haplogrupo J en relación al haplogrupo H, en la Tabla 15 se muestran las 10 regiones más diferencialmente hipermetiladas y en la Tabla 16 las 10 regiones más hipometiladas en el haplogrupo J frente al H. La región CpG más diferencialmente hipermetilada entre el haplogrupo J y H fue la fucosidasa α -L1 (FUCA1), mientras que la región CpG más diferencialmente hipometilada fue la que se correspondía con el gen *homeobox D3* (HOXD3).

Además se estudió la localización genómica de las regiones DMs debido a su implicación en la expresión génica, según los estados de cromatina descritos en *Roadmap Epigenomics Consortium* (434). De las regiones DMs analizadas, se encontró que un 58,4% pertenecían a regiones de iniciación de la transcripción (TSS), un 21,6% a regiones flanqueantes a las TSS activas y un 1,12% a regiones CpG con *enhancer*. En este último grupo, la región CpG flanqueante a las TSS activas más diferencialmente hipermetilada se correspondió con FUCA1 en los portadores del haplogrupo J frente al H (Tabla 15). Por otro lado se identificó el gen RNase8 (RNasa 8) como la región CpG con la región *enhancer* más diferencialmente hipometilada en los portadores del haplogrupo J en relación con el H (Tabla 16).

Resultados

Tabla 15. Listado de las 10 regiones más hipermetiladas en el haplogrupo J en relación al H, ordenadas de forma decreciente por sus diferencias en el valor- β .

ID Gen	Nombre del gen	Media del valor- β en haplogrupo J	Media del valor- β en haplogrupo H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
FUCA1	Alfa 1 fucosidasa	0,3993	0,2808	-0,1185	2_TssAFlnk	0,0278
SCGB3A2	Familia secretoglobina 3A miembro 2	0,4639	0,3764	-0,0875	14_ReprPCWk	0,0390
BATF	Factor de transcripción ATF basic leucine zipper	0,4005	0,3135	-0,0870	1_TssA	0,0193
SMAD9	Familia SMAD miembro 9	0,6520	0,5694	-0,0826	5_TxWk	0,0201
PARG	Poli glicohidrolasa (ADP-ribosa)	0,5195	0,4409	-0,0786	5_TxWk	0,0368
RP11-631M21.2	Tubulina beta 8 clase VIII	0,6617	0,5863	-0,0754	13_ReprPC	0,0459
MAP3K7IP1	Proteína quinasa de quinasa activadora de mitógeno 7	0,6907	0,6155	-0,0753	15_Quies	0,0022
CHRN3	Receptor colinérgico nicotínico subunidad Beta 3	0,5328	0,4588	-0,0740	14_ReprPCWk	0,0462
C4orf50	Marco de lectura abierta 50 del cromosoma 4	0,2582	0,1859	-0,0722	15_Quies	0,0466
MT2A	Metalotienina 2A	0,2529	0,1822	-0,0707	2_TssAFlnk	0,0468

p-valor ajustado calculado por el método de *Benjamini & Hochberg's*; Media del valor- β (intensidad de metilación); ID Gen: véase listado de abreviaturas; Región genómica: TssA: sitio activo de inicio de la transcripción; TssAFlnk: regiones flanqueantes a la Tss activas; TxFlnk: indica el estado del gen transcrito en el extremo 5' y 3'; Tx: Transcripción robusta; TxWk: Transcripción débil; EnhG: *enhancer* génico; Enh: *enhancer*; ZNF/Rpts: genes ZNF (codifica para las proteínas con dedos de zinc) y repeticiones; Het: heterocromatina; TssBiv: región TSS bivalente/equilibrado; BivFlnk: indica las regiones flanqueantes a TSS/Enh; EnhBiv: *enhancer* bivalente; ReprPC: referido a la represión del grupo de proteínas *polycomb*; ReprPCWk: represión débil de *polycomb*, Quies: región quiescente.



Tabla 16. Listado de las 10 regiones más hipometiladas en el haplogrupo J en relación al H, ordenadas de forma decreciente por sus diferencias en el valor- β .

ID Gen	Nombre del gen	Media del valor- β en haplogrupo J	Media del valor- β en haplogrupo H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
HOXD3	Homeobox C5	0,5985	0,7021	0,1036	13_ReprPC	0,0097
C18orf22	orf 22 del cromosoma 18	0,4475	0,5400	0,0925	2_TssAFlnk	0,0122
RNASE8	Familia ribonucleasa A miembro 8	0,4711	0,5636	0,0925	7_Enh	0,0171
PXT1	Peroxisomas específico de testículo 1	0,4805	0,5605	0,0800	15_Quies	0,0198
TMEM85	Subunidad 4 del complejo proteico de membrana del retículo endoplásmico	0,2631	0,3416	0,0785	2_TssAFlnk	0,0217
CUEDC1	Dominio 1 CUE	0,7561	0,8278	0,0717	5_TxWk	0,0060
INSL6	Símil 6 de Insulina	0,6709	0,7424	0,0715	14_ReprPCWk	0,0369
PARK2	Proteína ligasa de la Ubiquitina E3 RBR <i>parkin</i>	0,5629	0,6264	0,0634	14_ReprPCWk	0,0228
TCP11	Complejo-T 11	0,7304	0,7868	0,0564	5_TxWk	0,0003
KCNN4	Subfamilia N del canal activado por potasio y calcio miembro 4	0,6269	0,6820	0,0551	5_TxWk	0,0387

p-valor ajustado calculado por el método de *Benjamini & Hochberg's*. Media del valor- β (intensidad de metilación). ID Gen: véase listado de abreviaturas. Región genómica: TssA: sitio activo de inicio de la transcripción; TssAFlnk: regiones flanqueantes a la Tss activas; TxFlnk: indica el estado del gen transcrito en el extremo 5' y 3' ; Tx: Transcripción robusta; TxWk: Transcripción débil; EnhG: *enhancer* génico; Enh: *enhancer*; ZNF/Rpts: genes ZNF (codifica para las proteínas con dedos de zinc) y repeticiones; Het: heterocromatina; TssBiv: región TSS bivalente/equilibrado; BivFlnk: indica las regiones flanqueantes a TSS/Enh; EnhBiv: *enhancer* bivalente; ReprPC: referido a la represión del grupo de proteínas *polycomb*; ReprPCWk: represión débil de *polycomb*, Quies: región quiescente.

4.2.2 ANÁLISIS DE LOS PROCESOS ALTERADOS EN FUNCIÓN DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS ENTRE LOS HAPLOGRUPOS H Y J

Los procesos biológicos significativamente alterados e hipometilados tras el análisis con el programa DAVID v6.7 (<https://david.ncifcrf.gov>) se muestran en la Figura 23 para el haplogrupo J y en la Figura 24 para el haplogrupo H. Para el haplogrupo J se encontraron 2 procesos biológicos significativos, la regulación negativa de la apoptosis ($p=0,021$) y la regulación negativa de la actividad catalítica ($p=0,036$). La función molecular más involucrada y significativa resultó ser la actividad de los factores de transcripción ($p=0,037$) (Figura 23).

En el caso del haplogrupo H los procesos biológicos más alterados y significativos fueron 12, entre ellos aquellos relacionados con la regulación positiva de la apoptosis ($p=0,008$) y la muerte celular ($p=0,012$). En cuanto al componente celular resultaron involucrados en el lumen del orgánulo ($p=0,00005$) y las vesículas citoplasmáticas ($p=0,017$). La función molecular estaba involucrada en la unión de nucleótidos ($p=0,0093$), guanilribonucleótidos ($p=0,046$), e iones ($p=0,023$) y la actividad transmembrana de transportadores de Ca^{+2} ($p=0,033$) (Figura 24).

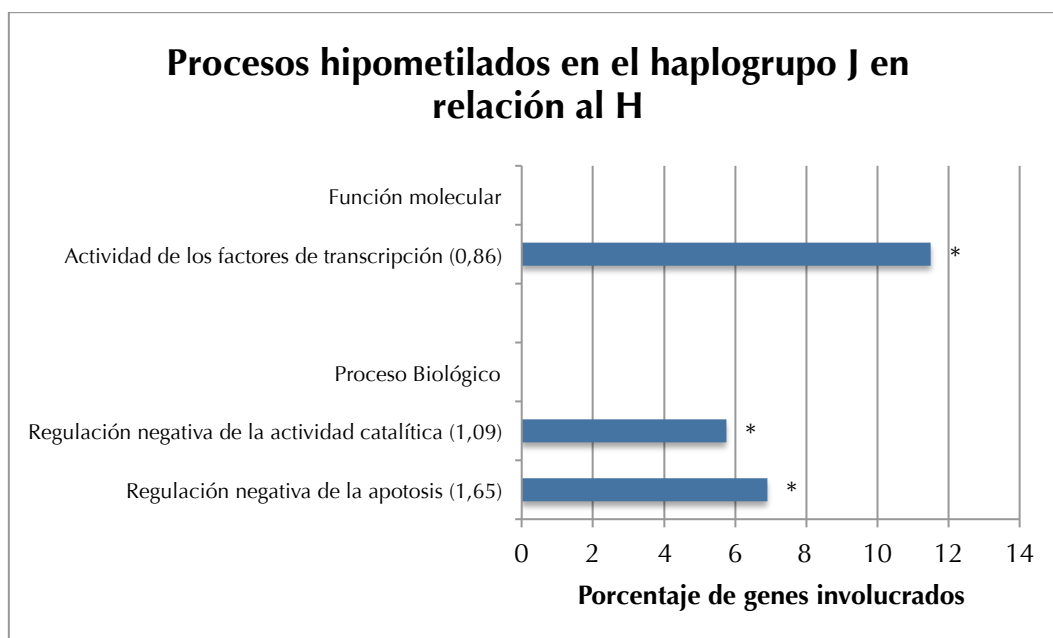


Figura 23. Procesos biológicos significativamente alterados e hipometilados para el haplogrupo J, obtenidos tras la comparación de los patrones de metilación diferencial entre el haplogrupo H y J, junto con su *enrichment score* entre paréntesis. (*) $p<0,05$.



Procesos hipometilados en el haplogrupo H en relación al J

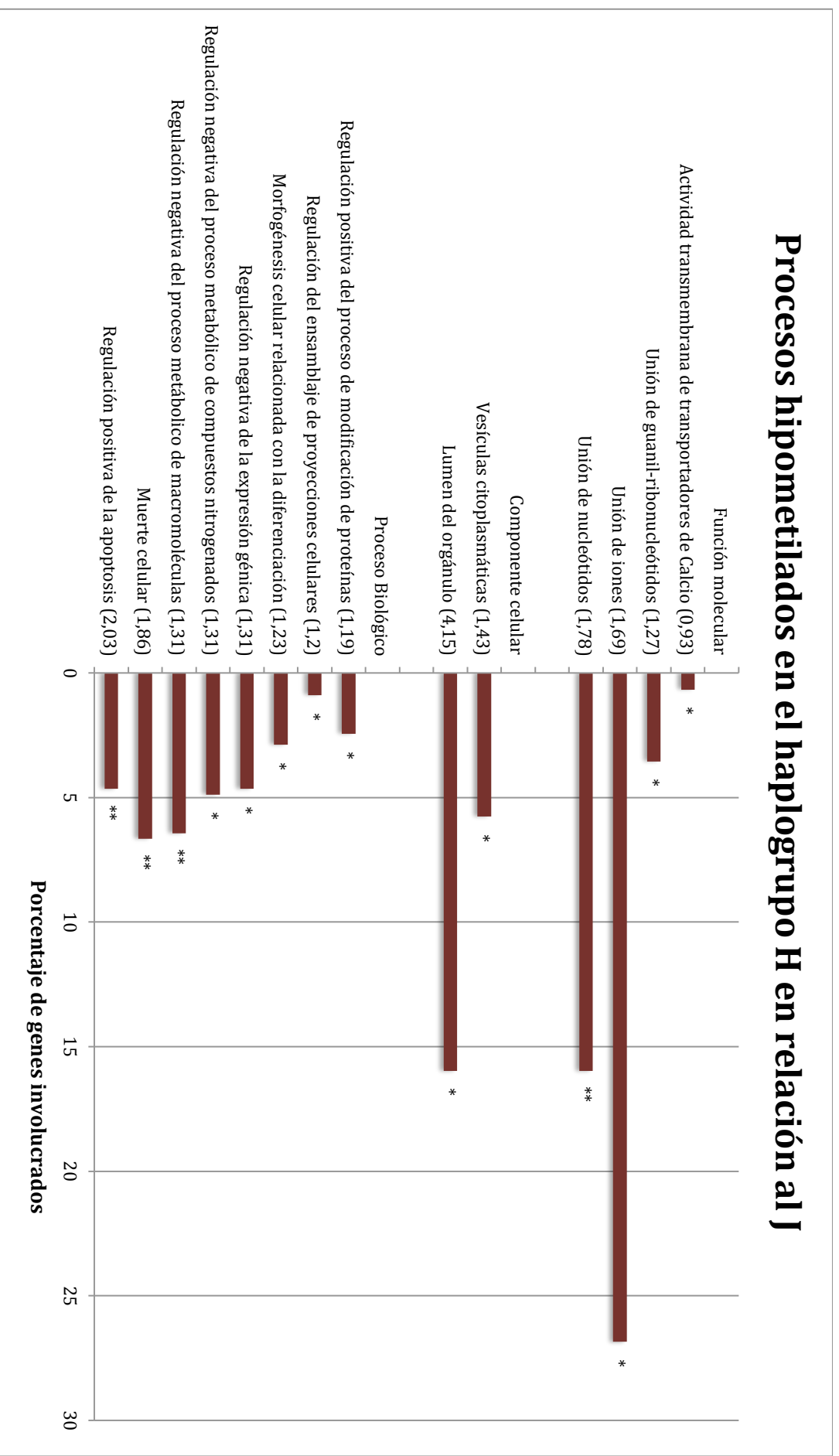


Figura 24. Procesos biológicos significativamente alterados e hipometilados para el haplogrupo H, obtenidos tras la comparación de los patrones de metilación diferencial entre el haplogrupo H y J, junto con su *enrichment score* entre parentesis. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

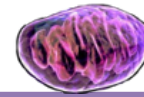
4.2.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL POR *RNA-SEQ*

Un total de 16 muestras de cartílago de rodilla fueron sometidas a secuenciación masiva usando la tecnología *Illumina (HiSeq 2000, Illumina®)*. Las características de las muestras se resumen en la Tabla 17, 7 muestras pertenecientes al haplogrupo J donde 5 eran procedentes de pacientes con artrosis y 2 de controles sanos, en el caso del haplogrupo H fueron 9 muestras, donde 5 procedían de pacientes con artrosis y 4 de controles sanos.

Tabla 17. Características de las muestras analizadas mediante *RNA-Seq*.

Código muestra	Haplogrupo	Sexo	Edad
16SE0418	J	Hombre	52
16SE0002	J	Hombre	73
16SE0003	J	Hombre	62
16SE0004	J	Hombre	71
16SE0005	J	Mujer	81
16SE0407	J	Mujer	82
16SE0007	J	Mujer	81
16SE0409	H	Hombre	25
16SE0422	H	Mujer	65
16SE010	H	Mujer	54
16SE0411	H	Hombre	74
16SE0413	H	Hombre	70
16SE0403	H	Hombre	74
16SE015	H	Mujer	87
16SE016	H	Mujer	73
16SE0423	H	Hombre	69

Para llevar a cabo la cuantificación del número de lecturas por transcrito se empleó el algoritmo disponible en el programa *kallisto* (435). Este algoritmo



realiza un pseudoalineamiento de las distintas lecturas, con una ejecución muy rápida y la posibilidad de ejecutarlo en un portátil. Asimismo, la cuantificación obtenida se puede equiparar a métodos más típicamente usados en este tipo de análisis como *STAR* o *TopHat*, métodos más convencionales que no se basan en el pseudoalineamiento.

Tal como se describe en el apartado 3.2.4.1, se llevó a cabo un paso previo al alineamiento con el fin de realizar una serie de controles de calidad para determinar la validez de las lecturas, este proceso se realizó con el programa *FastQC* (R, Bioconductor, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). La calidad de las bases secuenciadas fue óptima en todas las muestras con valores de calidad (*phred scores*) superiores a 20, considerado este valor como el umbral adecuado de calidad. Un ejemplo de estos resultados se muestra en la Figura 25.

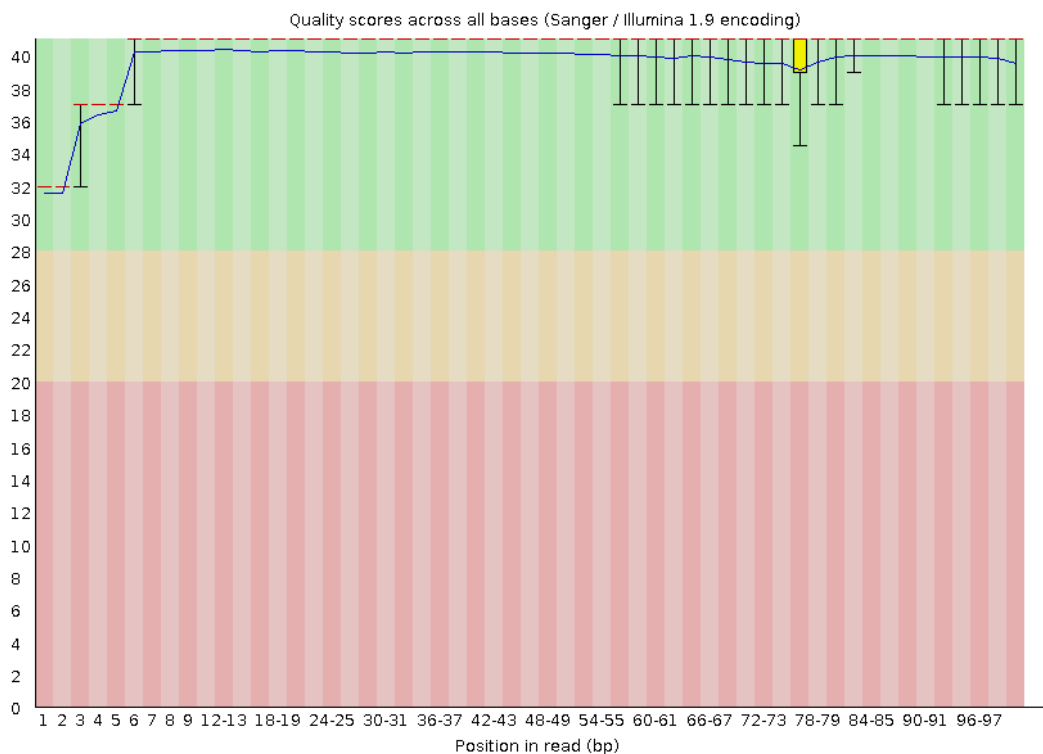


Figura 25. Niveles de calidad por base para la muestra 16SE0418.

Los parámetros obtenidos por el programa *FastQC* se encuentran todos en niveles aceptables para un experimento de *RNA-Seq*. Una vez realizado el control de calidad, llevamos a cabo la cuantificación de las lecturas por medio del programa *kallisto*, tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.4.1. Una vez finalizado el alineamiento de todas las muestras y la generación de los 50 *bootstraps* generamos un PCA con la finalidad de

observar las fuentes de variación entre las distintas muestras (Figura 26). Tal y como se aprecia en la Figura 26, la muestra 16SE002 se diferencia claramente del resto de muestras que, aunque no se agrupan de forma estrictamente homogénea, no se separan claramente en ninguno de los dos primeros componentes principales. Basándonos en esto, y en el tamaño de la librería (un valor inferior al millón de lecturas) decidimos eliminar la muestra 16SE002 del resto de análisis.

La cuantificación a nivel génico mostró un total de 20.863 genes con al menos 1 TPM en el 40% de las muestras, estos fueron los genes sobre los que se evaluó la expresión diferencial. Para este estudio, se realizaron dos análisis, uno considerando el haplogrupo mitocondrial como la variable independiente y otro considerando el diagnóstico.

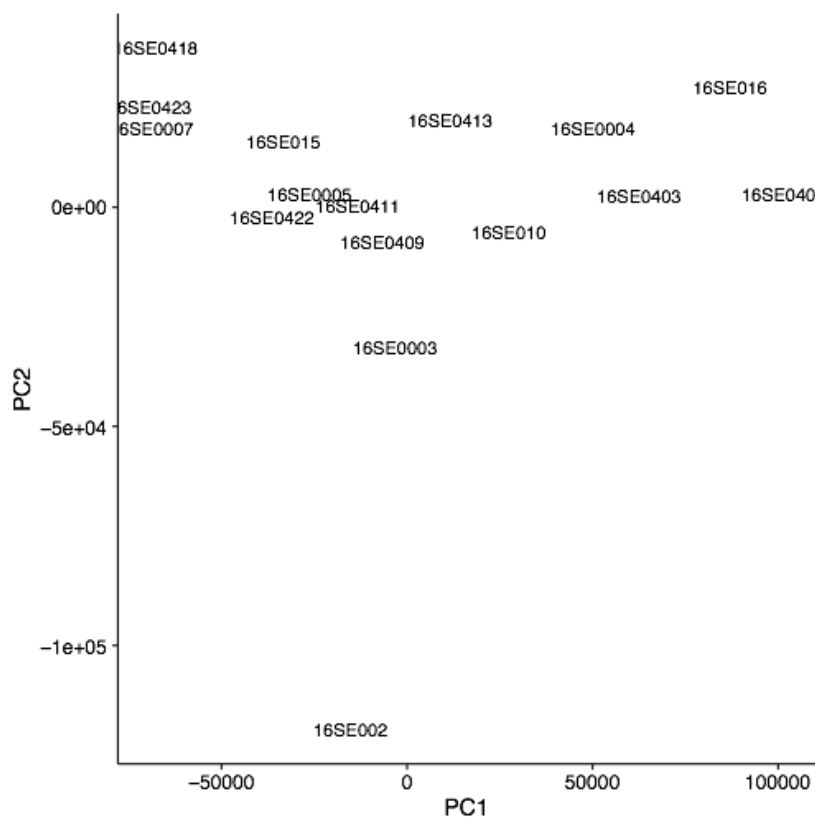
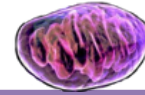


Figura 26. Gráfico de PCA de las diferentes muestras una vez realizada la cuantificación con *kallisto*.

4.2.3.1 Expresión diferencial basada en haplogrupos

Tras el análisis realizado tomando como variable independiente el haplogrupo mitocondrial, los resultados mostraron un total de 416 genes que fueron considerados diferencialmente expresados de manera significativa con un p-valor menor de 0,005 y un logFC mayor que 4. De los genes diferencialmente expresados, 362 resultaron sobre-expresados en el



haplogrupo J con respecto al H y 54 en el haplogrupo H respecto a J. En la Figura 27 se representa la distribución de los p-valores junto a los cambios en *fold change* para los genes analizados.

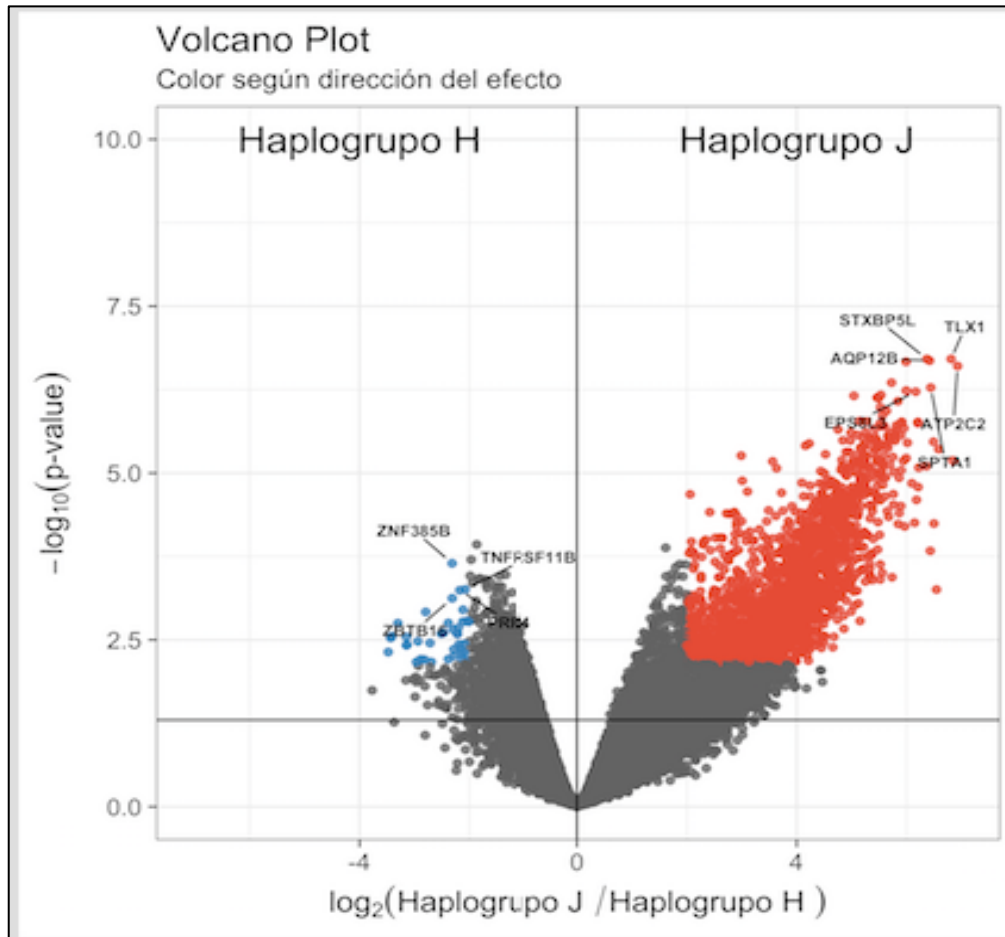


Figura 27. *Volcano plot* mostrando los genes diferencialmente expresados entre haplogrupos. Los puntos en color (azul, sobre-expresado en H; rojo, sobre-expresado en J) denotan genes con un p-valor ajustado < 0.005 y un *log Fold Change* en valor absoluto mayor que 4.

En la Tabla 18 se muestran los primeros 20 genes más diferencialmente expresados de forma significativa y con un *log Fold Change* mayor que 4 y que codifican para proteínas para el análisis realizado entre los haplogrupos mitocondriales H y J. Estos mismos genes se han usado para hacer una representación mediante un *heatmap* de como se agrupan las distintas muestras en base a los niveles de expresión. Tal y como se puede apreciar en la Figura 28, existen dos *clusters* de muestras que definen un cierto agrupamiento acorde al haplogrupo al que pertenecen.

Tabla 18. Resumen de los 20 genes más diferencialmente expresados entre el haplogrupo H y J.

Resultados

Ensembl ID gen	Log.Fc	p-valor	B	Expresión	ID gen
ENSG00000107807	6,808	1,95E-07	6,917	↑ J	TLX1
ENSG00000145087	6,366	1,95E-07	6,924	↑ J	STXBP5L
ENSG00000185176	6,416	2,07E-07	6,854	↑ J	AQP12B
ENSG00000053918	5,988	2,15E-07	6,786	↑ J	KCNQ1
ENSG00000064270	6,925	2,49E-07	6,850	↑ J	ATP2C2
ENSG00000183873	7,013	3,37E-07	6,590	↑ H	SCN5A
ENSG00000167612	5,724	4,42E-07	6,126	↑ J	ANKRD33
ENSG00000163554	6,436	5,23E-07	6,317	↑ H	SPTA1
ENSG00000151025	5,990	5,81E-07	6,019	↑ J	GPR158
ENSG00000198758	6,163	6,03E-07	5,968	↑ J	EPS8L3
ENSG00000112238	5,530	6,76E-07	5,811	↑ J	PRDM13
ENSG00000186487	5,039	6,96E-07	6,165	↑ H	MYT1L
ENSG00000043355	5,462	7,39E-07	5,664	↑ J	ZIC2
ENSG00000007908	5,484	7,55E-07	5,655	↑ J	SELE
ENSG00000162571	5,839	8,41E-07	5,704	↑ J	TLL10
ENSG00000110448	5,521	1,03E-06	5,453	↑ J	CD5
ENSG00000179023	5,632	1,17E-06	5,410	↑ J	KLHDC7A
ENSG00000259803	5,557	1,36E-06	5,233	↑ J	SLC22A31
ENSG00000149452	6,203	1,72E-06	5,124	↑ J	SLC22A8
ENSG00000154764	5,519	1,79E-06	5,174	↑ J	WNT7A

ID: identificador del gen; Log. Fc: Log *Fold Change*; B: logaritmo de las probabilidades de que un gen estuviera diferencialmente expresado. TLX1: *Homeobox 1* leucemia de células T, STXBP5L: símil 5 de proteína de unión a sintaxina, AQP12B: aquaporina 12B, KCNQ1: Subfamilia Q miembro 1 del canal dependiente de voltaje de potasio, ATP2C2: Transportador 2 ATPasa de la ruta secretora de Ca²⁺, SCN5A: subunidad alfa 5 del canal dependiente de voltaje de sodio, ANKRD33: Repetición ankirina dominio 33, SPTA1: Espectrina alfa 1 eritrocítica, GPR158: receptor 158 de la proteína G acoplada, EPS8L3: símil 3 del sustrato 8 de la vía del factor de crecimiento epidérmico, PRDM13: dominio 13 PR/SET, MYT1L: símil 1 del factor de transcripción de mielina, ZIC2: miembro 2 de la familia Zic, SELE: selectina E, TLL10: símil 10 *Tolloid*, CD5: molécula CD5, KLHDC7A: dominio *kelch 7*^a, SLC22A31: miembro 31 de la familia 22 de transportador de solutos, SLC22A8: miembro 8 de la familia 22 de transportador de solutos, WNT7A: miembro 7A de la familia *WNT*.

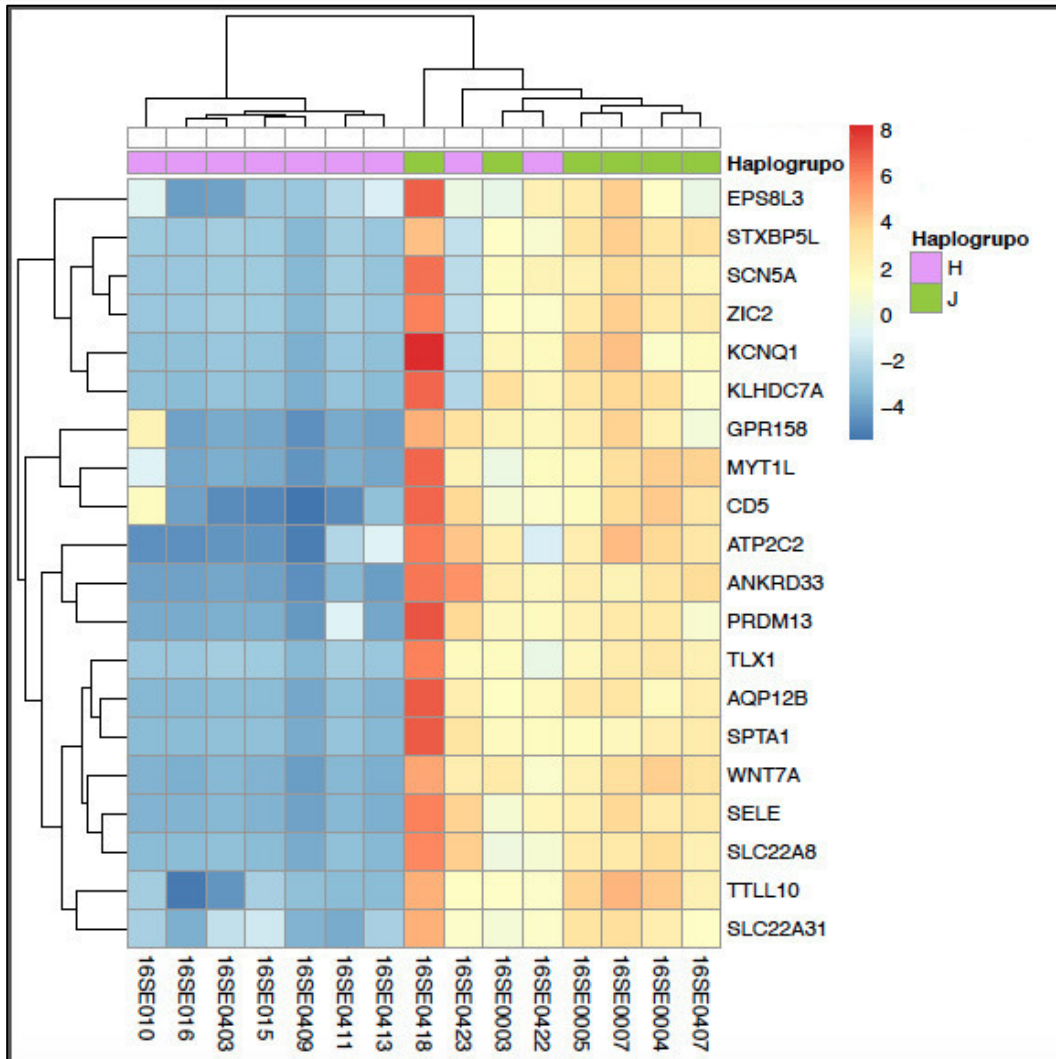
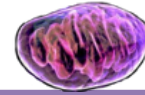


Figura 28. Heatmap de los 20 genes más significativos en la comparación Haplogrupo J - Haplogrupo H.

4.2.3.1.1 ANÁLISIS DE LOS PROCESOS ALTERADOS EN FUNCIÓN DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS POR HAPLOGRUPO MITOCONDRIAL

Con el objetivo de encontrar rutas biológicas alteradas en las cuales los genes diferencialmente expresados entre los grupos estudiados desempeñen un papel relevante, se realizó el análisis de procesos con la herramienta online DAVID v6.7 (<https://david.ncifcrf.gov>). Los procesos biológicamente alterados y sobre-expresados se muestran en la Figura 29 para el haplogrupo H y en la Figura 30 para el haplogrupo J.

En el haplogrupo H se encontraron 2 procesos biológicos significativamente alterados relacionados con la adhesión celular ($p=0,0018$) y la apoptosis ($p=0,047$). En cuanto al componente celular resultaron significativos la matriz extracelular ($p=0,034$) y las vesículas citoplasmáticas ($p=0,044$); y para la función molecular los más significativos fueron la unión de proteínas de citoesqueleto ($p=0,011$) y la unión de iones Ca^{+2} ($p=0,034$) (Figura 29).

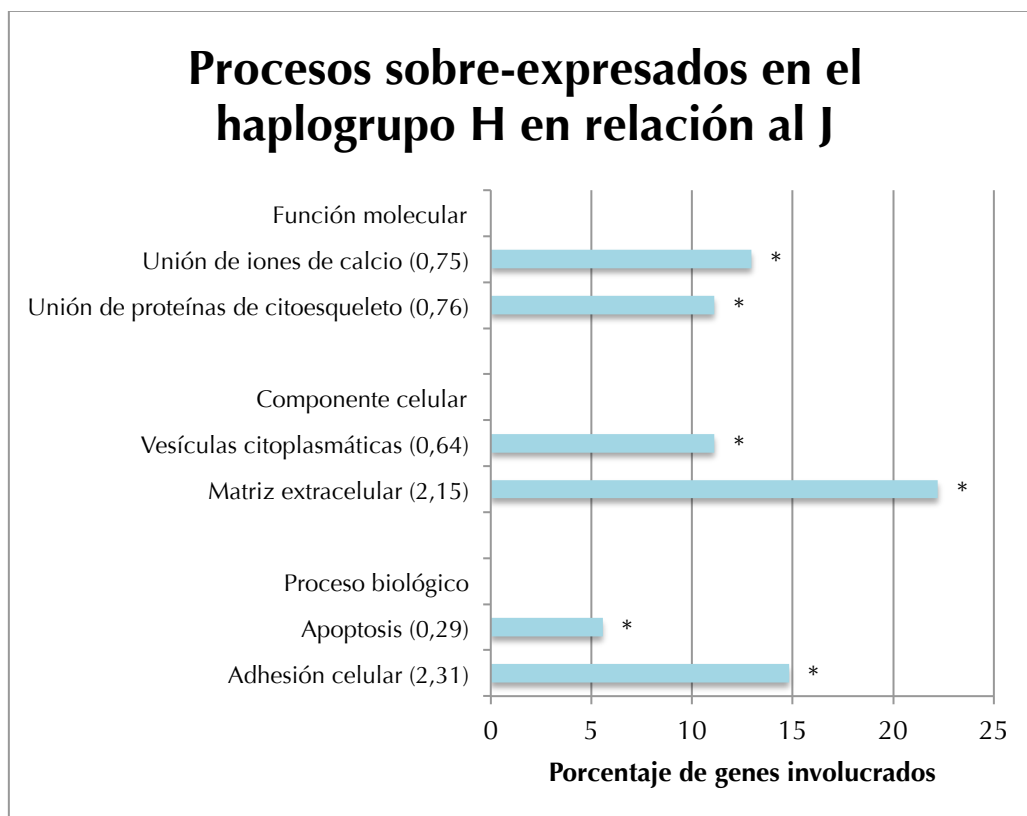


Figura 29. Procesos biológicos significativamente alterados y sobre-expresados para el haplogrupo H, obtenidos tras la comparación de los patrones de metilación diferencial entre el haplogrupo H y J, junto con su *enrichment score* entre paréntesis. (*) $p < 0,05$.

En el caso del haplogrupo J, 7 procesos biológicos resultaron significativamente alterados como el transporte de iones ($p=4 \cdot 10^{-6}$), la señalización celular ($p=3 \cdot 10^{-4}$), la movilización celular ($p=0,019$), el desarrollo del sistema inmune ($p=0,0092$), la homeostasis del Ca^{+2} ($p=0,047$), los procesos metabólicos de la regulación de AMPc ($p=0,034$) y la regulación de la síntesis de lípidos ($p=0,044$). Entre los procesos relacionados con el componente celular se encontraron la membrana plasmática ($p=8 \cdot 10^{-9}$), el complejo de canal iónico ($p=9,5 \cdot 10^{-7}$) y la matriz extracelular ($p=0,023$). En cuanto a la función molecular resultaron significativos la actividad transmembrana de transporte pasivo ($p=5,1 \cdot 10^{-10}$), la unión de péptidos ($p=0,0013$), la unión a la calmodulina ($p=0,0043$) y la actividad endopeptidasa ($p=0,044$) (Figura 30).



Procesos sobre-expresados en el haplogrupo J en relación al H

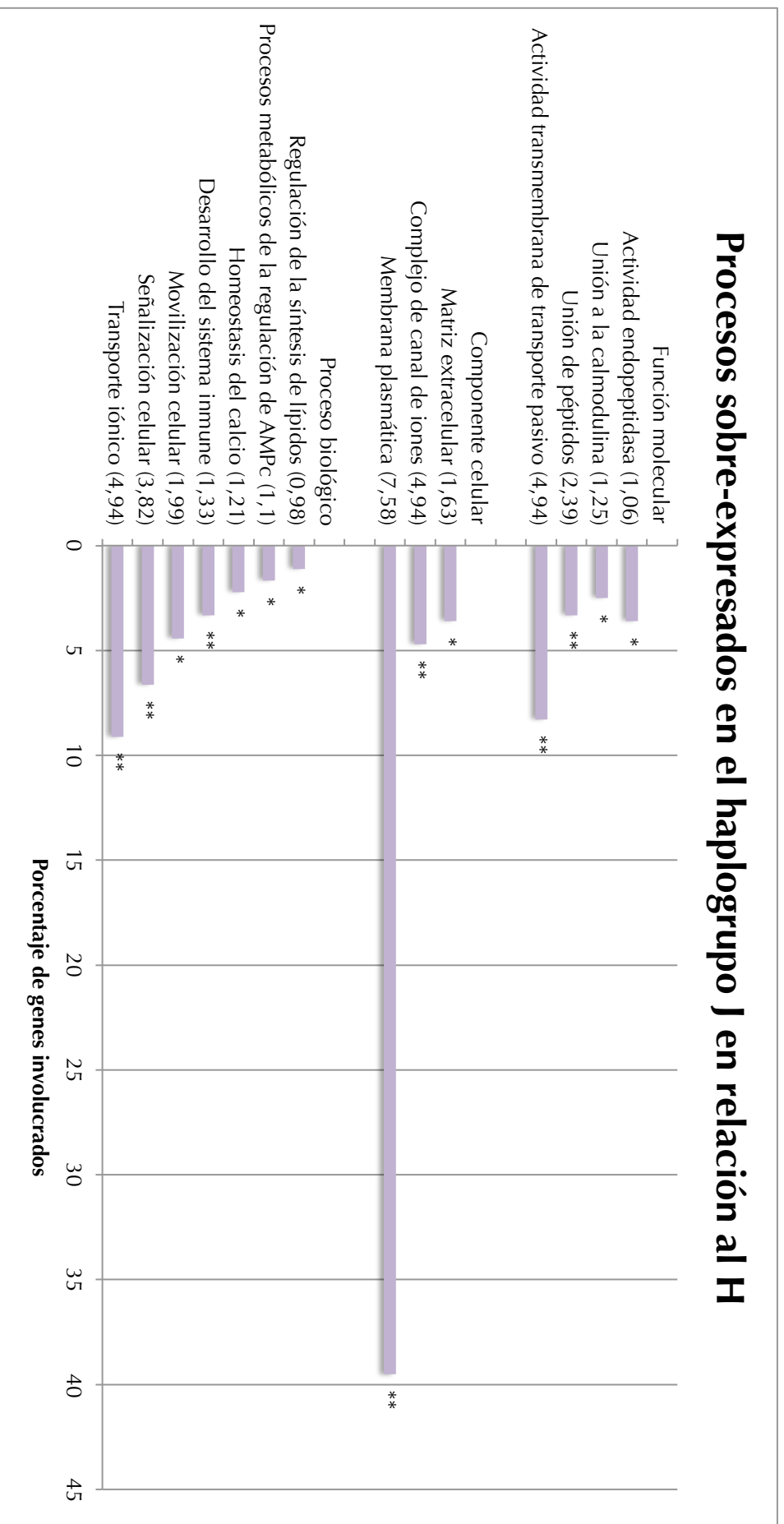


Figura 30. Procesos biológicos significativamente alterados y sobre-expresados para el haplogrupo J, obtenidos tras la comparación de los patrones de metilación diferencial entre el haplogrupo H y J, junto con su *enrichment score* entre paréntesis. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

4.2.3.1.2 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE METILACIÓN Y EXPRESIÓN A NIVEL DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES H Y J

Con los procesos obtenidos de los datos resultantes del *array* de metilación y de la expresión génica a partir del estudio de *RNA-Seq*, se buscaron coincidencias entre ambos estudios con el fin de hallar una relación entre el mecanismo epigenético y su expresión génica con el objetivo de identificar algún proceso relevante para el estudio de la enfermedad y para el diagnóstico de la misma según su haplogrupo mitocondrial. Primero se llevó a cabo una comparación de los genes para cada haplogrupo, en el caso del haplogrupo H no se encontró una correlación entre los genes hipometilados y sobre-expresados. En el caso del haplogrupo J los genes KCNIP4 (proteína 4 de intracción con canal de voltaje de sodio) y EMX1 (del inglés, *homeobox empty spiracles*) mostraron una correlación entre su hipometilación y su expresión génica (Figura 31).

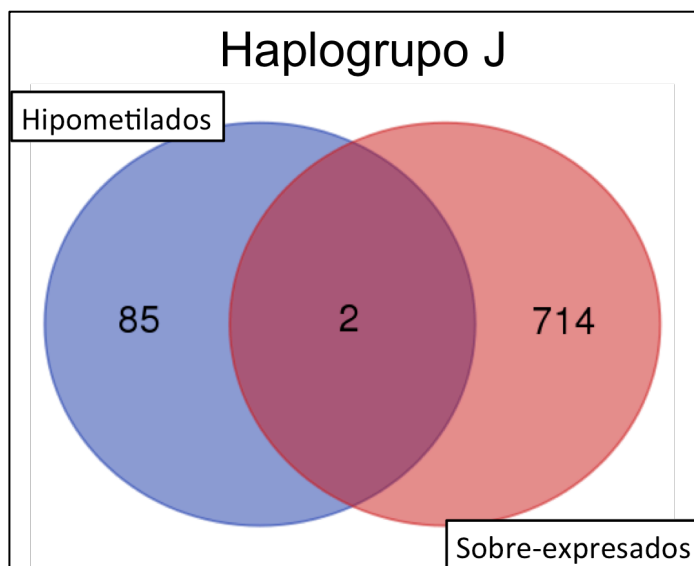
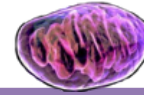


Figura 31. Diagrama de *Venn* que representa la correlación entre los genes hipometilados y sobre-expresados en el haplogrupo J con respecto al H.

A nivel de los procesos biológicos, lo más destacado es que, para el haplogrupo H, tanto el estudio de metilación como el posterior análisis del transcriptoma por *RNA-seq*, reveló una actividad aumentada del proceso de apoptosis. Por el contrario, este proceso estaría más reprimido en los portadores del haplogrupo J.

4.2.4 RESUMEN DE RESULTADOS

El análisis comparativo entre los diferentes haplogrupos de las muestras incluidas en el *array* de metilación mostró 1.926 regiones DMs, permitiendo



distinguir 3 grupos de muestras con un perfil de metilación característico para cada uno de los 3 haplogrupos H, J y U. Al comparar el haplogrupo H y el J, el análisis *post hoc* de Bonferroni reveló que 451 regiones DMs estaban hipermetiladas y que 87 estaban hipometiladas en el haplogrupo J frente al H, siendo el gen FUCA1 el más diferencialmente hipermetilado, y HOXD3 el más diferencialmente hipometilado. Al explorar la localización genómica de las regiones DMs se encontró que un 58,4% se situaban en las TSS activas, un 21,6% en las regiones flanqueantes activas de las TSS, mientras que un 1,12% se encontraban en las regiones con *enhancer*. De nuevo el gen FUCA1 resultó ser el más diferencialmente hipermetilado en las regiones flanqueantes activas de las TSS y el gen RNAsa8 resultó ser el más diferencialmente hipometilado en la región *enhancer* en los portadores del J frente a los del H.

En cuanto a los procesos biológicos hipometilados en el haplogrupo H frente al J, destaca principalmente la regulación positiva de la apoptosis; otros procesos en los portadores de este haplogrupo incluyeron la regulación negativa de la expresión génica, la morfogénesis celular relacionada con la diferenciación o la regulación negativa del proceso metabólico de macromoléculas, entre otros. En relación a los procesos hipometilados en el haplogrupo J con respecto al H, destaca principalmente la regulación negativa de la apoptosis y de la actividad catalítica

El estudio de expresión génica realizado por *RNA-Seq* y analizado por el método *kallisto*, mostró un total de 20.863 genes con al menos 1 TPM en el 40% de las muestras, en los cuales se evaluó la expresión diferencial en base a su haplogrupo mitocondrial. El análisis de la expresión génica basada en el haplogrupo mostró un total de 416 genes diferencialmente expresados entre el haplogrupo H y J (p -valor ajustado $\leq 0,005$ y $\text{Log. Fc} \geq 4$), de los cuales 362 resultaron sobre-expresados en los portadores del haplogrupo J con respecto al H, y 54 resultaron sobre-expresados en los portadores del H con respecto al J, lo que permitió agrupar a las muestras en dos *clusters* en función de su haplogrupo mitocondrial.

El análisis de los procesos biológicos sobre-expresados en el haplogrupo H con respecto al J reveló que tanto la adhesión celular como la apoptosis aparecieron significativamente sobre-representados; mientras que en el haplogrupo J destacan el transporte iónico, la señalización y movilidad celular, el desarrollo del sistema inmune, el metabolismo del Ca^{+2} , la regulación de AMPc y la regulación de la síntesis de lípidos.

OBJETIVO 3: EXPLORAR EL PAPEL EN LA ARTROSIS DE LAS INTERACCIONES MITOCONDRIA-NÚCLEO A NIVEL DE GENES RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

4.3 DESCRIPCIÓN DE LA COHORTE PROCOAC

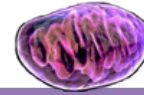
El estudio se realizó en una cohorte de cadera compuesta por 956 individuos, con una media de edad de $70,41 \pm 11,67$ años, y con un intervalo de edades comprendido entre los 45 y los 100 años. En el grupo de controles, la media de edad fue de $71,91 \pm 13,33$ años, con un mínimo de 45 años y un máximo de 100 años, mientras que para el grupo de artrósicos, la media de edad fue de $69,54 \pm 10,53$ años, con una edad mínima de 31 años y una máxima de 98 años.

En cuanto a la distribución por sexos, 545 (57%) eran mujeres y 411 (43%) hombres. Dentro del grupo control, 217 (62,4%) eran mujeres y 131 (37,6%) hombres, mientras que en el grupo de pacientes, 328 (53,9%) eran mujeres y 280 (46,1%) hombres. En este caso se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la distribución por sexos (OR=1,414; I.C. 95%= 1,080 – 1,851; $p=0,012$), por la que los hombres estaban más representados en el grupo de pacientes (Tabla 19).

Tabla 19. Distribución de la cohorte según el sexo y su condición de sanos o artrósicos en la cohorte PROCOAC.

	Sanos	Artrósicos	Total		I.C. 95%		
Total	348 (100%)	608 (100%)	956 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
Hombres	131 (37,6%)	280 (46,1%)	411 (43%)	1,414	1,080	1,851	0,012*
Mujeres	217 (62,4%)	328 (53,9%)	545 (57%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis. OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; (*) Test Chi-cuadrado, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$



4.3.1 ESTUDIO DE REPLICACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES CON LA ARTROSIS DE CADERA EN LA COHORTE PROCOAC

Del total de la cohorte se asignó el haplogrupo a 947 muestras. Los análisis se realizaron enfrentando los controles sanos frente a los pacientes y, para tener un mayor poder estadístico, los haplogrupos se agruparon en *clusters* mitocondriales, definidos como aquellos haplogrupos que presentan un origen filogenético común: HV, KU, TJ y Otros.

Los resultados obtenidos mostraron que la frecuencia del *cluster* TJ era significativamente mayor en el grupo de controles sanos (19,9%) que en el grupo de pacientes artrósicos (13,5%) (OR=0,624; I.C. 95%= 0,438 – 0,888; p=0,009), replicándose los hallazgos previos por los cuales el *cluster* TJ es un factor protector frente al desarrollo de la enfermedad. Para el resto de *clusters* la distribución de frecuencias entre sanos y artrósicos no mostró diferencias significativas (Tabla 20).

Tabla 20. Distribución de las frecuencias de los *clusters* según su condición de sanos o artrósicos en la cohorte PROCOAC.

Cluster	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		
					Inferior	Superior	p-valor
Total	346 (100%)	601 (100%)	947 (100%)				
HV	175 (50,6%)	321 (53,4%)	496 (52,4%)	1,131	0,867	1,475	0,364
KU	78 (22,5%)	144 (24,0%)	222 (23,4%)	1,088	0,794	1,490	0,600
TJ	69 (19,9%)	81 (13,5%)	150 (15,8%)	0,624	0,438	0,888	0,009**
Otros	24 (6,9%)	55 (9,2%)	79 (8,3%)	1,505	0,739	3,062	0,257

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis. OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; (*) Test Chi-cuadrado, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ (**).

A continuación se realizó un estudio de regresión ajustando por las variables de confusión de sexo y edad, y considerando el *cluster* más frecuente, el HV, como *cluster* de referencia. Los resultados mostraron, una vez más, que el *cluster* TJ, frente al *cluster* HV, es un factor protector de artrosis de cadera (OR=0,627; I.C. 95%= 0,432 – 0,911; p=0,014) (Tabla 21).

Tabla 21. Modelo de regresión para analizar el efecto de los *clusters* mitocondriales en el riesgo de artrosis de cadera en la cohorte PROCOAC.

Variables	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	0,289	0,141	1,335	1,013	1,759	0,04*
Edad	-0,016	0,006	0,984	0,973	0,996	0,009**
<i>Cluster</i>						0,048*
KU vs HV	-0,016	0,17	0,984	0,705	1,374	0,925
TJ vs HV	-0,467	0,19	0,627	0,432	0,911	0,014*
Otros vs HV	0,228	0,264	1,256	0,748	2,109	0,388

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

4.3.1.1 Estudio de asociación de los polimorfismos en genes relacionados con el estrés oxidativo y la detoxificación celular en la cohorte PROCOAC

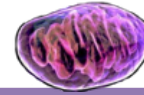
Para llevar a cabo este estudio se analizaron los genotipos de los diferentes polimorfismos en base a su genotipo dominante (Tabla 22), recesivo (Tabla 23) y homocigoto (Tabla 24).

4.3.1.1.1 SEGÚN SU GENOTIPO DOMINANTE

Del total de las muestras se analizaron 896 para el polimorfismo **rs659366** del gen UCP2, siendo las frecuencias de los genotipos las siguientes: 42,8% para el genotipo dominante CC y 57,2% para los genotipos CT/TT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 42,9% y 57,1% respectivamente, no observándose diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos (Tabla 22).

En el caso del polimorfismo **rs1052133** del gen OGG1 fueron determinadas 908 muestras del total y las frecuencias de sus genotipo fueron: 58,4% para el genotipo CC y 41,6% para los genotipos CG/GG en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 56,8% y 43,2% respectivamente, no detectándose diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos (Tabla 22).

Para el análisis del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT se analizaron 906 muestras del total y las frecuencias de los genotipos fueron: 59,9% para el genotipo CC y 40,1% para los genotipos CT/TT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 57,1% y 42,9% respectivamente,



sin observarse diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos para este polimorfismo (Tabla 22).

Para el SNP **rs1050450** del gen GPX1 se determinaron 884 muestras del total y las frecuencias de los genotipos fueron de 40,2% para el genotipo CC y 59,8% para los genotipos CT/TT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 45,4% y 54,6% respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos (Tabla 22).

En el caso del polimorfismo **rs4880** del gen SOD2 fueron identificadas 904 muestras del total y las frecuencias de los genotipos fueron: 22,3% para el genotipo CC y 77,7% para los genotipos CT/TT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 24,6% y 75,4% respectivamente, no detectándose diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos para este polimorfismo (Tabla 22).

Tabla 22. Distribución de los genotipos para los polimorfismos estudiados por condición de sanos o artrósicos y para el genotipo dominante en la cohorte PROCOAC.

UCP2 rs659366	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
				OR	Inferior	Superior	p-valor
	327 (100%)	569 (100%)	896 (100%)				
CC	140 (42,8%)	244 (42,9%)	384 (42,9%)	1,003	0,761	1,319	0,984
CT/TT	187 (57,2%)	325 (57,1%)	512 (57,1%)				
OGG1 rs1052133	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
				OR	Inferior	Superior	p-valor
	332 (100%)	576 (100%)	908 (100%)				
CC	194 (58,4%)	327 (56,8%)	521 (57,4%)	0,934	0,710	1,228	0,626
CG/GG	138 (41,6%)	249 (43,2%)	387 (42,6%)				
CAT rs1001179	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
				OR	Inferior	Superior	p-valor
	332 (100%)	574 (100%)	906 (100%)				
CC	199 (59,9%)	328 (57,1%)	527 (58,2%)	0,891	0,677	1,172	0,411
CT/TT	133 (40,1%)	246 (42,9%)	379 (41,8%)				

Resultados

Tabla 22 (continuación). Distribución de los genotipos para los polimorfismos estudiados por condición de sanos o artrósicos y para el genotipo dominante en la cohorte PROCOAC.

GPX1 rs1050450	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
	331 (100%)	553 (100%)	884 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
CC	133 (40,2%)	251 (45,4%)	384 (43,4%)	1,237	0,938	1,631	0,131
CT/TT	198 (59,8%)	302 (54,6%)	500 (56,6%)				

SOD2 rs4880	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
	323 (100%)	581 (100%)	904 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
CC	72 (22,3%)	143 (24,6%)	215 (23,8%)	1,137	0,823	1,572	0,432
CT/TT	251 (77,7%)	438 (75,4%)	689 (76,2%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza del Test Chi-cuadrado, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$.

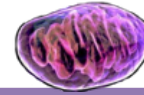
4.3.1.1.2 SEGÚN SU GENOTIPO RECESIVO

Para el SNP **rs659366** del gen UCP2 las frecuencias de los genotipos fueron de 13,1% para el genotipo TT y 86,9% para los genotipos CC/CT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 11,6% y 88,4% respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos para este polimorfismo (Tabla 23).

Las frecuencias de los genotipos del SNP **rs1052133** del gen OGG1 fueron de 6,6% para el genotipo GG y 93,4% para los genotipos CG/CC en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 4,9% y 95,1% respectivamente, sin detectarse diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos (Tabla 23).

En el caso del polimorfismo **rs1001179** del gen de CAT, las frecuencias de los genotipos fueron: 12,3% para el genotipo TT y 87,7% para los genotipos CC/CT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 6,6% y 93,4% respectivamente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (OR=0,503; I.C. 95%= 0,316 – 0,8; $p=0,003$) mostrando, por tanto, un menor riesgo de padecer la enfermedad los individuos que presentan el genotipo TT (Tabla 23).

Las frecuencias de los genotipos en el caso del polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1 fueron: 15,7% para el genotipo TT y 84,3% para los genotipos CT/CC en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron



de 12,5% y 87,5% respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos para este polimorfismo (Tabla 23).

Para el SNP **rs4880** del gen de SOD2 las frecuencias de los genotipos fueron de 24,5% para el genotipo TT y 75,5% para los genotipos CC/CT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 25% y 75% respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos para este polimorfismo (Tabla 23).

Tabla 23. Distribución de los genotipos para los polimorfismos estudiados por condición de sanos o artrósicos y para el genotipo recesivo en la cohorte PROCOAC.

UCP2 rs659366	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
TT	43 (13,1%)	66 (11,6%)	109 (12,2%)	0,866	0,574	1,307	0,494
CC/CT	284 (86,9%)	503 (88,4%)	787 (87,8%)				
OGG1 rs1052133	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
GG	22 (6,6%)	28 (4,9%)	50 (5,5%)	0,719	0,404	1,280	0,261
CG/CC	332 (93,4%)	548 (95,1%)	858 (94,5%)				
CAT rs1001179	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
TT	41 (12,3%)	38 (6,6%)	79 (8,7%)	0,503	0,316	0,8	0,003**
CC/CT	291 (87,7%)	536 (93,4%)	827 (87,7%)				
GPX1 rs1050450	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
TT	52 (15,7%)	69 (12,5%)	121 (13,7%)	0,765	0,518	1,128	0,176
CT/CC	279 (84,3%)	484 (87,5%)	763 (86,3%)				
SOD2 rs4880	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
TT	79 (24,5%)	145 (25%)	224 (24,8%)	1,026	0,749	1,408	0,868
CC/CT	244 (75,5%)	436 (75%)	680 (75,2%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza del Test Chi-cuadrado, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ (**).

4.3.1.1.3 SEGÚN SU GENOTIPO HOMOCIGOTO

Para el SNP **rs659366** del gen UCP2 había 493 muestras homocigotas y las frecuencias de los genotipos fueron de 76,5% para el genotipo CC y 23,5% para el genotipo TT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 78,7% y 21,3% respectivamente, sin observarse diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos para este polimorfismo (Tabla 24).

Las frecuencias de los genotipos homocigotos (571 muestras) del polimorfismo **rs1052133** del gen OGG1 fueron de 89,8% para el genotipo CC y 10,2% para el genotipo GG en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 92,1% y 7,9% respectivamente, sin detectarse diferencias significativas entre los sujetos sanos y artrósicos para este polimorfismo (Tabla 24).

En el caso del SNP **rs1001179** del gen CAT se identificaron 606 muestras homocigotas y las frecuencias de los genotipos fueron: 17,1% para el genotipo TT y 82,9% para el genotipo CC en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 10,4% y de 89,6% respectivamente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (OR=0,562; I.C. 95%= 0,35 – 0,904; $p=0,017$), y mostrando de nuevo que el genotipo TT de la catalasa es un factor protector frente al desarrollo de la enfermedad (Tabla 24).

En los genotipos homocigotos en el caso del polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1 se identificaron 505 muestras y sus frecuencias fueron de 71,9% para el genotipo CC y 28,1% para el genotipo TT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 78,4% y 21,6% respectivamente. Estas diferencias bordearon la significación estadística en el sentido de que el genotipo CC mostraría una tendencia hacia un factor de riesgo para la enfermedad (Tabla 24).

Para el SNP **rs4880** del gen SOD2 se observaron 439 genotipos homocigotos y sus frecuencias fueron de 47,7% para el genotipo CC y 52,3% para el genotipo TT en controles sanos, mientras que para los pacientes artrósicos fueron de 49,7% y 50,3% respectivamente, sin observarse una asociación significativa entre los sujetos sanos y artrósicos para este polimorfismo (Tabla 24).

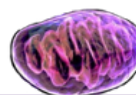


Tabla 24. Distribución de los genotipos para los polimorfismos estudiados por condición de sanos o artrósicos y para el genotipo homocigoto en la cohorte PROCOAC.

UCP2 rs659366	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
	183 (100%)	310 (100%)	493 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
CC	140 (76,5%)	244 (78,7%)	384 (77,9%)	1,135	0,733	1,757	0,568
TT	43 (23,5%)	66 (21,3%)	109 (22,1%)				
OGG1 rs1052133	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
	216 (100%)	355 (100%)	571 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
CC	194 (89,8%)	327 (92,1%)	521 (91,2%)	1,324	0,736	2,380	0,346
GG	22 (10,2%)	28 (7,9%)	50 (8,8%)				
CAT rs1001179	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
	240 (100%)	366 (100%)	606 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
TT	41 (17,1%)	38 (10,4%)	79 (13%)	0,562	0,35	0,904	0,017*
CC	199 (82,9 %)	328 (89,6%)	527 (87%)				
GPX1 rs1050450	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
	185 (100%)	320 (100%)	505 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
CC	133 (71,9%)	251 (78,4%)	384 (76,0%)	1,422	0,937	2,159	0,097
TT	52 (28,1%)	69 (21,6%)	121 (24,0%)				
SOD2 rs4880	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
	151 (100%)	288 (100%)	439 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
CC	72 (47,7%)	143 (49,7%)	215 (49%)	1,048	0,705	1,558	0,816
TT	79 (52,3%)	145 (50,3%)	224 (51%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza del Test Chi-cuadrado, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

4.3.1.1.4 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL MICROSATÉLITE DEL GEN NOS2A EN LA COHORTE PROCOAC

4.3.1.1.4.1 Estudio del microsatélite del gen NOS2A con el programa *Clumpp*

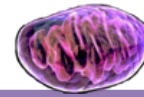
El análisis del microsatélite de NOS2A se realizó con el programa *Clumpp*, un programa creado para evaluar la importancia de los valores esperados, condicionados por los valores totales. Este programa funciona en tablas $2 \times N$, siendo N un número finito y positivo, y fue diseñado para ser usado en estudios genéticos de asociación caso-control. La significancia de los datos se evalúa usando el enfoque de Monte Carlo, realizando simulaciones para generar tablas con los mismos totales que la tabla original. La confianza del resultado estimado se basa en el número de veces que se logra, con los datos aleatoriamente simulados, el mismo resultado que la tabla original; estos valores de significación son imparciales y no necesitan una corrección para valores continuos (corrección de Yate) ni para valores esperados pequeños. Todos los análisis fueron realizados con un máximo de 9999 simulaciones y los valores obtenidos se indican como p-valor asociado al test Chi-cuadrado.

Los resultados obtenidos con el programa *Clumpp* nos indican que nuestra cohorte sigue una distribución normal ($p=0,0474$, en 438 simulaciones), que existen diferencias significativas entre los valores esperados ($p=0,0428$, en 408 simulaciones), que una de las repeticiones es significativa frente al resto ($p=0,021$ en 1664 simulaciones) y que el valor máximo de estos datos agrupados es de $p=0,0423$ en 422 simulaciones.

4.3.1.1.4.2 Determinación de las repeticiones implicadas en la enfermedad

Tras realizar el análisis caso-control con el programa *Clumpp* se buscó qué repetición estaba asociada con la enfermedad por medio del test Chi-cuadrado y se estimó el riesgo con la enfermedad. En esta cohorte, se encontraron 10 repeticiones diferentes, desde 8 hasta 17 repeticiones por alelo; sin embargo, en el caso de este último alelo no se tuvo en cuenta para los análisis ya que en uno de los grupos no se observaron recuentos.

De todas las repeticiones analizadas resultaron estadísticamente significativas dos de ellas, la repetición 11 y 13. Para aquellas muestras que se identificaron 11 repeticiones en alguno de sus alelos del gen NOS2A, se encontró una asociación estadísticamente significativa ($OR=1,519$; I.C.



95%= 1,131 – 2,041; $p=0,005$) siendo un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad. En el caso de las muestras con 13 repeticiones resultó también en una asociación estadísticamente significativa (OR=0,685; I.C. 95%= 0,517 – 0,908; $p=0,008$) pero en este caso con un papel protector frente a la enfermedad (Tabla 25).

Tabla 25. Distribución de los recuentos de las repeticiones para el microsatélite del gen NOS2A por condición de sanos o artrósicos en la cohorte PROCOAC.

NOS2A	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
				OR	Inferior	Superior	p-valor
Total	334 (100%)	582 (100%)	916 (100%)				
8 repeticiones	10 (3%)	30 (5,2%)	40 (4,4%)	1,761	0,85	3,649	0,124
no 8	324 (97%)	552 (94,8%)	876 (95,6%)				
Total	334 (100%)	582 (100%)	916 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
9 repeticiones	49 (14,7%)	63 (10,8%)	112 (12,2%)	0,706	0,473	1,054	0,087
no 9	285 (85,3%)	519 (89,2%)	804 (87,8%)				
Total	334 (100%)	582 (100%)	916 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
10 repeticiones	70 (21%)	140 (24,1%)	210 (22,9%)	1,195	0,863	1,653	0,283
no 10	264 (79%)	442 (75,9%)	706 (77,1%)				
Total	334 (100%)	582 (100%)	916 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
11 repeticiones	90 (26,9%)	209 (35,9%)	299 (32,6%)	1,519	1,131	2,041	0,005**
no 11	244 (73,1%)	373 (64,1%)	617 (67,4%)				
Total	334 (100%)	582 (100%)	916 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
12 repeticiones	169 (50,6%)	275 (47,3%)	472 (51,5%)	0,875	0,668	1,145	0,329
no 12	165 (49,4%)	307 (52,5%)	444 (48,5%)				
Total	334 (100%)	582 (100%)	916 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
13 repeticiones	132 (39,5%)	180 (30,9%)	312 (34,1%)	0,685	0,517	0,908	0,008**
no 13	202 (60,5%)	402 (69,1%)	604 (65,9%)				

Tabla 25. (continuación) Distribución de los recuentos de las repeticiones para el microsatélite del gen NOS2A por condición de sanos o artrósicos en la cohorte PROCOAC.

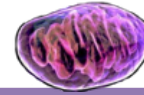
NOS2A	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
				OR	Inferior	Superior	p-valor
Total	334 (100%)	582 (100%)	916 (100%)				
14 repeticiones	52 (15,6%)	97 (16,7%)	149 (16,3%)	1,085	0,751	1,566	0,665
no 14	282 (84,4%)	485 (83,3%)	767 (83,7%)				
Total	334 (100%)	582 (100%)	916 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
15 repeticiones	23 (6,9%)	42 (7,2%)	65 (7,1%)	1,052	0,621	1,782	0,851
no 15	311 (93,1%)	540 (92,8%)	851 (92,9%)				
Total	334 (100%)	582 (100%)	916 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
16 repeticiones	6 (1,8%)	13 (2,2%)	19 (2,1%)	1,249	0,47	3,317	0,655
no 16	328 (98,2%)	569 (97,8%)	897 (97,9%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza del Test Chi-cuadrado, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

4.3.1.1.4.3 Modelos de regresión logística

Se realizaron tres modelos de regresión logística. En un primer modelo se tuvieron en cuenta las siguientes variables: sexo, edad, *cluster* mitocondrial, genotipos del polimorfismo **rs1001179** de CAT y las repeticiones 11 y 13 de NOS2A de forma independiente (Tabla 26); los dos siguientes modelos se centraron en explorar qué genotipos del microsatélite de NOS2A eran los que tenían incidencia en la prevalencia de la enfermedad, de modo que en uno de ellos se utilizó como genotipo de referencia el conjunto de genotipos minoritarios de NOS2A, definido como "Otros" (Tabla 27), y en el otro modelo se utilizó como genotipo de referencia el que estaba compuesto por 11 repeticiones en un alelo y 12 repeticiones en el otro (11-12) (Tabla 28).

En el primer análisis de regresión múltiple tras realizar el ajuste por sexo, edad, *cluster*, genotipos del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT y las repeticiones halladas asociadas a la enfermedad de forma significativa del gen NOS2A, se observó que el *cluster* TJ tiene una diferencia estadísticamente significativa frente al *cluster* mayoritario HV (OR=0,647; I.C. 95%= 0,440 – 0,952; $p=0,027$) manteniendo su papel protector frente a la enfermedad. En cuanto a los genotipos de los diferentes polimorfismos, se puede observar que el genotipo TT del polimorfismo **rs1001179** del gen



CAT aparece también como un factor protector frente la artrosis de cadera de forma significativa (OR=0,514; I.C. 95%= 0,316 – 0,836; p=0,007). En el caso de las repeticiones del microsatélite del gen NOS2A, la presencia del alelo de 11 repeticiones se asoció con un mayor riesgo de artrosis (OR=1,393; I.C. 95%= 1,019 – 1,904; p=0,038), mientras que tener 13 repeticiones en alguno de los alelos se asoció significativamente con un menor riesgo de padecer la enfermedad (OR=0,703; I.C. 95%= 0,522 – 0,947; p=0,020) (Tabla 26).

Tabla 26. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto de los *clusters* mitocondriales, los genotipos del polimorfismo **rs1001179** de CAT y las repeticiones del microsatélite de NOS2A en la cohorte PROCOAC.

Variables	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	0,235	0,146	1,265	0,95	1,686	0,108
Edad	-0,013	0,006	0,987	0,975	0,999	0,040*
<i>Cluster</i>						0,064
KU vs HV	0,071	0,178	1,074	0,757	1,524	0,689
TJ vs HV	-0,435	0,197	0,647	0,440	0,952	0,027*
Otros vs HV	0,243	0,281	1,275	0,735	2,213	0,387
CAT.TT vs no.TT	-0,665	0,248	0,514	0,316	0,836	0,007**
iNOS.11 rep.	0,331	0,159	1,393	1,019	1,904	0,038*
iNOS.13 rep.	-0,352	0,152	0,703	0,522	0,947	0,020*

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; significancia estadística declarada a p<0,05 (*), p<0,01 (**).

El segundo modelo de regresión múltiple, ajustado por sexo, edad, *cluster* y genotipos del gen CAT en su polimorfismo **rs1001179** y del microsatélite del gen NOS2A, utilizando como genotipo de referencia el conjunto de genotipos minoritarios "Otros", mostró una asociación estadísticamente significativa para el genotipo TT del polimorfismo **rs1001179** de CAT como factor protector (OR=0,492; I.C. 95%= 0,302 – 0,801; p=0,004). Y en el caso de los genotipos del microsatélite del gen NOS2A se observó una asociación significativa a nivel del genotipo 12-13 (OR=0,490; I.C. 95%= 0,314 – 0,765; p=0,002) como factor protector (Tabla 27).

En el tercer modelo de regresión múltiple ajustado por sexo, edad, *cluster* y genotipos del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT y del microsatélite del gen NOS2A comparado con el genotipo más frecuente 11-12, el genotipo 12-13 se asoció significativamente con un menor riesgo, al compararlo con el genotipo 11-12 (OR=0,309; I.C. 95%= 0,166 – 0,575; p<0,001) (Tabla 28).

Tabla 27. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto de los *clusters* mitocondriales, los genotipos del polimorfismo **rs1001179** de CAT y las repeticiones del microsatélite de NOS2A utilizando el grupo "Otros" como referencia en la cohorte PROCOAC.

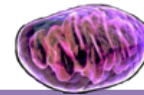
Variables	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	0,217	0,147	1,242	0,931	1,657	0,140
Edad	-0,014	0,006	0,986	0,974	0,998	0,027*
<i>Cluster</i>						0,076
KU vs HV	0,05	0,179	1,051	0,74	1,494	0,781
TJ vs HV	-0,419	0,198	0,658	0,446	0,969	0,034*
Otros vs HV	0,274	0,282	1,315	0,757	2,285	0,331
CAT.TT vs no.TT	-0,709	0,248	0,492	0,302	0,801	0,004**
NOS2A						0,009**
11-12 vs Otros	0,462	0,258	1,587	0,957	2,634	0,074
12-13 vs Otros	-0,714	0,227	0,490	0,314	0,765	0,002**
12-12 vs Otros	-0,045	0,257	0,956	0,578	1,582	0,861
10-12 vs Otros	0,022	0,28	1,022	0,59	1,769	0,938
11-13 vs Otros	0,009	0,305	1,009	0,555	1,835	0,975

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

Tabla 28. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto de los *clusters* mitocondriales, los genotipos del polimorfismo **rs1001179** de CAT y las repeticiones del microsatélite de NOS2A utilizando el genotipo 11-12 como referencia en la cohorte PROCOAC.

Variables	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	0,217	0,147	1,242	0,931	1,657	0,140
Edad	-0,014	0,006	0,986	0,974	0,998	0,027*
<i>Cluster</i>						0,076
KU vs HV	0,05	0,179	1,051	0,740	1,494	0,781
TJ vs HV	-0,419	0,198	0,658	0,446	0,969	0,034*
Otros vs HV	0,274	0,282	1,315	0,757	2,285	0,331
CAT.TT vs no.TT	-0,709	0,248	0,492	0,302	0,801	0,004**
NOS2A						0,009**
12-13 vs 11-12	-1,176	0,317	0,309	0,166	0,575	<0,001**
12-12 vs 11-12	-0,507	0,339	0,602	0,310	1,170	0,135
10-12 vs 11-12	-0,44	0,356	0,644	0,320	1,295	0,217
11-13 vs 11-12	-0,453	0,377	0,636	0,304	1,332	0,230
Otros vs 11-12	-0,462	0,258	0,630	0,380	1,045	0,074

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).



4.3.1.2 Estudio de asociación de las interacciones entre los clusters

mitocondriales y los polimorfismos nucleares analizados en la cohorte PROCOAC

El análisis de las interacciones se realizó teniendo en cuenta el *cluster* protector TJ y el *cluster* de referencia más común HV. Para este estudio se realizaron diferentes modelos de regresión ajustando por sexo y edad. Asimismo, se tuvo en cuenta el estatus dominante, recesivo y homocigoto de cada uno de los polimorfismos analizados a la hora de realizar el análisis de interacción.

4.3.1.2.1 INTERACCIONES ENTRE LOS CLUSTERS MITOCONDRIALES Y LOS GENOTIPOS EN SU FORMA DOMINANTE

Los resultados de los análisis de interacción de todos los SNPs se muestran en la Tabla 29 para el caso del *cluster* TJ y en la Tabla 30 para el *cluster* HV.

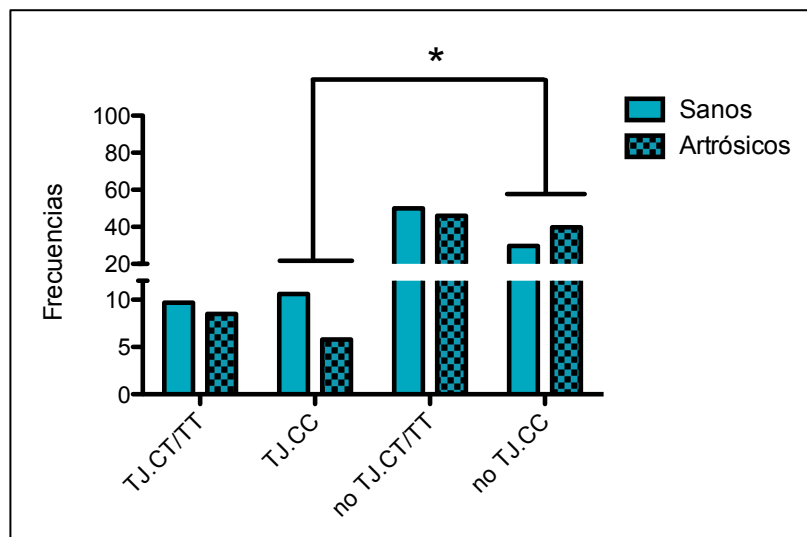


Figura 32. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 en su forma dominante y su interacción con el *cluster* TJ estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC. Los valores representados se corresponden con los porcentajes, siendo el 100% el total de individuos (sanos o artrósicos) independientemente del *cluster*. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

El modelo de regresión ajustado por sexo y edad no mostró interacciones significativas entre el *cluster* TJ y el genotipo dominante de los polimorfismos **rs659366** de UCP2, **rs1052133** de OGG1, **rs1001179** de CAT ni en **rs4880** de SOD2. Sin embargo, sí se encontró una interacción estadísticamente significativa para el caso de **rs1050450** del gen GPX1, en su forma dominante, y el *cluster* TJ ($p=0,037$) (Tabla 29), de modo que el genotipo CC combinado con el *cluster* TJ tenía un comportamiento

Resultados

protector, frente al genotipo CC combinado con otro *cluster* que no sea el Tj, que presentaba un comportamiento de riesgo (OR=0,424; I.C. 95%= 0,247 – 0,727; p=0,002) (Figura 32). En el caso del *cluster* HV no se encontraron interacciones estadísticamente significativas para ninguno de los genotipos en su forma dominante.

Tabla 29. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos de los genes a estudio con el *cluster* Tj ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.

UCP2 rs659366	Cluster Tj		Cluster no-Tj		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	32 (47,1%)	33 (42,3%)	108 (41,7%)	210 (42,9%)	0,394
CT/TT	36 (52,9%)	45 (57,7%)	151 (58,3%)	279 (57,1%)	
Total	68 (100%)	78 (100%)	259 (100%)	489 (100%)	
OGG1 rs1052133	Cluster Tj		Cluster no-Tj		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	39 (58,2%)	46 (61,3%)	154 (58,3%)	278 (55,9%)	0,455
CG/GG	28 (41,8%)	29 (38,7%)	110 (41,7%)	219 (44,1%)	
Total	67 (100%)	75 (100%)	264 (100%)	497 (100%)	
CAT rs1001179	Cluster Tj		Cluster no-Tj		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	36 (53,7%)	43 (54,4%)	163 (61,5%)	283 (57,6%)	0,646
CT/TT	31 (46,3%)	36 (45,6%)	102 (38,5%)	208 (42,4%)	
Total	67 (100%)	79 (100%)	265 (100%)	491 (100%)	
GPX1 rs1050450	Cluster Tj		Cluster no-Tj		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	35 (52,2%)	32 (40,5%)	98 (37,3%)	218 (46,30%)	0,037*
CT/TT	32 (47,8%)	47 (59,5%)	165 (62,7%)	253 (53,7%)	
Total	67 (100%)	79 (100%)	263 (100%)	734 (100%)	
SOD2 rs4880	Cluster Tj		Cluster no-Tj		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	16 (24,2%)	17 (22,1%)	55 (21,5%)	125 (25,1%)	0,350
CT/TT	50 (75,8%)	60 (77,9%)	201 (78,5%)	374 (74,9%)	
Total	66 (100%)	77 (100%)	256 (100%)	499 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; significancia estadística, del modelo de regresión ajustado por sexo y edad, declarada a $p \leq 0,05$ (*).

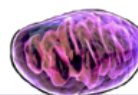


Tabla 30. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos de los genes a estudio con el cluster HV ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.

UCP2 rs659366	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	75 (44,6%)	131 (43,3%)	65 (40,9%)	112 (42,3%)	0,817
CT/TT	93 (55,4%)	171 (56,6%)	94 (59,1%)	153 (57,7%)	
Total	168 (100%)	302 (100%)	159 (100%)	265 (100%)	
OGG1 rs1052133	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	97 (56,7%)	173 (56,4%)	96 (60%)	151 (57%)	0,845
CG/GG	74 (43,3%)	134 (43,6%)	64 (40%)	114 (43%)	
Total	171 (100%)	307 (100%)	160 (100%)	265 (100%)	
CAT rs1001179	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	105 (61,4%)	179 (59,1%)	94 (58,4%)	147 (55,1%)	0,914
CT/TT	66 (38,6%)	124 (40,9%)	67 (41,6%)	120 (44,9%)	
Total	171 (100%)	303 (100%)	161 (100%)	267 (100%)	
GPX1 rs1050450	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	59 (35,3%)	133 (45,9%)	74 (45,4%)	117 (45%)	0,176
CT/TT	108 (64,7%)	157 (54,1%)	89 (54,6%)	143 (55%)	
Total	167 (100%)	290 (100%)	163 (100%)	260 (100%)	
SOD2 rs4880	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	37 (22,6%)	76 (24,4%)	34 (21,5%)	66 (24,9%)	0,769
CT/TT	127 (77,4%)	235 (75,6%)	124 (78,5%)	199 (75,1%)	
Total	164 (100%)	311 (100%)	158 (100%)	265 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.

4.3.1.2.2 INTERACCIONES DE LOS CLUSTERS DE HAPLOGRUPOS Y LOS GENOTIPOS EN SU FORMA RECESIVA

El análisis de las interacciones se realizó también con los genotipos recesivos de cada polimorfismo con los diferentes *clusters*; los resultados se muestran en la Tabla 31 para el *cluster* TJ y en la Tabla 32 para el *cluster* HV. De todas las combinaciones analizadas se encontraron interacciones estadísticamente significativas entre el *cluster* TJ y el genotipo recesivo de **rs1050450** de GPX1 ($p=0,03$) (Tabla 31), de modo que el comportamiento del genotipo TT muestra un papel protector sólo si combina con un *cluster* que no sea TJ (OR=0,333; I.C. 95%= 0,113 – 0,980; $p=0,046$); por su parte, la combinación del *cluster* TJ con el genotipo CC/CT también mostró un comportamiento protector (OR=0,287; I.C. 95%= 0,099 – 0,831; $p=0,021$) (Figura 33).

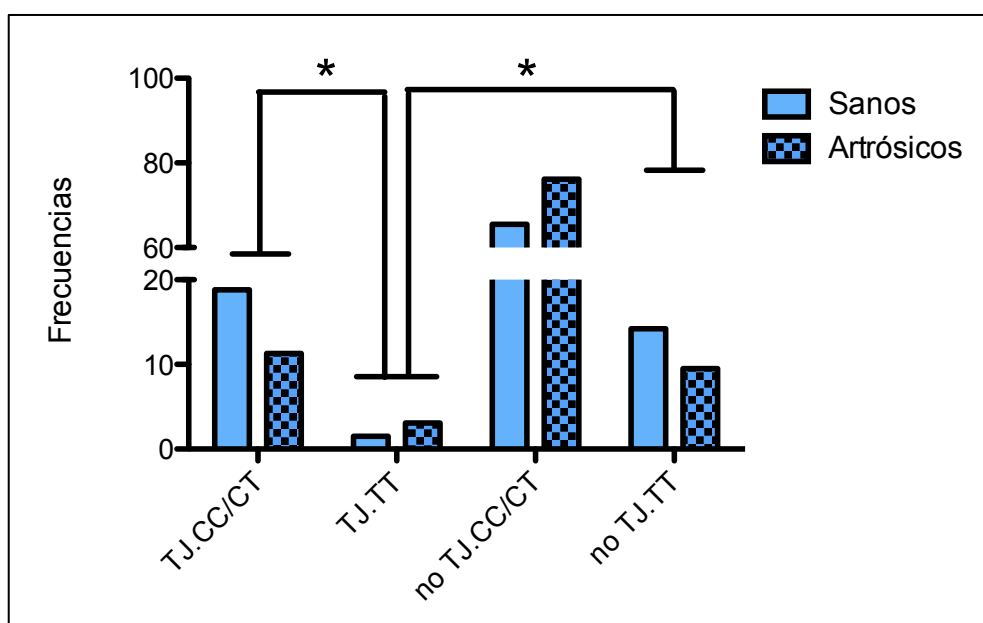
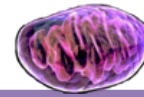


Figura 33. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 en su forma recesiva y su interacción con el *cluster* TJ estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC. Los valores representados se corresponden con los porcentajes, siendo el 100% el total de individuos (sanos o artrósicos) independientemente del *cluster*. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

En relación al *cluster* HV, también se han encontrado interacciones significativas con el genotipo recesivo del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 ($p=0,046$) (Tabla 32), de modo que, en este caso, el genotipo TT tiene un comportamiento protector sólo si se combina con este *cluster* (OR=0,535; I.C. 95%= 0,307 – 0,934; $p=0,028$) (Figura 34).



Por otra parte, el genotipo recesivo del SNP **rs659366** del gen UCP2 bordeó la significación estadística a nivel de su interacción con el *cluster* HV ($p=0,074$) (Tabla 32).

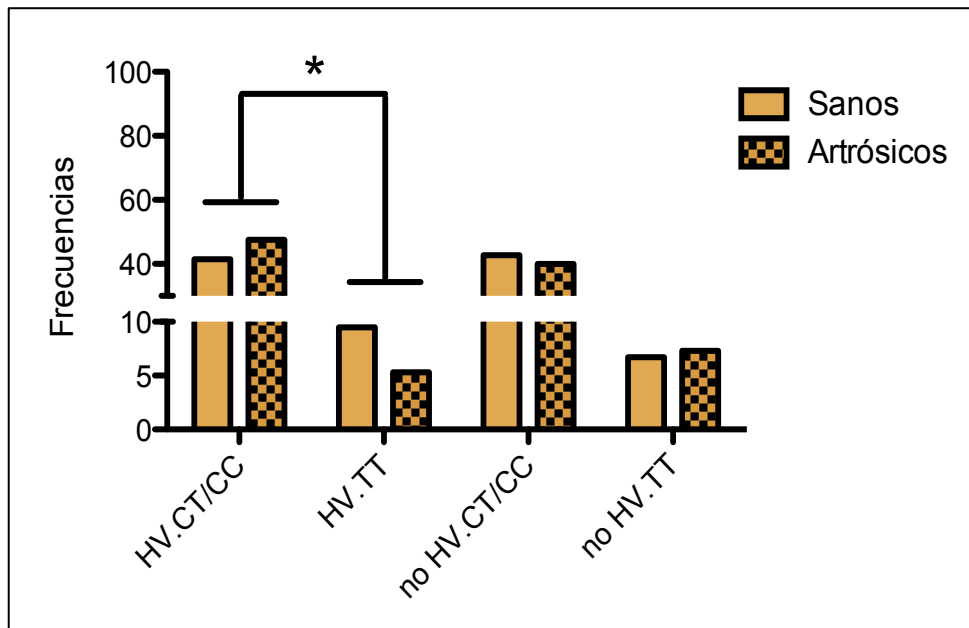


Figura 34. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 en su forma recesiva y su interacción con el *cluster* HV estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC. Los valores representados se corresponden con los porcentajes, siendo el 100% el total de individuos (sanos o artrósicos) independientemente del *cluster*. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

Tabla 31. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos de los genes a estudio con el *cluster* TJ ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.

UCP2 rs659366	<i>Cluster</i> TJ		<i>Cluster</i> no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	11 (16,2%)	8 (10,3%)	32 (12,4%)	58 (11,9%)	0,448
CC/CT	57 (83,8%)	70 (89,7%)	227 (87,6%)	431 (88,1%)	
Total	68 (100%)	78 (100%)	259 (100%)	489 (100%)	
OGG1 rs1052133					p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
GG	5 (7,5%)	3 (4%)	17 (6,4%)	24 (4,8%)	0,536
CG/CC	62 (92,5%)	72 (96%)	247 (93,6%)	473 (95,2%)	
Total	69 (100%)	75 (100%)	264 (100%)	497 (100%)	

Resultados

Tabla 31 (continuación). Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos de los genes a estudio con el *cluster* TJ ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.

CAT	<i>Cluster</i> TJ		<i>Cluster</i> no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
rs1001179					
TT	10 (14,9%)	6 (7,6%)	31 (11,7%)	31 (6,3%)	0,946
CC/CT	57 (85,1%)	73 (92,4%)	234 (88,3%)	460 (93,7%)	
Total	67 (100%)	79 (100%)	261 (100%)	491 (100%)	
GPX1 rs1050450					p-valor de la interacción
TT	5 (7,5%)	17 (21,5%)	47 (17,9%)	52 (11%)	0,03*
CC/CT	62 (92,5%)	62 (78,5%)	216 (82,1%)	419 (89%)	
Total	67 (100%)	79 (100%)	263 (100%)	471 (100%)	
SOD2 rs4880					p-valor de la interacción
TT	17 (25,8%)	17 (22,1%)	62 (24,2%)	124 (24,8%)	0,602
CC/CT	49 (74,2%)	60 (77,9%)	194 (75,8%)	375 (75,2%)	
Total	66 (100%)	77 (100%)	256 (100%)	499 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; significancia estadística, del modelo de regresión ajustado por sexo y edad, declarada a $p \leq 0,05$ ().

Tabla 32. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos de los genes a estudio con el *cluster* HV ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.

UCP2 rs659366	<i>Cluster</i> HV		<i>Cluster</i> no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	17 (10,1%)	39(12,9%)	26 (16,4%)	27 (10,2%)	0,074
CC/CT	151 (89,9%)	263 (87,1%)	133 (83,6%)	238 (89,8%)	
Total	168 (100%)	302 (100%)	159 (100%)	265 (100%)	

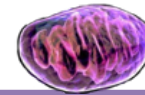


Tabla 32 (continuación). Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos de los genes a estudio con el *cluster* HV ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.

OGG1 rs1052133	<i>Cluster</i> HV		<i>Cluster</i> no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
GG	12 (7%)	14 (4,6%)	10 (6,3%)	13 (4,9%)	0,745
CG/CC	159 (93%)	293 (95,4%)	150 (93,7%)	252 (95,1%)	
Total	171 (100%)	307 (100%)	160 (100%)	165 (100%)	
CAT rs1001179					p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	17 (9,9%)	22 (7,3%)	24 (14,9%)	15 (5,6%)	0,112
CC/CT	154 (90,1%)	281 (92,7%)	137 (85,1%)	252 (94,4%)	
Total	171 (100%)	303 (100%)	161 (100%)	267 (100%)	
GPX1 rs1050450					p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	30 (18%)	29 (10%)	22 (13,5%)	40 (15,4%)	0,046*
CC/CT	137 (82%)	261 (90%)	141 (86,5%)	220 (84,6%)	
Total	167 (100%)	290 (100%)	163 (100%)	260 (100%)	
SOD2 rs4880					p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	40 (24,4%)	80 (25,7%)	39 (24,7%)	61 (23%)	0,536
CC/CT	124 (75,6%)	231 (74,3%)	119 (75,3%)	204 (77%)	
Total	144 (100%)	311 (100%)	158 (100%)	265 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; significancia estadística, del modelo de regresión ajustado por sexo y edad, declarada a $p \leq 0,05$ (*).

4.3.1.2.3 INTERACCIONES DE LOS CLUSTERS DE HAPLOGRUPOS Y LOS GENOTIPOS EN SU CONDICIÓN DE HOMOCIGOTO

La combinación de los genotipos homocigotos de los polimorfismos de los genes estudiados con los *clusters* analizados se muestran en la Tabla 33 para el *cluster* TJ y en la Tabla 34 para el *cluster* HV. Los resultados reflejan una interacción estadísticamente significativa entre el *cluster* TJ y el genotipo homocigoto del polimorfismo **rs1001179** del gen GPX1 ($p=0,002$), de modo que la combinación del genotipo CC con el *cluster* TJ tiene un comportamiento protector frente a la enfermedad (OR=0,424; I.C.95%= 0,247 – 0,726; $p=0,002$) (Figura 35). En relación al *cluster* HV también se

han detectado interacciones significativas con el genotipo homocigoto del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 ($p=0,033$) (Tabla 34), de modo que, en este caso, es la combinación del genotipo TT con el *cluster* HV la que tiene un comportamiento protector (OR=0,468; I.C.95%= 0,256 – 0,856; $p=0,014$) (Figura 36).

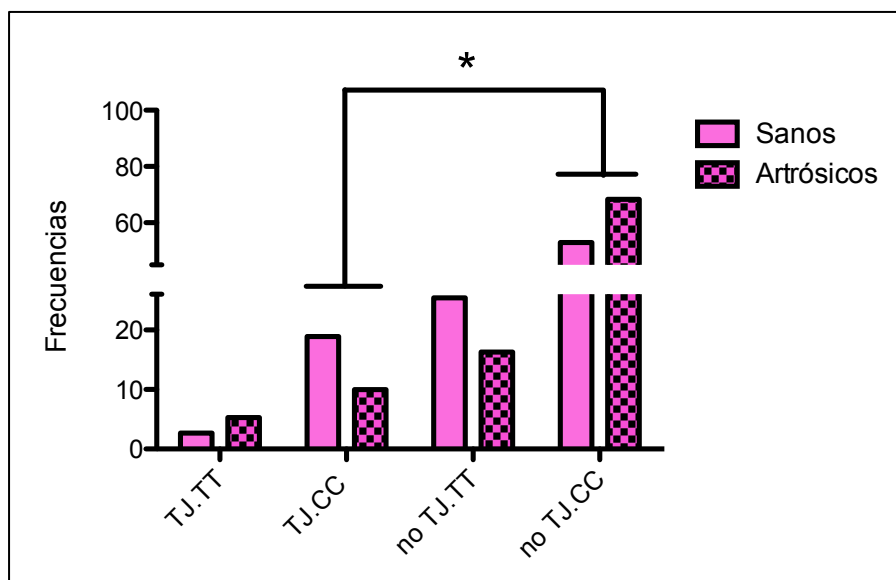


Figura 35. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 en su forma homocigota y su interacción con el *cluster* TJ estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC. Los valores representados se corresponden con los porcentajes, siendo el 100% el total de individuos (sanos o artrósicos) independientemente del *cluster*. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

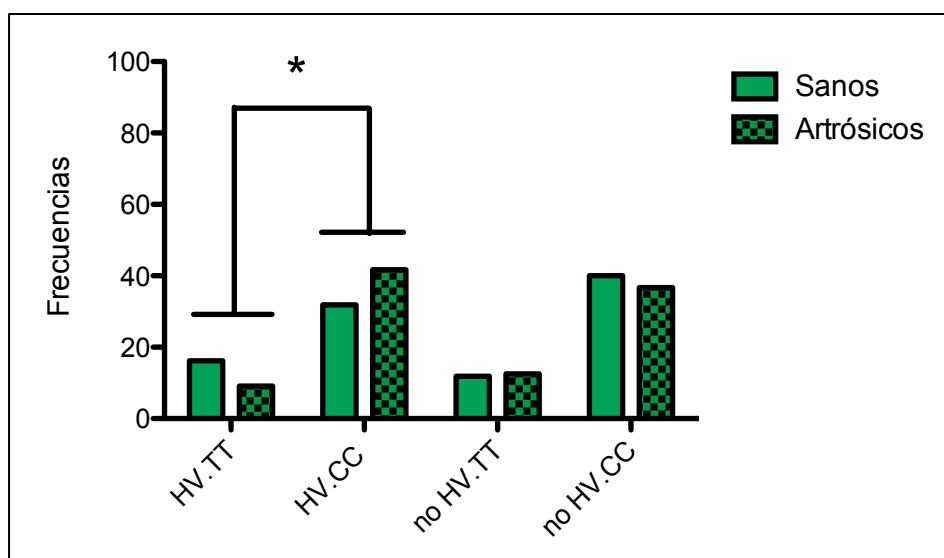


Figura 36. Representación gráfica de las frecuencias de los distintos genotipos del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 en su forma homocigota y su interacción con el *cluster* HV estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte PROCOAC. Los valores representados se corresponden con los porcentajes, siendo el 100% el total de individuos (sanos o artrósicos) independientemente del *cluster*. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

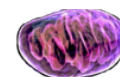


Tabla 33. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismos de los genes a estudio con el cluster TJ ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.

UCP2 rs659366	Cluster TJ		Cluster no TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	11 (25,6%)	8 (19,5%)	32 (22,9%)	58 (21,6%)	0,728
CC	32 (74,4%)	33 (80,5%)	108 (77,1%)	210 (78,4%)	
Total	43 (100%)	41 (100%)	140 (100%)	268 (100%)	
OGG1 rs1052133	Cluster TJ		Cluster no TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
GG	5 (11,4 %)	3 (6,1%)	17 (9,9%)	24 (7,9%)	0,520
CC	39 (88,6%)	46 (93,9%)	154 (90,1%)	278 (92,1%)	
Total	44 (100%)	49 (100%)	171 (100%)	302 (100%)	
CAT rs1001179	Cluster TJ		Cluster no TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	10 (21,7%)	6 (12,2%)	31 (16%)	31 (9,9%)	0,902
CC	36 (78,3%)	43 (87,8%)	163 (84%)	283 (90,1%)	
Total	46 (100%)	49 (100%)	194 (100%)	314 (100%)	
GPX1 rs1050450	Cluster TJ		Cluster no TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	5 (12,5%)	17 (34,7%)	47 (32,4%)	52 (19,3%)	0,002**
CC	35 (87,5%)	32 (65,3%)	98 (67,6%)	218 (80,7%)	
Total	38 (100%)	49 (100%)	145 (100%)	270 (100%)	
SOD2 rs4880	Cluster TJ		Cluster no TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	16 (48,5%)	17 (50%)	55 (47%)	125 (50,2%)	0,808
TT	17 (51,5%)	17 (50%)	62 (53%)	124 (49,8%)	
Total	33 (100%)	34 (100%)	117 (100%)	249 (100%)	

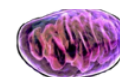
Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; significancia estadística, del modelo de regresión ajustado por sexo y edad, declarada a $p \leq 0,05$ (*).

Resultados

Tabla 34. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismo de los genes a estudio con el *cluster* HV ajustado por sexo y edad en la cohorte PROCOAC.

UCP2 rs659366	<i>Cluster</i> HV		<i>Cluster</i> no HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	17 (18,5%)	39 (22,9%)	26 (28,6%)	27 (19,4%)	0,133
CC	75 (81,5%)	131 (77,1%)	65 (71,4%)	112 (80,6%)	
Total	92 (100%)	170 (100%)	91 (100%)	139 (100%)	
OGG1 rs1052133					p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
GG	12 (11%)	14 (7,5%)	10 (9,4%)	13 (7,9%)	0,725
CC	97 (89%)	173 (92,5%)	96 (90,6%)	151 (92,1%)	
Total	109 (100%)	187 (100%)	106 (100%)	164 (100%)	
CAT rs1001179					p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	17 (13,9%)	22 (10,9%)	24 (20,3%)	15 (9,3%)	0,172
CC	105 (86,1%)	179 (89,1%)	94 (79,7%)	147 (90,7%)	
Total	122 (100%)	201 (100%)	118 (100%)	162 (100%)	
GPX1 rs1050450					p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	30 (33,7%)	29 (17,9%)	22 (22,9%)	40 (25,5%)	0,033*
CC	59 (66,3%)	133 (82,1%)	74 (77,1%)	117 (74,5%)	
Total	89 (100%)	162 (100%)	96 (100%)	157 (100%)	
SOD2 rs4880					p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	37 (48,1%)	76 (48,7%)	34 (46,6%)	66 (52%)	0,584
TT	40 (51,9%)	80 (51,3%)	39 (53,4%)	61 (48%)	
Total	77 (100%)	156 (100%)	73 (100%)	127 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; significancia estadística, del modelo de regresión ajustado por sexo y edad, declarada a $p \leq 0,05$ (*).



4.3.2 ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE REPLICACIÓN

4.3.2.1 Cohorte de cadera de Santiago

El estudio de replicación se realizó en una cohorte de pacientes de artrosis de cadera del Hospital Clínico de Santiago (CHUS) utilizando como controles sanos radiológicos los 348 individuos de la cohorte PROCOAC descrita en el apartado 4.3.

El grupo de artrósicos de la cohorte Santiago estaba formado por 304 muestras, su promedio de edad fue de $68,58 \pm 5,55$ con una edad mínima de 55 y una máxima de 85 años. En cuanto a la distribución por sexos, en el grupo control 217 (62,4%) fueron mujeres y 131 (37,6%) hombres y en el grupo artrósico 185 (60,9%) eran mujeres y 119 (39,1%) hombres, sin detectarse una diferencia estadísticamente significativa en la distribución por sexos (Tabla 35).

Tabla 35. Distribución de la cohorte según el sexo y su condición de sanos o artrósicos en la cohorte de Santiago.

Total	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
	348 (100%)	304 (100%)	652 (100%)		Inferior	Superior	
Hombres	131 (37,6%)	119 (39,1%)	250 (38,3%)	1,066	0,777	1,462	0,694
Mujeres	217 (62,4%)	185 (60,9%)	402 (61,7%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis. OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; Test Chi-cuadrado.

4.3.2.2 Estudio de replicación de la asociación de los haplogrupos mitocondriales con la artrosis de cadera en la cohorte Santiago

En esta cohorte de cadera procedente de Santiago se asignó el haplogrupo a 302 muestras. Al igual que en la cohorte PROCOAC, los análisis se realizaron enfrentando los controles sanos frente a los pacientes y los haplogrupos se agruparon en *clusters* mitocondriales.

Para ello se realizó un estudio de regresión ajustando por la variables de confusión sexo y edad y considerando como *cluster* de referencia el HV, por ser el más frecuente en la población. Los resultados mostraron que la comparación del *cluster* TJ frente al HV bordeó la significancia estadística indicando una tendencia a la protección frente a la enfermedad al comparar estos dos *clusters* (Tabla 36).

Resultados

Tabla 36. Modelo de regresión para analizar el efecto de los *clusters* mitocondriales en el riesgo de artrosis de cadera en la cohorte de Santiago

Variables	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	0,046	0,165	1,047	0,758	1,447	0,780
Edad	-0,03	0,008	0,97	0,955	0,985	<0,001**
<i>Cluster</i>						0,254
KU vs HV	-0,301	0,206	0,74	0,494	1,109	0,144
TJ vs HV	-0,378	0,219	0,685	0,446	1,053	0,084
Otros vs HV	-0,126	0,323	0,882	0,468	1,66	0,696

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

4.3.2.2.1 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA DETOXIFICACIÓN CELULAR EN LA COHORTE SANTIAGO

El análisis se llevó a cabo según los distintos genotipos de los polimorfismos en base a su genotipo dominante, recesivo y homocigoto. En los análisis previos en la cohorte PROCOAC, se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos del gen CAT y GPX1, en los cuales se centró este estudio de replicación. De los análisis realizados se muestran aquellos que resultaron estadísticamente significativos, y en este caso se identificaron asociaciones significativas en el genotipo recesivo del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT y en el genotipo dominante del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 (Tabla 37).

En el polimorfismo **rs1001179** del gen CAT se analizaron 632 muestras del total y las frecuencias de los genotipos fueron 12,3% en el grupo control y 6% en el grupo artrósico para el genotipo TT y para el genotipo CC/CT 87,7% para el grupo control y 9,3% para el grupo artrósico. El análisis de frecuencias de su genotipo recesivo TT mostró una asociación estadísticamente significativa (OR=0,453; I.C. 95%= 0,254 – 0,807; $p=0,006$) con un menor riesgo de desarrollar la enfermedad (Tabla 37).

En el caso del SNP **rs1050450** del gen GPX1 se determinaron 605 muestras del total, siendo las frecuencias de los genotipos para el genotipo CC 40,2% en el grupo control y 48,9% en el grupo artrósico y para el genotipo CT/TT fue de 59,8% en el grupo control y 51,1% en el grupo artrósico. El estudio de asociación resultó ser estadísticamente significativo (OR=1,424; I.C. 95%= 1,031 – 1,968; $p=0,031$) donde el genotipo dominante CC mostró ser un factor de riesgo frente a la artrosis (Tabla 37).

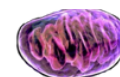


Tabla 37. Distribución de los genotipos para los polimorfismos **rs1001179** del gen CAT y **rs1050450** de GPX1 por condición de sanos o artrósicos en la cohorte de Santiago.

CAT rs1001179	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
TT	41 (12,3%)	18 (6%)	59 (9,3%)	0,453	0,254	0,807	0,006**
CC/CT	291 (87,7%)	282 (94%)	573 (90,7%)				
GPX1 rs1050450	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
CC	133 (40,2%)	134 (48,9%)	267 (44,1%)	1,424	1,031	1,968	0,031*
CT/TT	198 (59,8%)	140 (51,1%)	338 (55,9%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis. OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; (*) Test Chi-cuadrado, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

4.3.2.2.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL MICROSATÉLITE DEL GEN NOS2A EN LA COHORTE DE SANTIAGO

La asociación del microsatélite del gen NOS2A mostró, en los análisis de la cohorte PROCOAC, una asociación significativa con la enfermedad a nivel de la presencia de 11 ó 13 repeticiones en alguno de sus alelos, siendo el alelo de 11 repeticiones un factor de riesgo, y el de 13 de protección. Para determinar la asociación estadística en esta cohorte de cadera se utilizó de nuevo el programa *Clumpp*, especializado en el estudio genético de asociación caso-control.

4.3.2.2.2.1 Estudio del microsatélite del gen NOS2A con el programa Clumpp

Los resultados mostraron que la cohorte de cadera de Santiago no seguía una distribución normal ($p=0,068$, en 609 simulaciones), que no existían diferencias significativas entre los valores esperados ($p=0,071$, en 1048 simulaciones), que una de las repeticiones fue significativa frente al resto ($p=0,027$ en 1787 simulaciones) y que el valor máximo del test Chi-cuadrado para estos datos agrupados fue de $p=0,021$ en 218 simulaciones.

4.3.2.2.2.2 Determinación de las repeticiones implicadas en la enfermedad

Tras el análisis caso-control con el programa *Clumpp* se buscó qué repetición estaba asociada con la enfermedad por medio del test Chi-cuadrado y se estimó el riesgo con la enfermedad. En esta cohorte de cadera se identificaron 10 repeticiones diferentes desde 8 hasta 17 repeticiones por alelo; sin embargo, en el caso de 17 repeticiones no se tuvo en cuenta para los análisis debido a que no presentaba recuentos en uno de los grupos. Se identificaron

Resultados

un total de 41 genotipos distintos; la distribución de frecuencias y el resultado del estudio mediante Chi-cuadrado se muestran en la Tabla 38. De todas las repeticiones analizadas, se identificó una asociación estadísticamente significativa para aquellas muestras que presentaban 13 repeticiones en alguno de sus alelos (OR=0,699; I.C. 95%= 0,504 – 0,969; p=0,032) mostrando un papel protector frente a la enfermedad.

Tabla 38. Distribución de los recuentos de las repeticiones para el microsatélite del gen NOS2A por condición de sanos o artrósicos en la cohorte de Santiago.

NOS2A	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
				OR	Inferior	Superior	p-valor
Total	334 (100%)	303 (100%)	637 (100%)				
8 repeticiones	10 (3%)	13 (4,3%)	23 (3,6%)	1,452	0,627	3,363	0,381
no 8	324 (97%)	290 (95,7%)	614 (96,4%)				
Total	334 (100%)	303 (100%)	637 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
9 repeticiones	49 (14,7%)	43 (14,2%)	92 (14,4%)	0,962	0,618	1,498	0,864
no 9	285 (85,3%)	260 (85,8%)	545 (85,6%)				
Total	334 (100%)	303 (100%)	637 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
10 repeticiones	70 (21%)	80 (26,4%)	150 (23,5%)	1,353	0,937	1,953	0,106
no 10	264 (79%)	223 (73,6%)	487 (76,5%)				
Total	334 (100%)	303 (100%)	637 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
11 repeticiones	90 (26,9%)	96 (31,7%)	186 (29,2%)	1,257	0,893	1,77	0,189
no 11	244 (73,1%)	207 (68,3%)	451 (70,8%)				
Total	334 (100%)	303 (100%)	637 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
12 repeticiones	169 (50,6%)	133 (43,9%)	302 (47,4%)	0,764	0,559	1,044	0,091
no 12	165 (49,4%)	170 (56,1%)	335 (52,6%)				
Total	334 (100%)	303 (100%)	637 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
13 repeticiones	132 (39,5%)	95 (31,4%)	227 (35,6%)	0,699	0,504	0,969	0,032*
no 13	202 (60,5%)	208 (68,6%)	410 (64,4%)				

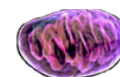


Tabla 38 (continuación). Distribución de los recuentos de las repeticiones para el microsatélite del gen NOS2A por condición de sanos o artrósicos en la cohorte de Santiago.

NOS2A	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
				OR	Inferior	Superior	p-valor
Total	334 (100%)	303 (100%)	637 (100%)				
14 repeticiones	52 (15,6%)	42 (13,9%)	94 (14,8%)	0,873	0,562	1,355	0,544
no 14	282 (84,4%)	261 (86,1%)	543 (85,2%)				
Total	334 (100%)	303 (100%)	637 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
15 repeticiones	23 (6,9%)	24 (7,9%)	47 (7,4%)	1,163	0,642	2,107	0,618
no 15	311 (93,1%)	279 (92,1%)	590 (92,6%)				
Total	334 (100%)	303 (100%)	637 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
16 repeticiones	6 (1,8%)	3 (1%)	9 (1,4%)	0,547	0,136	2,205	0,389
no 16	328 (98,2%)	300 (99%)	628 (98,6%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis. OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; (*) Test Chi-cuadrado, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$.

4.3.2.2.3 Modelos de regresión logística para la cohorte de Santiago

Se realizaron tres modelos de regresión logística. En un primer modelo se tuvieron en cuenta las siguientes variables: sexo, edad, genotipos del polimorfismo **rs100119** de CAT, **rs1050450** de GPX1 y las 13 repeticiones de NOS2A de forma independiente (Tabla 39); los dos modelos siguientes se centraron en explorar qué genotipos del microsatélite de NOS2A eran los que tenían incidencia en la prevalencia de la enfermedad, de modo que en uno de ellos se utilizó como genotipo de referencia el conjunto de genotipos minoritarios de NOS2A, definido como "Otros" (Tabla 40), y en el otro modelo se utilizó como genotipo de referencia el que estaba compuesto por 11 repeticiones en un alelo y 12 repeticiones en el otro (11-12) (Tabla 41).

En el primer análisis de regresión múltiple tras realizar el ajuste por sexo, edad, genotipos del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT y del **rs1050450** del gen GPX1 y el alelo de 13 repeticiones del microsatélite del gen NOS2A, se observó que el genotipo TT del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT aparece como un factor protector frente a la artrosis de cadera de forma significativa al enfrentarlo al genotipo CC (OR=0,424; I.C. 95%= 0,223 – 0,809; $p=0,009$), y en cuanto al polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1, se observó una asociación significativa para su genotipo CC, el cual se asoció con un mayor riesgo de artrosis frente al genotipo TT (OR=1,919; I.C. 95%= 1,085 – 3,401; $p=0,025$) (Tabla 39).

Resultados

Tabla 39. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos de los polimorfismos **rs1001179** de CAT, **rs1050450** de GPX1 y el alelo de 13 repeticiones del microsatélite de NOS2A en la cohorte de Santiago.

Variables	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	-0,009	0,176	0,991	0,702	1,399	0,959
Edad	-0,032	0,009	0,969	0,953	0,985	>0,001**
CAT						0,017*
CAT.CT vs CC	0,13	0,19	1,139	0,784	1,655	0,494
CAT.TT vs CC	-0,857	0,329	0,424	0,223	0,809	0,009**
GPX1						0,077
GPX1.CC vs CT	-0,185	0,181	1,203	0,843	1,715	0,307
GPX1.CC vs TT	-0,653	0,291	1,919	1,085	3,401	0,025*
NOS2A.13 repeticiones	-0,281	0,179	0,755	0,532	1,072	0,116

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

El segundo modelo de regresión múltiple, ajustado por sexo y edad, incluyó también los genotipos del gen CAT en su polimorfismo **rs1001179**, los genotipos del gen GPX1 en su polimorfismo **rs1050450** y los genotipos más frecuentes del microsatélite del gen NOS2A, utilizando como genotipo de referencia el conjunto de genotipos minoritarios "Otros". El análisis mostró nuevamente una asociación estadísticamente significativa para el genotipo TT del polimorfismo **rs1001179** de CAT como factor protector (OR=0,397; I.C. 95%= 0,207 – 0,760; $p=0,005$) y para el polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1, se observó una asociación significativa para su genotipo CC el cual se asoció con un mayor riesgo de artrosis (OR=2,032; I.C. 95%= 1,140 – 3,623; $p=0,016$). Y en el caso de los genotipos del microsatélite del gen NOS2A se observó una asociación significativa en el genotipo 12-13 (OR=0,437; I.C. 95%= 0,247 – 0,771; $p=0,004$) como factor protector cuando se comparó con el grupo "Otros (Tabla 40).

En el tercer modelo de regresión múltiple ajustado por sexo y edad, se incluyeron también los genotipos del gen CAT en su polimorfismo **rs1001179**, los genotipos del gen GPX1 en su polimorfismo **rs1050450** y los genotipos más frecuentes del microsatélite del gen NOS2A, utilizando como genotipo de referencia el genotipo 11-12. Los resultados mostraron nuevamente la asociación significativa a nivel de los genotipos TT y CC de los polimorfismos **rs1001179** de CAT (OR=0,397; I.C. 95%= 0,207 – 0,760; $p=0,005$) y **rs1050450** de GPX1 (OR=2,032; I.C. 95%= 1,140 – 3,623; $p=0,016$) como factores de protección y riesgo respectivamente; además, el genotipo 12-13 apareció como un factor protector de la enfermedad al compararlo con el genotipo 11-12 (OR=0,362; I.C. 95%= 0,167 – 0,784; $p=0,01$) (Tabla 41).

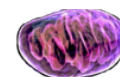


Tabla 40. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos de los polimorfismos **rs1001179** de CAT, **rs1050450** de GPX1 y los genotipos del microsatélite de NOS2A utilizando como grupo de referencia "Otros" en la cohorte de Santiago.

VARIABLES	B	SEM	OR	Inferior	Superior	p-valor
Sexo	0,023	0,178	1,023	0,721	1,451	0,899
Edad	-0,032	0,009	0,968	0,952	0,985	>0,001*
CAT						0,011*
CAT.CT vs CC	0,116	0,193	1,123	0,77	1,637	0,548
CAT.TT vs CC	-0,924	0,331	0,397	0,207	0,760	0,005*
GPX1						0,054
GPX1.CC vs CT	-0,172	0,183	1,188	0,829	1,700	0,348
GPX1.CC vs TT	-0,71	0,295	2,032	1,140	3,623	0,016*
NOS2A						0,038*
11-12 vs Otros	0,187	0,31	1,206	0,657	2,213	0,546
12-13 vs Otros	-0,828	0,29	0,437	0,247	0,771	0,004**
12-12 vs Otros	0,057	0,3	1,058	0,588	1,906	0,85
10-12 vs Otros	-0,623	0,367	0,536	0,261	1,102	0,09
11-13 vs Otros	0,013	0,366	1,013	0,495	2,076	0,971

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

Tabla 41. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos de los polimorfismos **rs1001179** de CAT, **rs1050450** de GPX1 y los genotipos del microsatélite de NOS2A utilizando como grupo de referencia el genotipo "11-12" en la cohorte de Santiago.

VARIABLES	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	0,023	0,178	1,023	0,721	1,451	0,899
Edad	-0,032	0,009	0,968	0,952	0,985	>0,001**
CAT						0,011*
CAT.CT vs CC	0,116	0,193	1,123	0,770	1,637	0,548
CAT.TT vs CC	-0,924	0,331	0,397	0,207	0,760	0,005**
GPX1						0,054
GPX1.CC vs CT	-0,172	0,183	1,188	0,829	1,700	0,348
GPX1.CC vs TT	-0,71	0,295	2,032	1,140	3,623	0,016*
NOS2A						0,038*
12-13 vs 11-12	-1,016	0,394	0,362	0,167	0,784	0,010**
12-12 vs 11-12	-0,131	0,40	0,878	0,401	1,921	0,744
10-12 vs 11-12	-0,81	0,454	0,445	0,183	1,083	0,075
11-13 vs 11-12	-0,174	0,453	0,84	0,346	2,042	0,701
Otros vs 11-12	-0,187	0,310	0,829	0,452	1,522	0,546

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**).

4.3.2.3 Estudio de asociación de las interacciones entre los clusters

mitocondriales y los polimorfismos nucleares analizados en la cohorte de Santiago

El análisis de las interacciones se realizó teniendo en cuenta el *cluster* TJ y el *cluster* más común HV. Para este estudio se realizaron diferentes modelos de regresión ajustando por sexo y edad. En el análisis de interacción se tuvo en cuenta el carácter dominante, recesivo y homocigoto del polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1 (asociado de manera significativa en la cohorte PROCOAC) así como del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT.

4.3.2.3.1 INTERACCIONES ENTRE LOS CLUSTERS MITOCONDRIALES Y LOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO **rs1050450** DEL GEN GPX1 Y **rs1001179** DEL GEN CAT EN SU FORMA DOMINANTE

Los resultados de los análisis de interacción de los SNPs con el *cluster* TJ se muestran en la Tabla 42 y para el *cluster* HV en la Tabla 43. El modelo de regresión ajustado por sexo y edad entre el genotipo dominante de los polimorfismos de CAT y GPX1 y los *clusters* mitocondriales reveló una interacción estadísticamente significativa entre el genotipo del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 y el *cluster* mitocondrial TJ ($p=0,030$), de modo que el genotipo CC combinado con el *cluster* TJ tenía un comportamiento protector, mientras que el genotipo CC combinado con otro *cluster* que no sea el TJ presentaba un comportamiento de riesgo (OR=0,387; I.C. 95%= 0,198 – 0,756; $p=0,005$) (Figura 37). Para el caso del *cluster* HV no se observaron interacciones significativas con el polimorfismo **rs1001179** del gen CAT aunque el genotipo dominante del polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1 bordeó la significancia estadística ($p=0,072$), sugiriendo un comportamiento antagónico al mostrado en la combinación con el *cluster* TJ (Tabla 42).

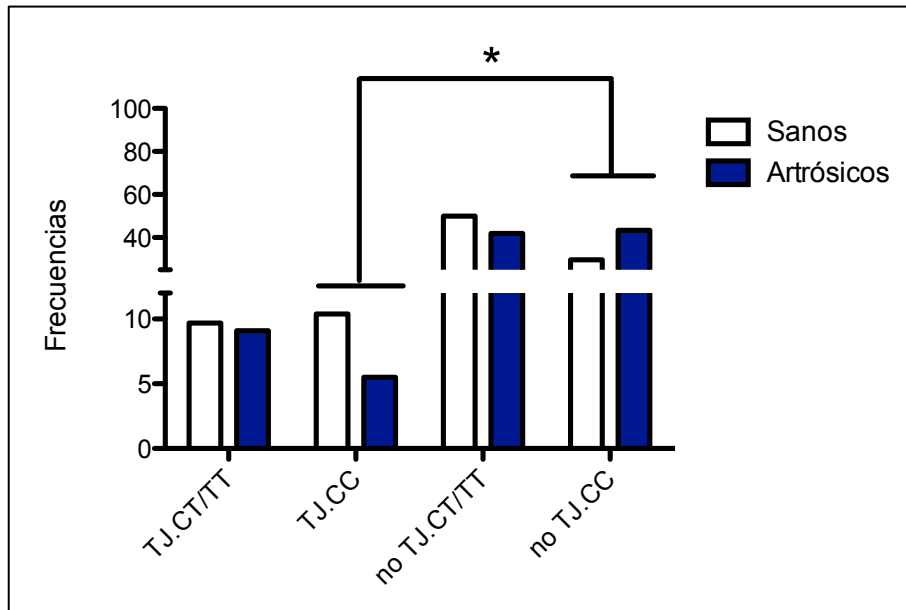
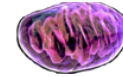


Figura 37. Representación gráfica de las frecuencias de los genotipos del polimorfismo rs1050450 de GPX1 en su forma dominante y su interacción con el *cluster* TJ estratificado por su condición de sano o artrósico. Los valores representados se corresponden con los porcentajes, siendo el 100% el total de individuos (sanos o artrósicos) independientemente del *cluster* en la cohorte Santiago. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

Tabla 42. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismo rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el *cluster* TJ ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.

CAT rs1001179	Cluster TJ		Cluster no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	36 (53,7%)	33 (68,7%)	163 (61,5%)	156 (61,9%)	0,178
CT/TT	31 (46,3%)	15 (31,3%)	102 (38,5%)	96 (38,1%)	
Total	67 (100%)	48 (100%)	265 (100%)	252 (100%)	

GPX1 rs1050450	Cluster TJ		Cluster no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	35 (52,2%)	15 (37,5%)	98 (37,3%)	119 (50,9%)	0,03*
CT/TT	32 (47,8%)	25 (62,5%)	165 (62,7%)	115 (49,1%)	
Total	67 (100%)	40 (100%)	263 (100%)	234 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

Resultados

Tabla 43. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el *cluster* HV ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.

CAT rs1001179	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	105 (61,4%)	110 (63,2%)	94 (58,4%)	79 (62,7%)	0,675
CT/TT	66 (38,6%)	64 (36,8%)	67 (41,6%)	47 (37,3%)	
Total	171 (100%)	174 (100%)	161 (100%)	86 (100%)	

GPX1 rs1050450	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	59 (35,3%)	82 (51,6%)	74 (45,4%)	52 (45,2%)	0,072
CT/TT	108 (64,7%)	77 (48,4%)	89 (54,6%)	63 (54,8%)	
Total	167 (100%)	159 (100%)	163 (100%)	115 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.

4.3.2.3.2 INTERACCIONES ENTRE LOS CLUSTERS MITOCONDRIALES Y LOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO **rs1050450** DEL GEN *GPX1* Y **rs1001179** DEL GEN *CAT* EN SU FORMA RECESIVA

Los resultados del estudio de la interacción de los SNPs con el *cluster* TJ se muestran en la Tabla 44 y para el caso del *cluster* HV en la Tabla 45. El modelo de regresión ajustado por sexo y edad entre el genotipo recesivo de los polimorfismos de CAT y GPX1 y los *clusters* mitocondriales no reveló ninguna interacción estadísticamente significativa.

Tabla 44. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos rs1001179 del gen CAT y rs1050450 del gen GPX1 con el *cluster* TJ ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.

CAT rs1001179	Cluster TJ		Cluster no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	10 (14,9%)	4 (8,3%)	31 (11,7%)	14 (5,6%)	0,793
CC/CT	57 (85,1%)	44 (91,7%)	234 (88,3%)	238 (94,4%)	
Total	67 (100%)	48 (100%)	265 (100%)	252 (100%)	

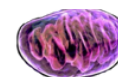


Tabla 44. (continuación) Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismo **rs1001179** del gen CAT y **rs1050450** del gen GPX1 con el *cluster* TJ ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.

GPX1 rs1050450	<i>Cluster</i> TJ		<i>Cluster</i> no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	5 (7,5%)	3 (7,5%)	47 (17,9%)	20 (8,5%)	0,423
CC/CT	62 (92,5)	37 (92,5%)	216 (82,1%)	214 (91,5%)	
Total	67 (100%)	40 (100%)	263 (100%)	234 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.

Tabla 45. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismo **rs1001179** del gen CAT y **rs1050450** del gen GPX1 con el *cluster* HV ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.

CAT rs1001179	<i>Cluster</i> HV		<i>Cluster</i> no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	17 (9,9%)	7 (4%)	24 (14,9%)	11 (8,7%)	0,566
CC/CT	154 (90,1%)	167 (96%)	137 (85,1%)	115 (91,3%)	
Total	171 (100%)	174 (100%)	161 (100%)	126 (100%)	

GPX1 rs1050450	<i>Cluster</i> HV		<i>Cluster</i> no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	30 (18%)	13 (8,2%)	22 (13,5%)	10 (8,7%)	0,438
CC/CT	137 (82%)	146 (91,8%)	141 (86,5%)	105 (91,3%)	
Total	167 (100%)	159 (100%)	163 (100%)	115 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.

4.3.2.3.3 INTERACCIONES ENTRE LOS CLUSTERS MITOCONDRIALES Y LOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO **RS1050450** DEL GEN **GPX1** Y **RS1001179** DEL GEN **CAT** EN SU FORMA HOMOCIGOTA

Los resultados del estudio de la interacción de los SNPs con el *cluster* TJ se muestran en la Tabla 46 y para el caso del *cluster* HV en la Tabla 47. El modelo de regresión ajustado por sexo y edad entre el genotipo homocigoto de los polimorfismos de CAT y GPX1 y los *clusters* mitocondriales no reveló ninguna interacción estadísticamente significativa.

Resultados

Tabla 46. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismo **rs1001179** del gen CAT y **rs1050450** del gen GPX1 con el *cluster* TJ ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.

CAT rs1001179	<i>Cluster</i> TJ		<i>Cluster</i> no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	10 (21,7%)	4 (10,8%)	31 (16%)	15 (8,8%)	0,914
CC	36 (78,3%)	33 (89,2%)	163 (84%)	156 (91,2%)	
Total	46 (100%)	37 (100%)	194 (100%)	171 (100%)	

GPX1 rs1050450	<i>Cluster</i> TJ		<i>Cluster</i> no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	5 (12,5%)	3 (16,7%)	47 (32,4%)	20 (14,4%)	0,181
CC	35 (87,5%)	15 (83,3%)	98 (67,6%)	119 (85,6%)	
Total	38 (100%)	18 (100%)	145 (100%)	139 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.

Tabla 47. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismo **rs1001179** del gen CAT y **rs1050450** del gen GPX1 con el *cluster* TJ ajustado, por sexo y edad en la cohorte de Santiago.

CAT rs1001179	<i>Cluster</i> HV		<i>Cluster</i> no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	17 (13,9%)	7 (6%)	24 (20,3%)	12 (13,2%)	0,533
CC	105 (86,1%)	110 (94%)	94 (79,7%)	79 (86,8%)	
Total	122 (100%)	117 (100%)	118 (100%)	91 (100%)	

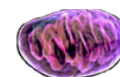
GPX1 rs1050450	<i>Cluster</i> HV		<i>Cluster</i> no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	30 (33,7%)	13 (13,7%)	22 (22,9%)	10 (16,1%)	0,216
CC	59 (66,3%)	82 (86,3%)	74 (77,1%)	52 (83,9%)	
Total	89 (100%)	95 (100%)	96 (100%)	62 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.

4.3.2.4 Cohorte de rodilla del OAI

La cohorte seleccionada a partir de las muestras del OAI está formada por 942 muestras, de las cuales 460 pertenecen a controles sanos radiológicos de rodilla y 482 a pacientes con artrosis de rodilla diagnosticados con grado KL mayor o igual a III.

La media de edad de esta cohorte es de $64,04 \pm 8,56$ años con una edad mínima de 45 años y una máxima de 79 años. Dentro del grupo control la media de edad fue de $71,89 \pm 13,37$, y en el grupo de pacientes artrósicos, el



promedio fue de $69,48 \pm 10,53$. En cuanto a su distribución por sexos, la cohorte está formada por 298 (64,8%) de mujeres y 162 (35,2%) hombres en el grupo control y en el grupo artrósico 269 (55,58%) fueron mujeres y 213 (44,2%) hombres, habiendo una mayor representación significativa de hombres en el grupo de casos (OR=1,455; I.C. 95%= 1,119 – 1,893; $p=0,005$) (Tabla 48).

Tabla 48. Distribución por sexos y diagnóstico de la cohorte de rodilla en la cohorte del OAI.

	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
Total	460 (100%)	482 (100%)	942 (100%)				
Hombres	162 (35,2%)	213 (44,2%)	375 (39,8%)	1,455	1,119	1,893	0,005*
Mujeres	298 (64,8%)	269 (55,58%)	567 (60,2%)				

OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; Test Chi-cuadrado, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

4.3.2.4.1 ESTUDIO DE REPLICACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES CON LA ARTROSIS DE RODILLA EN LA COHORTE DEL OAI

Se realizó un análisis de regresión logística para analizar la influencia de los *clusters* mitocondriales en el riesgo de artrosis de rodilla, considerando como variables de confusión el sexo, la edad y el IMC. Los resultados obtenidos mostraron una mayor frecuencia del *cluster* mitocondrial TJ en el grupo de controles, bordeando la significación estadística (OR=0,707; I.C. 95%= 0,480 – 1,041; $p=0,079$) (Tabla 49).

Tabla 49. Modelo de regresión para analizar el efecto de los *clusters* mitocondriales en el riesgo de artrosis de rodilla en la cohorte del OAI

Variables	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	-0,1	0,150	0,905	0,675	1,214	0,506
Edad	0,026	0,009	1,027	1,010	1,044	0,002**
IMC	0,216	0,018	1,241	1,197	1,286	<0,001**
<i>Cluster</i>						0,226
KU vs HV	-0,297	0,183	0,743	0,519	1,063	0,104
TJ vs HV	-0,347	0,198	0,707	0,480	1,041	0,079
Otros vs HV	-0,165	0,257	0,848	0,513	1,402	0,520

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; IMC: índice de masa corporal; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*) $p < 0,01$ **.

4.3.2.4.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS **rs1001179** DEL GEN *CAT* Y **rs1050450** DEL GEN *GPX1* EN LA COHORTE DEL OAI

El análisis se llevó a cabo según los distintos genotipos de los polimorfismos **rs1001179** del gen *CAT* y **rs1050450** del gen *GPX1* en base a su estatus dominante, recesivo y homocigoto. En los análisis previos, el genotipo recesivo TT del polimorfismo **rs1001179** del gen *CAT* se asociaba con un menor riesgo de artrosis de cadera en la cohorte PROCOAC y en la de Santiago, y para el polimorfismo **rs1050450** del gen *GPX1*, el genotipo dominante CC se asociaba con un mayor riesgo artrosis de cadera en la cohorte de Santiago.

El estudio de asociación del polimorfismo **rs1001179** del gen *CAT*, muestra que, a pesar de aparecer más representado el genotipo TT en el grupo de sanos, ningún genotipo se asoció de forma significativa con el riesgo de padecer la enfermedad. De los análisis realizados se muestran los referentes al genotipo recesivo, hallado previamente asociado de manera significativa con la enfermedad (Tabla 50).

En cuanto al análisis de la asociación para el polimorfismo **rs1050450** del gen *GPX1*, se observa que ninguno de estos genotipos se asociaron de forma significativa con el riesgo de padecer la enfermedad. En este caso, se muestran los análisis referentes al genotipo dominante (Tabla 50).

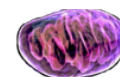
Tabla 50. Distribución de los genotipos recesivo del polimorfismo **rs1001179** del gen *CAT* y genotipo dominante del polimorfismo **rs1050450** de *GPX1* por condición de sanos o artrósicos del OAI.

CAT rs1001179	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
TT	23 (5,1%)	15 (3,3%)	38 (4,2%)	0,629	0,324	1,221	0,167
CC/CT	426 (94,9%)	442 (96,7%)	868 (95,8%)				
GPX1 rs1050450	Sanos	Artrósicos	Total	OR	I.C. 95%		p-valor
					Inferior	Superior	
CC	203 (45,2%)	206 (45,1%)	409 (45,1%)	0,995	0,765	1,291	0,967
CT/TT	246 (54,8%)	251(54,9%)	497 (54,9%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; Test Chi-cuadrado.

4.3.2.4.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DEL MICROSATÉLITE DEL GEN *NOS2A* EN LA COHORTE DEL OAI

Se realizó el estudio de asociación para el microsatélite del gen *NOS2A*, donde se observó que la presencia de 11 ó 13 repeticiones en alguno de los alelos de este microsatélite se asociaban con un mayor o menor riesgo de artrosis de



cadena en la cohorte PROCOAC y en la cohorte de Santiago. Para determinar la asociación estadística en esta cohorte de rodilla se utilizó de nuevo el programa *Clumpp*.

4.3.2.4.3.1 Estudio del microsatélite del gen *NOS2A* con el programa *Clumpp* en la cohorte del OAI

El análisis de la asociación con el programa *Clumpp* mostró que nuestra cohorte no seguía una distribución normal ($p=0,157$, en 1310 simulaciones), que no existían diferencias significativas entre los valores esperados ($p=0,422$, en 4222 simulaciones), que una de las repeticiones bordeó la significancia estadística ($p=0,059$ en 4270 simulaciones) y que el valor máximo de estos datos agrupados fue de $p=0,192$ en 1922 simulaciones.

4.3.2.4.3.2 Determinación de las repeticiones implicadas en la enfermedad

La distribución de frecuencias y el resultado del estudio mediante Chi-cuadrado se muestran en la Tabla 51. Esta cohorte presenta 12 alelos diferentes y un total de 47 genotipos distintos, desde 8 repeticiones por alelo hasta 17 repeticiones, en el caso de este último alelo no se tuvo en cuenta para los análisis ya que en uno de los grupos no se observaron recuentos; de todas las repeticiones analizadas no se observaron diferencias significativas en ninguna de las repeticiones (Tabla 51).

Tabla 51. Distribución de los recuentos de las repeticiones para el microsatélite del gen *NOS2A* por condición de sanos o artrósicos en la cohorte del OAI.

NOS2A	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
				OR	Inferior	Superior	p-valor
Total	438 (100%)	454 (100%)	892 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
8 repeticiones	11 (2,5%)	5 (1,1%)	16 (1,8%)	0,432	0,149	1,254	0,113
no 8	427 (97,5%)	449 (98,9%)	876 (98,2%)				
Total	438 (100%)	454 (100%)	892 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
9 repeticiones	33 (7,5%)	23 (5,1%)	56 (6,3%)	0,132	0,378	1,134	0,129
no 9	405 (92,5%)	431 (94,9%)	836 (93,7%)				
Total	438 (100%)	454 (100%)	892 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
10 repeticiones	117 (26,7%)	110 (24,2%)	227 (25,4%)	0,877	0,649	1,186	0,395
no 10	321 (73,3%)	344 (75,8%)	665 (74,6%)				
Total	438 (100%)	454 (100%)	892 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
11 repeticiones	150 (34,2%)	169 (37,2%)	319 (35,8%)	1,139	0,866	1,498	0,354
no 11	288 (65,8%)	285 (62,8%)	573 (64,2%)				

Resultados

Tabla 51 (continuación). Distribución de los recuentos de las repeticiones para el microsatélite del gen NOS2A por condición de sanos o artrósicos en la cohorte del OAI.

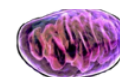
NOS2A	Sanos	Artrósicos	Total	I.C. 95%			
				OR	Inferior	Superior	p-valor
Total	438 (100%)	454 (100%)	892 (100%)				
12 repeticiones	230 (52,5%)	253 (55,7%)	483 (54,1%)	1,138	0,875	1,482	0,335
no 12	208 (47,5%)	201 (44,3%)	409 (45,9%)				
Total	438 (100%)	454 (100%)	892 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
13 repeticiones	147 (33,6%)	144 (31,7%)	291 (32,6%)	0,92	0,695	1,217	0,557
no 13	291 (66,4%)	310 (68,3%)	601 (67,4%)				
Total	438 (100%)	454 (100%)	892 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
14 repeticiones	72 (16,4%)	66 (14,5%)	138 (15,5%)	0,865	0,601	1,243	0,433
no 14	366 (83,6%)	388 (85,5%)	754 (84,5%)				
Total	438 (100%)	454 (100%)	892 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
15 repeticiones	27 (6,2%)	28 (6,2%)	55 (6,2%)	1,001	0,58	1,727	0,999
no 15	411 (93,8%)	426 (93,8%)	837 (93,8%)				
Total	438 (100%)	454 (100%)	892 (100%)	OR	Inferior	Superior	p-valor
16 repeticiones	11(2,5%)	4 (0,9%)	15 (1,7%)	0,345	0,109	1,092	0,058
no 16	427 (97,5%)	450 (99,1%)	877 (98,3%)				

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; Test Chi-cuadrado.

4.3.2.4.3.3 Modelos de regresión logística para la cohorte del OAI

Al igual que en los análisis previos, se realizaron dos modelos de regresión logística centrados en explorar si alguno de los genotipos del microsatélite de NOS2A tenían incidencia en la prevalencia de la artrosis de rodilla. En estos modelos se tuvieron en cuenta las siguientes variables de confusión: sexo, edad, IMC y genotipos del microsatélite de NOS2A. En uno de los modelos se utilizó como genotipo de referencia el conjunto de genotipos minoritarios de NOS2A, definido como "Otros" (Tabla 52), y en el otro modelo se utilizó como genotipo de referencia el que estaba compuesto por 11 repeticiones en un alelo y 12 repeticiones en el otro (11-12) (Tabla 53).

El primer modelo de regresión múltiple se calculó ajustado por sexo, edad, IMC y los genotipos más frecuentes del microsatélite del gen NOS2A, utilizando como genotipo de referencia el conjunto de genotipos minoritarios "Otros". El análisis mostró una asociación estadísticamente significativa para el IMC (OR=1,242; I.C. 95%= 1,197 – 1,290; p<0,001) asociándose con un mayor riesgo de artrosis. En el caso del microsatélite del gen NOS2A se



observó que el genotipo 11-12 se comporta como un factor de riesgo al compararlo con el grupo de referencia “Otros” (OR=1,610; I.C. 95%= 1,014 – 2,556; p=0,044) (Tabla 52).

Tabla 52. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos del microsatélite de NOS2A utilizando como grupo de referencia “Otros” en la cohorte del OAI.

Variables	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	-0,161	0,155	0,851	0,629	1,152	0,297
Edad	0,029	0,009	1,030	1,012	1,048	0,001**
IMC	0,217	0,019	1,242	1,197	1,290	<0,001**
NOS2A						0,128
11-12 vs Otros	0,476	0,236	1,610	1,014	2,556	0,044*
12-13 vs Otros	-0,162	0,238	0,851	0,534	1,356	0,497
12-12 vs Otros	0,473	0,262	1,605	0,960	2,685	0,071
10-12 vs Otros	0,262	0,268	1,299	0,768	2,197	0,330
11-13 vs Otros	-0,047	0,320	0,954	0,510	1,785	0,883

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; IMC: índice de masa corporal; significancia estadística declarada a p≤0,05 (*), p≤0,01 (**).

El segundo modelo de regresión múltiple ajustado por sexo, edad, IMC y los genotipos más frecuentes del microsatélite del gen NOS2A, utilizando como genotipo de referencia el genotipo 11-12, reveló que el genotipo 12-13 era un factor protector frente a la enfermedad si se comparaba con el genotipo 11-12 (OR=0,529; I.C. 95%= 0,294 – 0,951; p=0,033). En este modelo, el IMC resultó de nuevo ser también un factor de riesgo de la enfermedad (OR=1,242; I.C. 95%= 1,197 – 1,290; p<0,001) (Tabla 53).

Tabla 53. Modelo de regresión en el que se analiza el efecto los genotipos del microsatélite de NOS2A utilizando como grupo de referencia el genotipo 11-12 en la cohorte del OAI

Variables	B	SEM	OR	I.C. 95%		p-valor
				Inferior	Superior	
Sexo	-0,161	0,155	0,851	0,629	1,152	0,297
Edad	0,029	0,009	1,030	1,012	1,048	0,001**
IMC	0,217	0,019	1,242	1,197	1,290	<0,001**
NOS2A						0,128
12-13 vs 11-12	-0,638	0,3	0,529	0,294	0,951	0,033*
12-12 vs 11-12	-0,003	0,318	0,997	0,535	1,860	0,993
10-12 vs 11-12	-0,214	0,323	0,807	0,428	1,520	0,507
11-13 vs 11-12	-0,523	0,368	0,593	0,288	1,218	0,155
Otros vs 11-12	-0,476	0,236	0,621	0,391	0,987	0,044*

B: Coeficiente de Regresión; SEM: error estándar de la media; OR: Odd Ratio; I.C.: Intervalo de Confianza; IMC: índice de masa corporal; significancia estadística declarada a p≤0,05 (*), p≤0,01 (**).

4.3.2.4.4 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS CLUSTERS MITOCONDRIALES DE LOS POLIMORFISMOS **rs1001179** DEL GEN *CAT* Y **rs1050450** DEL GEN *GPX1* EN LA COHORTE DEL OAI

Se realizó el análisis del polimorfismo **rs1001179** del gen *CAT*, cuyo genotipo recesivo TT se asociaba con un menor riesgo de artrosis de cadera en la cohorte PROCOAC y en la cohorte de Santiago, y también del polimorfismo **rs1050450** del gen *GPX1*, cuyo genotipo dominante CC mostraba un comportamiento diferente según se combinase con el *cluster* TJ o con el *cluster* HV en las cohortes de cadera PROCOAC y Santiago.

4.3.2.4.4.1 Interacciones entre los clusters mitocondriales y los genotipos del polimorfismo **rs1050450** del gen *GPX1* y **rs1001179** del gen *CAT* en su forma dominante

Los resultados de los análisis de interacción de los SNPs con el *cluster* TJ se muestran en la Tabla 54 y para el caso del *cluster* HV en la Tabla 55. El estudio de la interacción entre el genotipo dominante y los *clusters* mitocondriales TJ y HV reveló sendas interacciones significativas para el polimorfismo **rs1001179** del gen *CAT* ($p=0,025$ y $p=0,032$ respectivamente) (Tabla 35 y Tabla 36), de modo que la combinación del genotipo CT/TT con el *cluster* TJ mostró un comportamiento protector (OR=0,498; I.C. 95%= 0,252 – 0,985; $p=0,045$) (Figura 38), mientras que la combinación del mismo genotipo CT/TT, pero con el *cluster* HV, mostró un comportamiento de riesgo (OR=1,967; I.C. 95%= 1,258 – 3,075, $p=0,003$) (Figura 39). Por el contrario, no se detectaron interacciones significativas a nivel del genotipo dominante del polimorfismo **rs1050450** de *GPX1*.

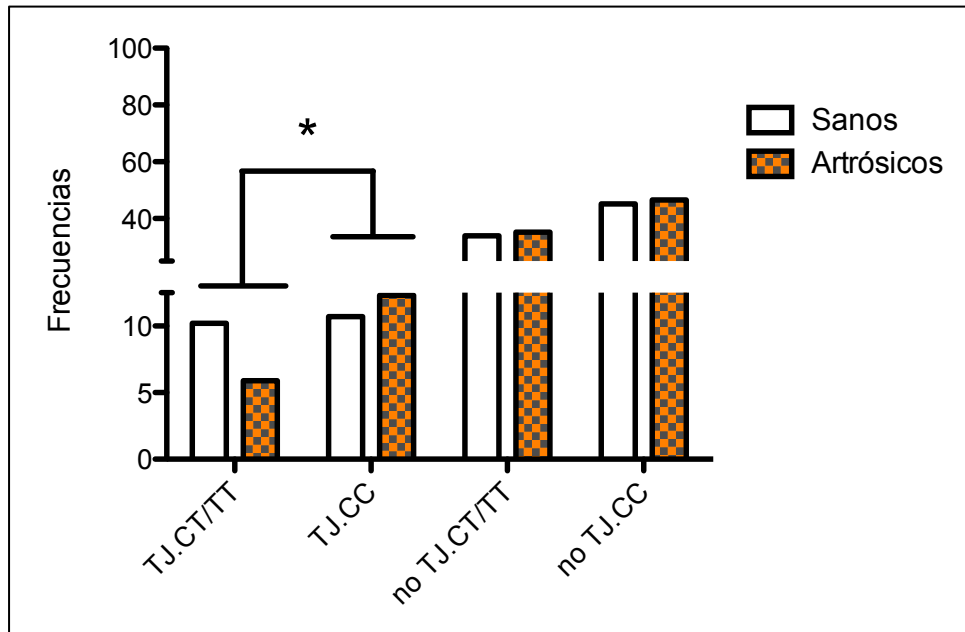
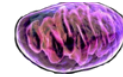


Figura 38. Representación gráfica de las frecuencias de los genotipos del polimorfismo **rs1001179** de CAT en su forma dominante y su interacción con el *cluster* TJ estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte del OAI. Los valores representados se corresponden con los porcentajes, siendo el 100% el total de individuos (sanos o artrósicos) independientemente del *cluster*. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

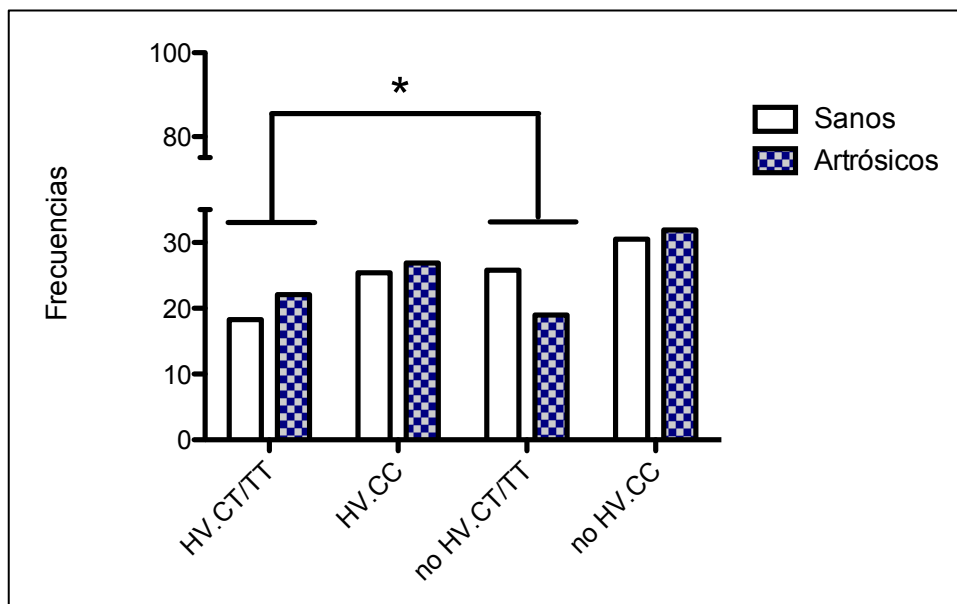


Figura 39. Representación gráfica de las frecuencias de los genotipos del polimorfismo **rs1001179** de CAT en su forma dominante y su interacción con el *cluster* HV estratificado por su condición de sano o artrósico en la cohorte del OAI. Los valores representados se corresponden con los porcentajes, siendo el 100% el total de individuos (sanos o artrósicos) independientemente del *cluster*. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

Resultados

Tabla 54. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos **rs1001179** del gen CAT y **rs1050450** del gen GPX1 con el *cluster* TJ ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.

CAT rs1001179	<i>Cluster</i> TJ		<i>Cluster</i> no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	48 (51,1%)	56 (67,5%)	203 (57,2%)	213 (57%)	0,025*
CT/TT	46 (48,9%)	27 (32,5%)	152 (42,8%)	161 (43%)	
Total	94 (100%)	83 (100%)	355 (100%)	374 (100%)	

GPX1 rs1050450	<i>Cluster</i> TJ		<i>Cluster</i> no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	42 (44,7%)	43 (51,8%)	161 (45,4%)	163 (43,6%)	0,411
CT/TT	52 (55,3%)	40 (48,2%)	194 (54,6%)	211 (56,4%)	
Total	94 (100%)	83 (100%)	355 (100%)	374 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

Tabla 55. Interacción de los genotipos dominantes de los polimorfismos **rs1001179** del gen CAT y **rs1050450** del gen GPX1 con el *cluster* HV ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.

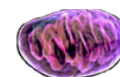
CAT rs1001179	<i>Cluster</i> HV		<i>Cluster</i> no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	114 (58,2%)	123 (54,9 %)	137 (54,2%)	146 (62,7%)	0,032*
CT/TT	82 (41,8%)	101 (45,1%)	116 (45,8%)	87 (37,3%)	
Total	196 (100%)	224 (100%)	253 (100%)	233 (100%)	

GPX1 rs1050450	<i>Cluster</i> HV		<i>Cluster</i> no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
CC	95 (48,5%)	97 (43,3%)	108 (42,7%)	109 (46,8%)	0,319
CT/TT	101 (51,5%)	127 (56,7%)	145 (57,3%)	124 (53,2%)	
Total	196 (100%)	224 (100%)	253 (100%)	233 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis. Significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

4.3.2.4.4.2 Interacciones entre los clusters mitocondriales y los genotipos de los polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1 y **rs1001179** del gen CAT en su forma recesiva

Los resultados de los análisis de interacción de los SNPs con el *cluster* TJ se muestran en la Tabla 56 y para el caso del *cluster* HV en la Tabla 57. El estudio de la interacción entre el genotipo recesivo de los polimorfismos **rs1050450**



del gen GPX1 y **rs1001179** del gen CAT y los *clusters* mitocondriales TJ y HV, no mostró ninguna asociación estadísticamente significativa (Tabla 56 y Tabla 57).

Tabla 56. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos **rs1001179** del gen CAT y **rs1050450** del gen GPX1 con el *cluster* TJ ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.

CAT rs1001179	Cluster TJ		Cluster no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	7 (7,4%)	4 (4,8%)	16 (4,5%)	11 (2,9%)	0,503
CC/CT	87 (92,6%)	79 (95,2%)	339 (95,5%)	363 (97,1%)	
Total	94 (100%)	83 (100%)	355 (100%)	374 (100%)	

GPX1 rs1050450	Cluster TJ		Cluster no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	11 (11,7%)	8 (9,6%)	37 (10,4%)	39 (10,4%)	0,590
CC/CT	83 (88,3%)	75 (90,4%)	318 (89,6%)	335 (89,6%)	
Total	94 (100%)	83 (100%)	355 (100%)	374 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.

Tabla 57. Interacción de los genotipos recesivos de los polimorfismos **rs1001179** del gen CAT y **rs1050450** del gen GPX1 con el *cluster* HV ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.

CAT rs1001179	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	9 (4,6%)	5 (2,2%)	14 (5,5%)	10 (4,3%)	0,625
CC/CT	187 (95,4%)	219 (97,8%)	239 (94,5%)	223 (95,7%)	
Total	196 (100%)	224 (100%)	253 (100%)	233 (100%)	

GPX1 rs1050450	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	19 (9,7%)	25 (11,2%)	29 (11,5%)	22 (9,4%)	0,466
CC/CT	177 (90,3%)	199 (88,8%)	224 (88,5%)	211 (90,6%)	
Total	196 (100%)	224 (100%)	253 (100%)	233 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.

Resultados

4.3.2.4.4.3 Interacciones entre los clusters mitocondriales y los genotipos de los polimorfismos **rs1050450** del gen *GPX1* y **rs1001179** del gen *CAT* en su forma homocigota

Los resultados del estudio de la interacción de los SNPs con el *cluster* TJ se muestran en la Tabla 58 y para el *cluster* HV en la Tabla 59. El estudio de la interacción entre el genotipo homocigoto de los polimorfismos **rs1050450** del gen *GPX1* y **rs1001179** del gen *CAT* y los *clusters* mitocondriales TJ y HV, no resultó en ninguna asociación estadísticamente significativa.

Tabla 58. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismos **rs1050450** del gen *GPX1* y **rs1001179** del gen *CAT* con el *cluster* TJ ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.

CAT rs1001179	Cluster TJ		Cluster no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	7 (12,7%)	4 (6,7%)	16 (7,3%)	11 (4,9%)	0,791
CC	48 (87,3%)	56 (93,3%)	203 (92,7%)	213 (95,1%)	
Total	55 (100%)	60 (100%)	219 (100%)	224 (100%)	

GPX1 rs1050450	Cluster TJ		Cluster no-TJ		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	11 (20,8%)	8 (15,7%)	37 (18,7%)	39 (19,3%)	0,459
CC	42 (79,2%)	43 (84,3%)	161 (81,3%)	163 (80,7%)	
Total	53 (100%)	51 (100%)	198 (100%)	202 (100%)	

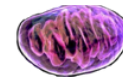
Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.

Tabla 59. Interacción de los genotipos homocigotos de los polimorfismos **rs1001179** del gen *CAT* y **rs1050450** del gen *GPX1* con el *cluster* HV ajustado, por sexo, edad e IMC en la cohorte del OAI.

CAT rs1001179	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	9 (7,3%)	5 (3,9%)	137 (90,7%)	146 (93,6%)	0,869
CC	114 (92,7%)	123 (96,1%)	14 (9,3%)	10 (6,4%)	
Total	151 (100%)	156 (100%)	123 (100%)	128 (100%)	

GPX1 rs1050450	Cluster HV		Cluster no-HV		p-valor de la interacción
	Sanos	Artrósicos	Sanos	Artrósicos	
TT	19 (16,7%)	25 (20,5%)	29 (21,2%)	22 (16,8%)	0,333
CC	95 (83,3%)	97 (79,5%)	108 (78,8%)	109 (83,2%)	
Total	114 (100%)	122 (100%)	137 (100%)	131 (100%)	

Los valores indicados se corresponden con el número de pacientes con los porcentajes entre paréntesis.



4.3.3 ESTUDIO FUNCIONAL EN LA COHORTE PROCOAC. PRODUCCIÓN DE ROS

De todas las muestras pertenecientes a la cohorte PROCOAC, se llevó a cabo un cultivo celular de condrocitos a partir de explantes de cartílago de 52 individuos; este grupo de sujetos tenía una media de edad de $76,37 \pm 12,67$ años, con una edad mínima de 40 y una máxima de 99 años. El grupo de pacientes estaba formado por 16 muestras y su promedio de edad fue de $66,88 \pm 11,45$, con un mínimo de 40 y un máximo de 81 años. El grupo de controles sanos estaba formado por 36 individuos, con una edad media de $80,58 \pm 10,88$ años, y una edad mínima de 48 y una máxima de 99 años.

El análisis en esta cohorte muestra que la producción de ROS totales en el cultivo de condrocitos en medio con glucosa obtuvo un promedio de $30,69 \pm 45,23$ de intensidad de fluorescencia (IF), con un mínimo de 2,17 IF y un máximo de 268,96 IF; mientras que para el cultivo en medio con galactosa se obtuvo una media de $17,183 \pm 16,65$ IF con un mínimo de 2,64 IF y un máximo de 77,74 IF. Estas diferencias en la producción de ROS entre los dos medios resultaron ser estadísticamente significativas ($p=0,01$) (Figura 40).

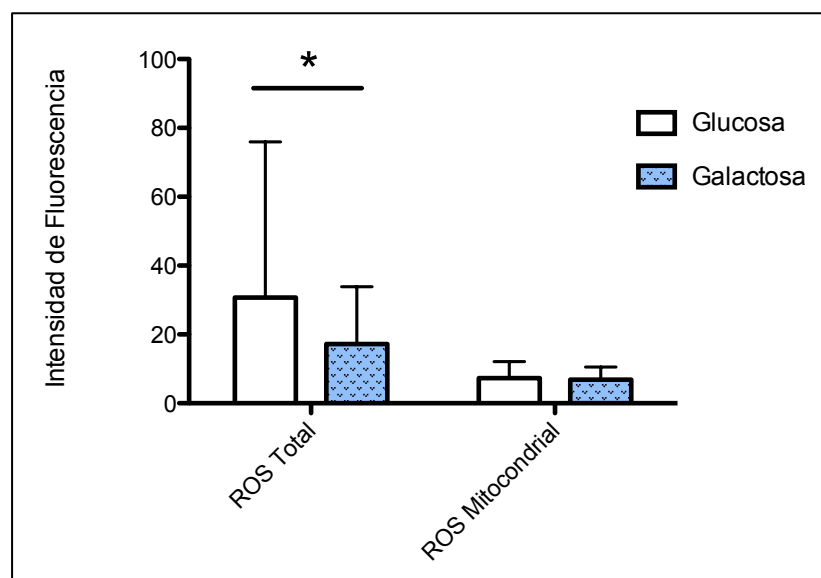


Figura 40. Representación de los valores promedio de producción de ROS totales y mitocondriales según su cultivo en medio con glucosa o galactosa. T de Student, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

En cuanto a la producción de ROS mitocondriales el promedio para la población estudiada en el cultivo en medio con glucosa fue de $7,29 \pm 4,8$ IF con un mínimo de 1,46 IF y un máximo de 25,95 IF, mientras que el cultivo en

Resultados

medio con galactosa resultó en un valor medio de $6,86 \pm 3,68$ IF con una producción mínima de 1,61 IF y una máxima de 18,27 IF; no encontrándose en este caso diferencias significativas ($p=0,185$) (Figura 40).

4.3.3.1.1 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ROS EN FUNCIÓN DEL DIAGNÓSTICO

El análisis de la producción media de ROS se realizó, en primer lugar, en función del diagnóstico de las muestras. Así, para el grupo control se analizaron 36 muestras y para el grupo patológico 16. La producción media de ROS totales en glucosa muestra que, en el grupo de artrósicos, esta producción es significativamente mayor ($41,27 \pm 62,55$ de IF) que en el grupo sano ($25,98 \pm 35,07$ IF) ($p=0,045$) (Figura 41A). En el cultivo de los condrocitos con galactosa no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, sin embargo, se observa una pequeña diferencia entre el grupo control y el grupo artrósico en la producción de ROS totales y mitocondriales sin llegar a ser estadísticamente significativa (Figura 41B).

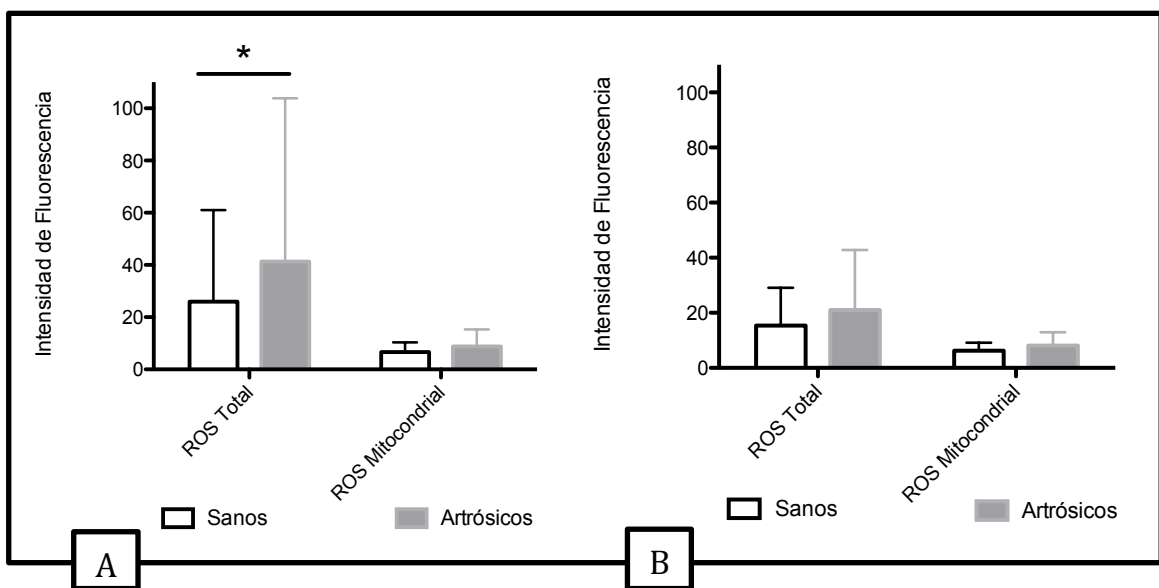
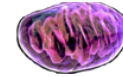


Figura 41. Representación de los valores promedio de producción de ROS totales y mitocondriales, estratificado por su condición de sano o artrósico. A: cultivo en glucosa, B: cultivo en galactosa. Test de Mann-Whitney, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

4.3.3.1.2 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ROS EN FUNCIÓN DE LOS DISTINTOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO **rs1001179** DEL GEN CAT

El genotipo TT del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT se asoció de forma significativa como un factor protector frente al desarrollo de la artrosis en las cohortes de cadera estudiadas (PROCOAC y Santiago). Para el análisis de la producción media de ROS se dividieron las muestras en portadores de los



genotipos CC/CT del polimorfismo de CAT (n=47) frente a los portadores del genotipo TT (n=5).

A pesar de mostrar una menor producción de ROS totales en las muestras portadoras del genotipo TT, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el cultivo con glucosa el genotipo TT obtuvo una producción media de $13,64 \pm 7,27$ IF frente a los portadores del genotipo CT/CC que fue de $33,90 \pm 47,75$ IF; mientras que la producción de ROS mitocondriales para el genotipo TT fue de $8,28 \pm 5,36$ IF y para el genotipo CT/CC fue de $7,10 \pm 4,63$ IF (Figura 42A). En el caso del cultivo con galactosa la producción de ROS totales en el genotipo TT fue de $16,2 \pm 15,4$ IF comparado con el genotipo CT/CC que fue de $18,42 \pm 18,32$ IF; por su parte, la producción de ROS mitocondriales para el genotipo TT, fue de $8,84 \pm 4,91$ IF y para el genotipo CT/CC fue de $6,39 \pm 3,46$ IF (Figura 42B).

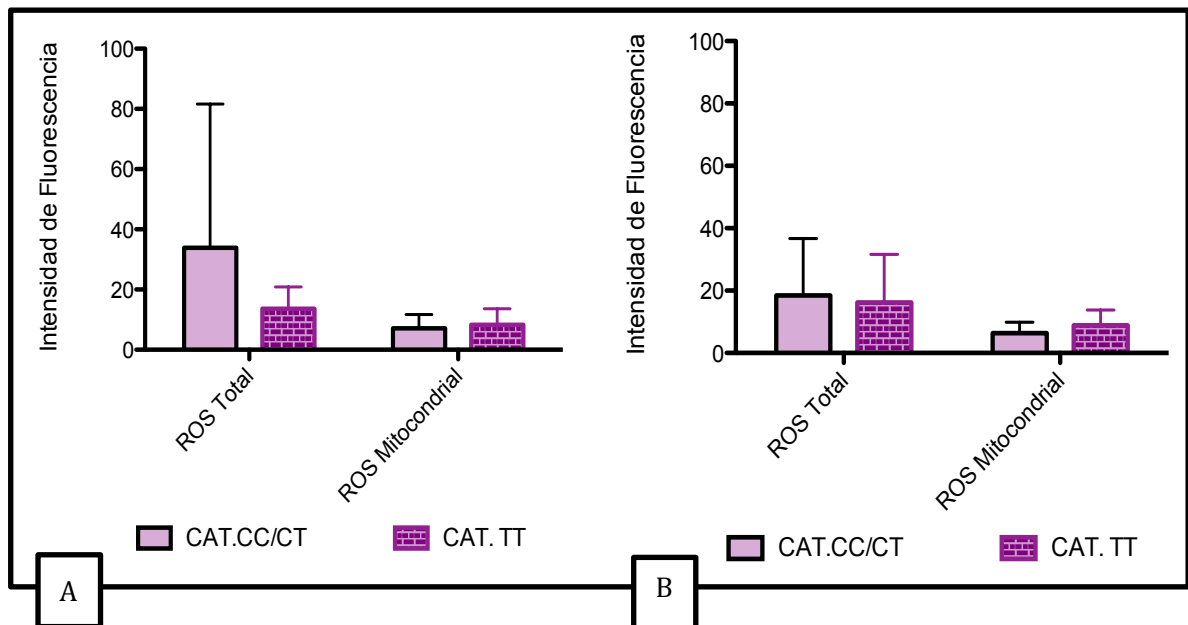


Figura 42. Representación de los valores promedio de producción de ROS totales y mitocondriales distribuidos por el genotipo del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT. A: cultivo en glucosa, B: cultivo en galactosa.

4.3.3.1.3 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ROS EN FUNCIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS CLUSTERS MITOCONDRIALES CON LOS DISTINTOS GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO **rs1050450** DE GPX1

De todas las interacciones analizadas, sólo la relativa al polimorfismo **rs1050450** de GPX1 con los *clusters* mitocondriales TJ (n=5) y HV (n=21) resultó estadísticamente significativa en las cohortes de cadera; por ello, se

Resultados

analizaron las posibles diferencias existentes a nivel de la producción de ROS entre las distintas interacciones de este polimorfismo con los *clusters* TJ y HV.

La producción media de ROS totales a nivel de la interacción entre el *cluster* HV y el genotipo CC/CT de GPX1 en condrocitos cultivados en glucosa ($45,87 \pm 62,09$ IF), resultó significativamente mayor que la mostrada por la interacción entre el *cluster* TJ y el mismo genotipo CC/CT de GPX1 ($6,4 \pm 3,42$ IF) ($p=0,034$) (Figura 43A). Para el caso del cultivo en medio con galactosa, la producción de ROS totales también fue mayor en los portadores del *cluster* HV y el genotipo CC/CT ($22,57 \pm 19,29$) que en los portadores del *cluster* TJ y el genotipo CC/CT ($15,59 \pm 22,90$), bordeando la significación estadística ($p=0,057$) (Figura 43B).

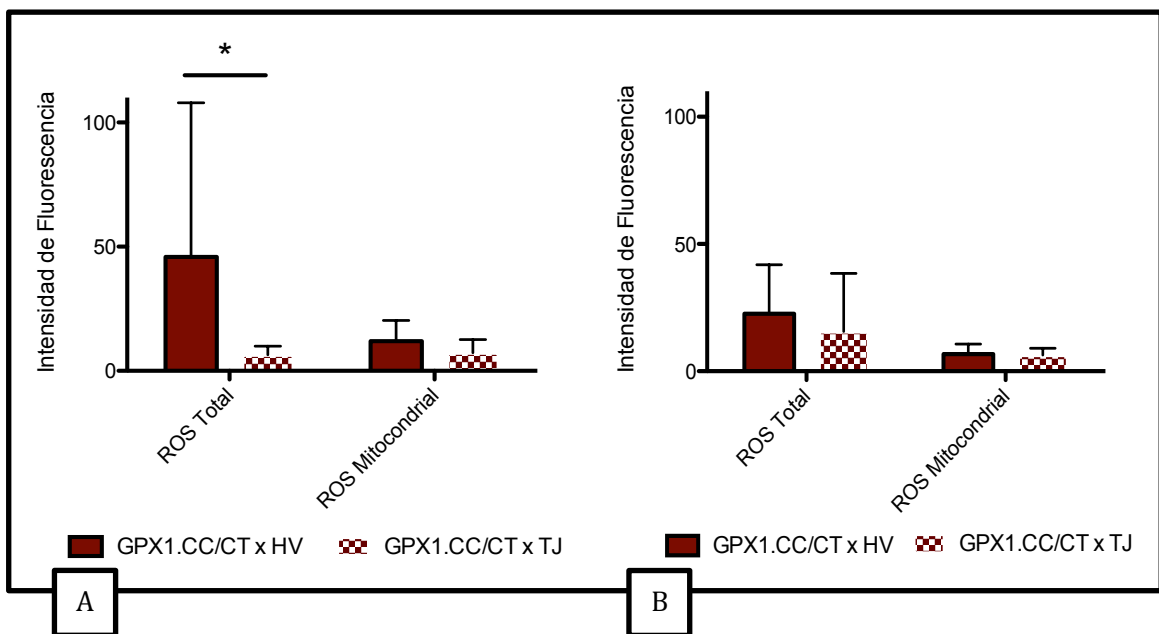
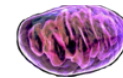


Figura 43. Representación de los valores promedio de producción de ROS totales y mitocondriales distribuidos por la interacción entre los *clusters* TJ y HV y el genotipo CC/CT del polimorfismo **rs1050450** de GPX1. A: cultivo en glucosa, B: cultivo en galactosa. Test de *Mann-Whitney*, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

4.3.3.2 Producción de NO

De todas las muestras pertenecientes a individuos de la cohorte PROCOAC se llevó a cabo un cultivo celular de condrocitos a partir de explantes de cartílago de 48 individuos, el promedio de edad de este grupo es $75,85 \pm 13,65$ años con una edad máxima de 99 y una mínima de 36 años. En el grupo de sanos se incluyeron un total de 34 muestras y su media de edad fue de $80,85 \pm 9,86$,



con una edad máxima de 99 y una mínima de 54 años; mientras que, para el grupo patológico se procesaron un total de 14 muestras, siendo el promedio de edad de $63,71 \pm 14,24$ años, con una edad máxima de 81 años y una mínima de 36 años.

La producción media de NO se analizó, en primer lugar, en función del medio de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que la producción media de NO en medio con glucosa fue de $10,56 \pm 7,89 \mu\text{M}$ con un máximo de $45,74 \mu\text{M}$ y un mínimo de $0,05 \mu\text{M}$. En el medio con galactosa el promedio de producción fue de $9,57 \pm 3,35 \mu\text{M}$ con una producción máxima de $17,33 \mu\text{M}$ y una mínima de $3,82 \mu\text{M}$, sin resultar diferencias estadísticamente significativas ($p=0,431$) (Figura 44).

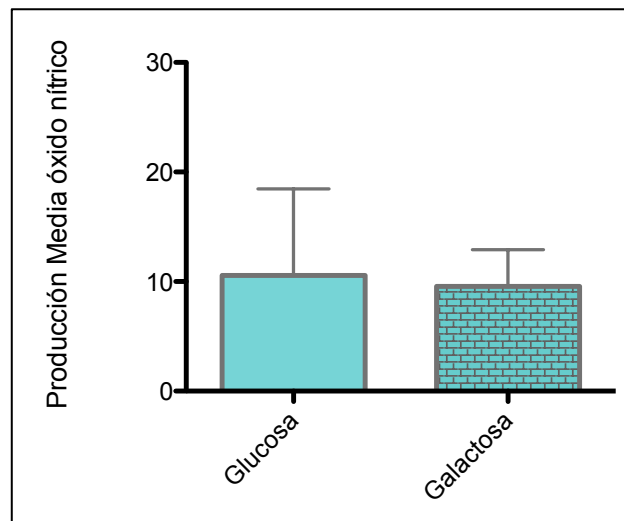


Figura 44. Representación de los valores promedio (μM) de producción de NO en el cultivo con glucosa y galactosa.

4.3.3.2.1 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN FUNCIÓN DEL DIAGNÓSTICO

A nivel de diagnóstico la producción media de NO se realizó en 34 controles sanos y en 14 pacientes artrósicos. La producción media de NO en el cultivo con glucosa fue de $10,67 \pm 9,10 \mu\text{M}$ para el grupo control y de $10,3 \pm 3,8 \mu\text{M}$ para el grupo artrósico; en el caso del cultivo con galactosa la producción para el grupo control fue de $9,69 \pm 3,68 \mu\text{M}$ y en el grupo de pacientes fue de $9,29 \pm 2,49 \mu\text{M}$, sin resultar diferencias significativas en la producción de NO (Figura 45).

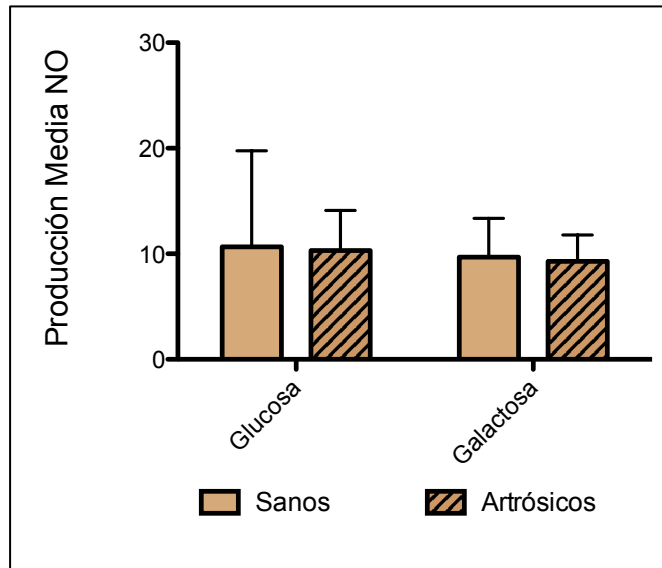


Figura 45. Producción media (μM) de NO en medios con glucosa y galactosa estratificados por el diagnóstico.

4.3.3.2.2 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN FUNCIÓN DE LOS ALELOS DE 11 Y 13 REPETICIONES DEL MICROSATÉLITE DE NOS2A

En los análisis previamente realizados se identificaron dos repeticiones del microsatélite del gen NOS2A que se asociaron significativamente con la enfermedad, el alelo de 11 repeticiones como factor de riesgo en la cohorte PROCAC y el alelo de 13 con un papel protector en la cohorte PROCOAC y en la cohorte de Santiago. Por tanto, el análisis de la producción de NO se centró en comparar ambas repeticiones y ver el efecto que ejercían sobre la producción de NO.

En la producción media de NO en los condrocitos cultivados en medio con glucosa no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los portadores de 11 ($10,28 \pm 4,63 \mu\text{M}$) y 13 repeticiones ($11,48 \pm 9,7 \mu\text{M}$); sin embargo, en el cultivo con galactosa se vio una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,010$), por la cual, la producción media de NO en los portadores de 11 repeticiones ($7,71 \pm 2,76 \mu\text{M}$) resultó menor que los que portaban 13 repeticiones ($10,76 \pm 3,43 \mu\text{M}$) (Figura 46).

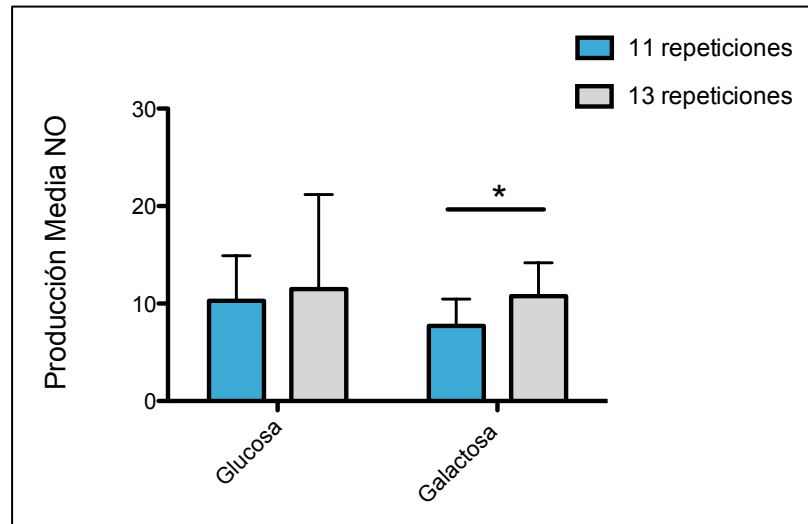
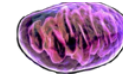


Figura 46. Producción media (μM) de NO en función del número de repeticiones del microsatélite de NOS2A tras el cultivo de condrocitos en medio con glucosa y galactosa. Test de *Mann-Whitney*, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

4.3.3.2.3 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE NO EN FUNCIÓN DE LOS GENOTIPOS DEL MICROSATÉLITE DEL GEN NOS2A

En los estudios previos de asociación realizados en el presente trabajo, el genotipo 12-13 del microsatélite de NOS2A se asoció significativamente con un menor riesgo de tener artrosis, especialmente si este se comparaba con el genotipo 11-12, de mayor riesgo. En base a estos datos se analizó la producción de NO en función de estos genotipos; así, por un lado se comparó el genotipo 11-12 ($n=4$) frente al genotipo 12-13 ($n=8$) y, por otro lado, se comparó el genotipo 12-13 frente al resto de genotipos agrupados ($n=38$).

La producción de NO en el cultivo en medio con glucosa no mostró diferencias entre el genotipo 11-12 ($11,05 \pm 4,3$) y el genotipo 12-13 ($9,12 \pm 2,37 \mu\text{M}$); para el cultivo con galactosa la producción fue menor para el genotipo 11-12 ($9,03 \pm 2,63 \mu\text{M}$) que para el genotipo 12-13 ($11,86 \pm 3,27 \mu\text{M}$) bordeando esta diferencia la significación estadística ($p=0,059$) (Figura 47A).

En cuanto a la comparación del genotipo 12-13 frente al conjunto de genotipos no 12-13, se observaron diferencias significativas en el cultivo en medio con galactosa, mostrando los portadores del genotipo 12-13 ($11,86 \pm 3,27 \mu\text{M}$) unos valores más elevados que los no portadores de este genotipo ($9,03 \pm 3,45 \mu\text{M}$) ($p=0,036$) (Figura 46B).

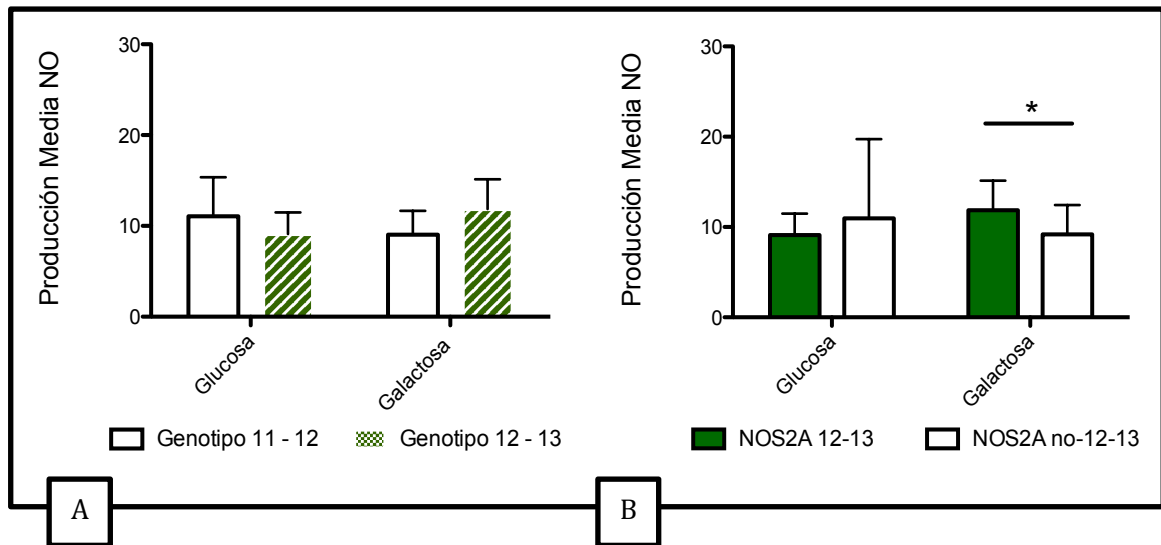


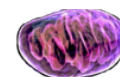
Figura 47. Producción media (μM) de NO tras el cultivo en los diferentes medios de los condrocitos portadores de los distintos genotipos de NOS2A. A: genotipo 11-12 frente al genotipo 12-13. B: genotipo 12-13 frente al resto de genotipos presentes. Test de Mann-Whitney, significancia estadística declarada a $p \leq 0,05$ (*).

4.4 RESUMEN DE LOS RESULTADOS

En primer lugar, se realizó un estudio de asociación entre los haplogrupos mitocondriales y la prevalencia de artrosis de cadera en la cohorte PROCOAC de pacientes de artrosis procedentes del Servicio de Reumatología del CHUAC. El estudio se llevó a cabo a nivel de *clusters* mitocondriales, agrupando aquellos haplogrupos que presentan un origen filogenético común: HV, KU, TJ y Otros. Los resultados obtenidos, tras analizar un total de 953 muestras, replican los publicados con anterioridad por nuestro grupo en el sentido de que la frecuencia de portadores del *cluster* TJ es significativamente menor en el grupo de casos, tras realizar un análisis de regresión ajustando por sexo y edad y utilizando como *cluster* de referencia el HV.

A continuación se llevó a cabo un estudio de asociación para explorar la posible influencia, en la prevalencia de la artrosis de cadera, de determinados polimorfismos genéticos en genes relacionados con la detoxificación celular, así como posibles interacciones significativas entre estos polimorfismos genéticos y los haplogrupos mitocondriales.

De todos los polimorfismos analizados, el **rs1001179** del gen CAT, el **rs1050450** del gen GPX1 y el microsatélite del gen NOS2A mostraron algún tipo de asociación significativa con la enfermedad. Así, tras los diferentes análisis realizados se demostró que, tanto el genotipo TT del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT como la presencia del genotipo 12-13 del



microsatélite de NOS2A, se asocian significativamente con un menor riesgo en la prevalencia de artrosis de cadera. Por su parte, el genotipo 11-12 del microsatélite de NOS2A aparece relacionado como un factor de riesgo de la enfermedad, especialmente si se compara con el genotipo 12-13.

A nivel de las interacciones, los análisis realizados indicaron que el genotipo CC del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 muestra un comportamiento diferente en función del *cluster* mitocondrial; así, la combinación del *cluster* TJ con el genotipo CC aparece con una frecuencia significativamente mayor en el grupo de controles, mientras que si este genotipo se combina con el *cluster* HV, esta combinación aparece con una frecuencia significativamente mayor en el grupo de casos.

A continuación se llevó a cabo un estudio de replicación de estos resultados obtenidos en la cohorte PROCOAC, en dos cohortes diferentes: una cohorte de pacientes de artrosis de cadera procedente de Santiago, utilizando como controles sanos radiológicos los individuos de la cohorte PROCOAC, y una cohorte de artrosis de rodilla de pacientes y controles Norteamericanos con ascendencia Caucásica (OAI).

En el estudio de replicación en la cohorte de Santiago, los resultados obtenidos mostraron que la frecuencia del *cluster* TJ era menor en el grupo de casos, pero bordeando la significación estadística al realizar el análisis de regresión. Además, se detectó la misma asociación estadística que se encontró en la cohorte PROCOAC a nivel del genotipo TT del polimorfismo **rs1001179** de CAT, en el sentido de una menor frecuencia de este genotipo en el grupo de casos. Al igual que en la cohorte PROCOAC, el genotipo 12-13 del microsatélite de NOS2A apareció con una frecuencia significativamente menor en el grupo de casos, especialmente si se comparaba con la frecuencia del genotipo "Otros" y del genotipo "11-12", el cual mostraba una frecuencia significativamente mayor. Por otra parte, también se detectaron interacciones significativas entre el polimorfismo **rs1050450** de GPX1 y el *cluster* TJ que afectan al comportamiento del genotipo CC, ya que la combinación de este genotipo con el *cluster* TJ apareció significativamente sobre-representada en el grupo de controles, mientras que si este genotipo se combinaba con otro *cluster* que no fuera TJ, esta interacción aparecía más significativamente representada en el grupo de casos.

El estudio de replicación en la cohorte Norteamericana mostró una menor frecuencia de portadores del *cluster* TJ en el grupo de casos que bordeó la significación estadística. El estudio de la interacción del alelo T del

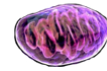
polimorfismo **rs1001179** de CAT mostró una interacción significativa con los *clusters* mitocondriales, en el sentido de que su combinación con el *cluster* TJ disminuye el riesgo de padecer artrosis, y su combinación con el *cluster* HV aumenta este riesgo. Finalmente, no se detectaron interacciones significativas a nivel del polimorfismo **rs1050450** de GPX1. En relación al microsatélite de NOS2A, en esta cohorte se ha detectado también que portar el genotipo 11-12 es un factor de riesgo para la enfermedad, mientras que ser portador del genotipo 12-13 es un factor de protección frente a la artrosis de rodilla, de la misma forma que en las cohortes de cadera.

Para analizar los posibles efectos de las asociaciones encontradas, se llevaron a cabo estudios funcionales consistentes en el análisis de la producción de ROS y NO en condrocitos cultivados en medios con glucosa y galactosa, de muestras genotipadas procedentes de la cohorte PROCOAC. Los resultados obtenidos mostraron que los condrocitos producen de manera significativa una menor cantidad de ROS totales al ser cultivados en un medio con galactosa y que los condrocitos de muestras artrósicas producen una mayor cantidad de ROS totales que los condrocitos de cartílagos sanos. Además, la producción de ROS totales en células portadoras de la combinación entre el *cluster* TJ y el genotipo CC del polimorfismo **rs1050450** de GPX1 fue significativamente menor que en las portadoras del *cluster* HV y el mismo genotipo en el cultivo con glucosa, mientras que en el caso del cultivo con galactosa esta diferencia bordeó la significación estadística.

En cuanto a la producción de NO, se observaron diferencias significativas en función del genotipo del microsatélite de NOS2A, pero sólo para los condrocitos cultivados en medio con galactosa. Así, los portadores del alelo de 13 repeticiones o del genotipo 12-13 mostraron una producción significativamente mayor de NO que los portadores del alelo de 11 repeticiones y los no portadores del genotipo 12-13 respectivamente. Al comparar la producción de NO entre portadores del genotipo 12-13 y los portadores del genotipo 11-12, las diferencias encontradas bordearon la significación estadística.

Capítulo 5
DISCUSIÓN





5.1 OBJETIVO 1: IDENTIFICAR REGIONES GÉNICAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO POR MEDIO DE ESTUDIOS EPIGENÉTICOS EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR

5.1.1 GENES DIFERENCIALMENTE METILADOS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO Y SU EXPRESIÓN GÉNICA.

A partir del primer análisis de metilación global en cartílago, se determinaron los patrones de metilación de una cohorte de 25 pacientes con artrosis de rodilla y 20 controles sanos. En este estudio se determinó la existencia de dos subgrupos de artrosis (*cluster*) como resultado del filtrado no supervisado llevado a cabo en todas las muestras (381). Este tipo de análisis es muy utilizado en los estudios de metilación cuando existe la sospecha de diferencias entre las muestras a analizar (436,437); así, tras el filtrado se identificó un grupo de pacientes (*cluster 3*) con un perfil de metilación relacionado principalmente con la respuesta inflamatoria/inmune, procesos característicos de la artrosis (381). Las sondas hipometiladas en las muestras del *cluster-3* formaban parte de procesos biológicos como la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, regulación de la producción de citoquinas, generación del anión O_2^- , activación de leucocitos, regulación positiva del sistema inmune, respuesta inflamatoria y respuesta de defensa. Todos estos procesos resultaron estadísticamente significativos al ser comparados con el *no-cluster-3*, obteniendo el mayor valor en el análisis *Gene Ontology (Enrichment Score)* la vía relacionada con la respuesta inflamatoria/inmune, con un p-valor menor o igual que 0,0001.

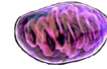
La respuesta inmune o de defensa no sólo incluye inflamación, sino que también incluye eventos de señalización transcripcionales y post-transcripcionales activados por el proceso inflamatorio (438), por lo que los mecanismos epigenéticos parecen estar también implicados (381). En condrocitos humanos, se ha descrito un control transcripcional por mecanismos epigenéticos en distintos genes, como por ejemplo: SOX9 (348), GDF5 (439), MMP13 (440), IL1- β (441) IL8 (373) o iNOS (377). Sin embargo, los mecanismos que controlan la metilación y desmetilación en el cartílago no están todavía muy claros (442). Habida cuenta de que tanto la respuesta inflamatoria como el estrés oxidativo son dos de los principales procesos que tienen lugar durante el desarrollo de la artrosis (443), en este trabajo se realizó

una búsqueda de genes relacionados con el estrés oxidativo a partir del análisis previo de metilación en el que se descubrió un subgrupo de pacientes con una elevada respuesta inflamatoria modulada epigenéticamente.

La existencia demostrable de diferentes fenotipos de artrosis sugiere un efecto de distintos factores etiopatogénicos en su desarrollo, que puede ser relevante para la prevención y el tratamiento de esta patología (444). Teniendo en cuenta las pruebas actuales que implican el estrés oxidativo como un mediador importante de la destrucción del cartílago en la artrosis (445), su estudio es de gran interés para identificar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad. Las modificaciones epigénicas regulan la actividad transcripcional en tejidos y a menudo están desregulados en la enfermedad, aunque estas modificaciones son principalmente heredables, las modificaciones en el ADN y en las histonas son reversibles, lo que las convierte en una diana adecuada para la intervención terapéutica. Los cambios epigenéticos a menudo preceden a la patología de la enfermedad, por lo que presentan un gran valor como indicadores de diagnóstico de riesgo o pronóstico de una patología (446).

Recientemente se han descrito aplicaciones terapéuticas basadas en la regulación epigenética como los inhibidores de las HDAC, debido a sus efectos sobre el ciclo celular y la apoptosis. Un amplio espectro de inhibidores de HDAC han mostrado efectos antiinflamatorios reduciendo la expresión de iNOS y MMPs inducidas por la IL1- β en condrocitos artrósicos, indicando que la inhibición de las HDAC clase I es una estrategia terapéutica posible en diferentes artropatías (447). Sin embargo, existen una serie de limitaciones para introducir estos inhibidores en las terapias contra la artrosis, tales como la ausencia de selectividad que puede generar efectos en otras regiones génicas y citotoxicidad (445), por tanto es necesario una investigación más amplia.

En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios de metilación en cartílago articular y la mayor parte de los genes que se encontraron DMs están relacionados con el proceso inflamatorio (448). Se ha descrito que tanto la producción de ROS como de NO, que son los principales actores responsables del estrés oxidativo en el cartílago articular, son activados por el proceso inflamatorio y, además, alteran la función mitocondrial provocando la apoptosis del condrocito (438). Por este motivo se decidió investigar si los genes que regulan el estrés oxidativo están modulados epigenéticamente a través del proceso de metilación. Para ello, se seleccionaron aquellas sondas DMs cuyos genes se asociaran con procesos involucrados en el estrés oxidativo, identificándose un total de 44 genes diferencialmente metilados



entre el subgrupo de pacientes con alto componente inflamatorio (*cluster-3*) y el subgrupo que no tenía esta característica (no *cluster-3*), de los cuales se seleccionaron 8 para el estudio de su expresión génica. Los procesos biológicos significativamente alterados incluyeron genes asociados con los procesos de respuesta al estrés oxidativo, la respuesta celular a ROS, la hidroxidación lipídica, la inducción de senescencia prematura por estrés oxidativo y la señalización intrínseca de la apoptosis.

Uno de los genes con una mayor diferencia entre los *clusters* resultó ser PKD2, que forma parte de la vía de respuesta al estrés oxidativo y de la vía de detoxificación de sustancias exógenas. Este gen codifica para una proteína que funciona como un canal permeable a cationes de Ca^{+2} , está relacionado con el transporte de calcio y la señalización en las células epiteliales renales y actualmente no se ha descrito una relación con la artrosis (449). PKD2 es un gen interesante ya que su implicación en la señalización celular puede afectar a la respuesta frente al estrés oxidativo de la célula (287) y de hecho, en la enfermedad poliquistosis renal, se ha descrito que la desregulación de este gen produce un desequilibrio del Ca^{+2} intracelular y de la acumulación del AMPc, lo que a su vez conduce a una señalización alterada de las vías que regulan la proliferación celular (450). Los resultados obtenidos muestran una hipermetilación de este gen sin embargo, en este trabajo, a pesar de mostrar una menor expresión en muestras artrósicas, ésta no ha llegado a ser estadísticamente significativa, probablemente por el escaso tamaño muestral.

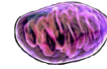
El gen SCARA3 seleccionado por estar más DM entre ambos *clusters*, codifica para una proteína que juega un papel importante en la protección frente al estrés oxidativo además, se ha descrito que el estrés oxidativo induce su expresión génica (451). En este trabajo, se ha determinado una menor expresión génica en los pacientes artrósicos lo que puede estar causado por la hipermetilación encontrada, de hecho, en la diabetes tipo 2, se ha encontrado también una metilación elevada del gen SCARA3, sugiriendo que un fallo en la protección frente al estrés oxidativo facilita el desarrollo de la enfermedad (452). Además, existen claras evidencias de una relación entre la diabetes tipo 2 y la artrosis (453–456). Aunque, la explicación biológica de esta asociación no se ha dilucidado por completo, existen factores causales que podrían explicarla tales como la movilidad reducida, el síndrome metabólico y la debilidad muscular. Los componentes del síndrome metabólico como la obesidad, la hipertensión, la hiperlipidemia y altos niveles de azúcar en sangre son todos ellos comunes entre los pacientes diabéticos y artrósicos (453). Como ya se ha descrito, en la patología artrósica un exceso de estrés oxidativo

acelera la degradación del cartílago y el desarrollo de la enfermedad, por tanto una represión de los genes relacionados con la protección frente al estrés oxidativo facilitarían el desarrollo y progreso de la artrosis.

Otro de los genes encontrados más DM entre los dos *clusters* fue el gen IPCEF1, incluido en la vía de respuesta al estrés oxidativo. Actualmente no se ha descrito una relación con la artrosis pero, en cuanto a su regulación epigenética, se ha identificado una menor metilación en músculos isquémicos de ratones con diabetes tipo 2 (457) y en leucemia (458). En este estudio, los resultados de nuestro trabajo muestran una hipermetilación en pacientes artrósicos lo que sugeriría una menor expresión génica sin embargo, la expresión génica resultó ser (no significativamente) mayor en pacientes artrósicos que en controles sanos, lo que podría ser debido a que la metilación encontrada no afectara a la región promotora del gen, sino al cuerpo génico del mismo, en cuyo caso cabría esperar efectivamente una mayor expresión del gen. Aunque, en los últimos años diversos trabajos han mostrado que la regulación de la expresión génica por metilación es más compleja de lo que se creía (459–461) por lo que este gen podría tener otro tipo de regulación en su expresión génica por metilación. Por otro lado, a la vista de las conexiones entre la diabetes y la artrosis estos genes, IPCEF1 y SCARA3, podrían ser interesantes para evaluar ciertos fenotipos de pacientes.

De los genes encontrados DMs, el gen INS resultó con una menor metilación en el *cluster* inflamatorio. Este gen codifica para la insulina, regulador clave de la homeostasis metabólica (462). La impronta genética en esta región se ha asociado a patrones de metilación diferencial en el ADN (463,464) y se ha demostrado que el gen y su expresión génica en ratones está controlado epigenéticamente por metilación en islas CpG específicas dentro de la región promotora, concluyendo que la metilación de INS suprime la expresión génica (462). En este trabajo se encontró una hipometilación en el gen INS, por lo que cabría esperar una mayor expresión génica, sin embargo la baja metilación encontrada no determinó ninguna expresión del gen en tejido procedente de pacientes artrósicos o de controles sanos, lo que puede indicar que la regulación por metilación de este gen sea más complicada (459–461), y que inhiba su expresión por lo que se necesitaría un estudio más profundo de la regulación por metilación de este gen en cartílago.

La vía de la hidroperoxidación lipídica resultó significativamente alterada en este estudio donde el único gen diferencialmente metilado, y en este caso hipermetilado en el *cluster* inflamatorio, fue GPX3. Este gen es la única GPx que juega un papel crítico en la detoxificación de ROS y protegiendo al ADN



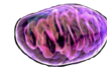
del daño causado por ROS en las células de los mamíferos (465). Diversos estudios han descrito el papel de ROS en la reabsorción ósea en la osteoporosis, que muestra altos niveles de peroxidación lipídica y H_2O_2 junto con una menor actividad de GPX3 (466), por otro lado se ha detectado una mayor expresión en muestras óseas con osteoporosis de enzimas antioxidantes como SOD2 y GPX3, que sugieren un aumento de la actividad antioxidante en mujeres de edad avanzada con fracturas de cadera (467). La metilación epigenética del promotor de GPX3 en cáncer reduce significativamente su transcripción, además muestra una gran diversidad en cuanto a su frecuencia de metilación y los sitios metilados en este gen dependiendo del tipo de cáncer y ha demostrado ser un supresor tumoral en varios tipos de cáncer (468–472). En este trabajo, el grupo de pacientes con un perfil inflamatorio presentó una mayor metilación, que se ve reflejada en los análisis de expresión génica realizados. En este caso, la expresión génica en el grupo control fue claramente mayor que en el grupo artrósico, lo que sugeriría una menor actividad antioxidante de GPX3. Un estudio ha realizado el silenciamiento de GPX3 en una línea celular de cáncer de colon humano (Caco2), resultando en un incremento en la producción de ROS y daño oxidativo en el ADN, poniendo en evidencia su papel en la eliminación de ROS y protección del ADN. Además, recientemente se ha publicado un estudio en levaduras donde demuestra que, las células que carecen de GPX3 tienen una morfología mitocondrial aberrante, una importación de proteínas defectuosa y un menor potencial en la membrana interna mitocondrial, revelando un novedoso papel para GPX3 en la regulación redox mitocondrial y homeostasis de proteínas (473) de gran interés en esta patología.

Otro de los genes DM entre los *clusters* fue el gen EGLN1, que codifica para una de las prolil hidrolasas que durante la normoxia catalizan la hidroxilación de HIF1 α , promoviendo su ubiquitinación (474). HIF1 α activa la transcripción de genes bajo condiciones hipóxicas que son fundamentales en la homeostasis del oxígeno, incluyendo genes relacionados con el metabolismo energético, apoptosis, proliferación y producción de la matriz (475). Además, la expresión de HIF1 α está asociada a bajas concentraciones de O_2 y se ha relacionado con la supervivencia del condrocito y el mantenimiento de la homeostasis del cartílago articular en condiciones hipóxicas. De hecho un estudio ha descrito la asociación entre la inducción de la expresión de HIF1 α frente a la presencia de la citoquina inflamatoria IL-1 β y de estrés oxidativo en cartílago (476). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que EGLN1 presentaba una mayor metilación en el *cluster-3* y su expresión génica mostró una disminución en pacientes artrósicos acorde a una mayor metilación. Estos resultados

sugieren que la menor expresión de EGLN1 permite una mayor expresión de HIF1 α , lo que iría en la línea de lo descrito previamente sobre la inducción de este factor en una situación de estrés oxidativo.

El gen PYCR1 está asociado a la membrana externa mitocondrial y es una enzima importante en el metabolismo de la glutamina para formar prolina. Bajo estrés metabólico las células sobre-expresan MMPs y la deshidrogenasa/oxigenasa de prolina (PRODH/POX) (477), que es una proteína crítica en la señalización de múltiples estrés (478). Las células, al ser privadas de sus substratos habituales, aumentan la degradación de la prolina por activación de la quinasa del AMP (479) y generan un substrato mitocondrial alternativo a partir del colágeno (480). Además PRODH/POX está localizada en la membrana interna mitocondrial junto a la CTE y se encontró una regulación directa negativa entre la proteína y la CTE. PRODH/POX se une a la Coenzima Q1 que requiere del CIII y CIV para su correcto funcionamiento y se ha identificado que el succinato es un inhibidor no competitivo de la actividad de esta proteína y que además, inhibía la producción de ROS. Estos hallazgos demuestran la nueva señalización cruzada en la regulación de la respiración mitocondrial entre la prolina y el succinato (478). Por tanto, una metilación del gen PYCR1 podría sugerir una disminución en la producción de prolina por el metabolismo de la glutamina y un posible aumento de la actividad de la PRODH/POX incrementando la producción de ROS.

El mecanismo de apoptosis está dividido en la vía intrínseca, o también llamada vía mitocondrial, y la vía extrínseca, activada por señales extrínsecas (481). De los genes estudiados se ha relacionado con la vía intrínseca el gen CASP8, hipometilado en el *cluster-3*. Las caspasas son moléculas claves en este proceso (481) y se sabe que la CASP8 es la responsable de propagar la señal apoptótica liberando el citocromo C de las mitocondrias, que activa la caspasa 9 y activando a su vez la cascada de caspasas (482). Asimismo, la CASP8 induce daño mitocondrial por medio de BID (dominio BH3 proapoptótico miembro de la familia BCL2) (483). Además, la alteración de diferentes caspasas puede explicar la habilidad del NO de potenciar o proteger la muerte celular dependiendo de con que factores se asocia; así, se ha descrito que las caspasas 8, 11 y 14 inducen la muerte celular por NO, mientras que la caspasa 1 y 6 protegen a la célula del proceso de apoptosis por señalización de NO (484). Además, en cáncer se ha descubierto que la metilación de CASP8 está relacionada con altos índices de apoptosis en carcinoma hepatocelular (485), mientras que en el presente trabajo la CASP8 se encuentra hipometilada en el *cluster-3*, sugiriendo una mayor expresión de la CASP8 y por tanto un



incremento del proceso apoptótico por la vía intrínseca, lo que sugiere que el mecanismo intrínseco de apoptosis es el proceso principal en la patología. Aunque estas suposiciones se basan en el modelo predominante de regulación de la expresión génica por metilación en el ADN, donde se postula la asociación inversa de la metilación con la expresión, indicando que un incremento de la metilación resultaría en una disminución de los niveles de expresión génicos (486). Por tanto cabría esperar unos niveles altos de expresión en los pacientes artrósicos, sin embargo nuestros resultados muestran que esta hipometilación no produce una expresión génica mayor en muestras procedentes de tejidos enfermos. Si bien estas diferencias de expresión no fueron significativas, esto podría indicar que el número de muestras analizadas no haya sido suficiente como para averiguar si efectivamente las diferencias de metilación se correlacionaban con diferencias en la expresión del gen, partiendo de la base de que la diferencia de metilación a nivel de CASP8 se detectó inicialmente entre pacientes artrósicos, reflejando la existencia de dos grupos diferentes de pacientes. Aunque también existiría la posibilidad de que el proceso de hipometilación no se haya producido en islas CpGs de la región promotora del gen, sino en el cuerpo génico del mismo, en cuyo caso cabría esperar efectivamente, una menor expresión del gen. Aunque, en los últimos años diversos trabajos han mostrado que la regulación de la expresión génica por metilación es más compleja de lo que se creía (459–461) y es probable que la hipometilación de este gen no se relacione necesariamente con su expresión génica.

5.1.2 IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS REGIONES GÉNICAS RELACIONADAS CON LA ARTROSIS MEDIANTE EL ESTUDIO DE METILACIÓN

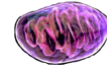
Diversos trabajos han señalado que la metilación en la patología artrósica es distinta a nivel de las articulaciones afectadas (379,380,433) sin embargo, identificar regiones génicas afines a todas las articulaciones es también importante debido a su valor potencial como diana terapéutica en la patología. En el estudio realizado por *Hollander et al.* se identificó la agrupación diferencial de las muestras de cadera y rodilla independientemente del estado de la enfermedad, indicando que ambas articulaciones tienen una patología similar, pero presentan diferentes mecanismos epigenéticos que las generan (380). Así mismo, en el trabajo de *Álvarez-García et al.* observaron de nuevo la distribución en diferentes grupos según la articulación afectada, pero también identificaron una gran cantidad de genes DMs entre pacientes artrósicos y controles sanos, lo que sugiere que el proceso de metilación que sufren los

condrocitos articulares comparten genes claves comunes regulados epigenéticamente, que pueden desempeñar un papel fundamental en la homeostasis de tejidos y la patogénesis de la artrosis (487).

Por tanto, para desarrollar el objetivo planteado de identificar nuevas regiones génicas afines a las articulaciones de la cadera y rodilla, se seleccionaron nuevas regiones génicas a partir de una lista de genes que mostraron una relación inversa entre metilación y expresión de un trabajo previo de nuestro grupo (381). Así, se evaluó la expresión génica en una cohorte de cadera de aquellos genes que, no habiendo sido descritos en la patología artrósica, estuvieran también en cierta manera involucrados en el estrés oxidativo con el fin de identificar alguna coincidencia entre ambas articulaciones. Además, se estudió la expresión génica en condrocitos estimulados con IL1- β para buscar una relación que implique el estrés oxidativo y el aumento de la inflamación ya que esta asociación no está del todo esclarecida (488), si bien existen estudios que relacionan el estrés oxidativo como inductor del proceso inflamatorio (489–491).

Uno de los genes seleccionados fue LPTM5, una proteína que reside en los endosomas tardíos (406) y que recientemente se ha demostrado que es un regulador positivo de múltiples cascadas de señalización inflamatoria en macrófagos, que en consecuencia activan la secreción de citoquinas inflamatorias como IL6, TNF α , IL12 y NO (492), presentes en la patología artrósica (41). Este gen se ha relacionado con varias enfermedades, en lupus eritematoso sistémico se ha asociado una menor expresión génica con la severidad de esta enfermedad (493) y en cáncer, se ha relacionado su sobreexpresión con la degeneración de células en el neuroblastoma, favoreciendo la regresión del tumor y sugiriendo que LPTM5 induce la autofagia (494). En el presente trabajo se ha evaluado la expresión génica de este gen y se ha observado una mayor expresión en cartílago artrósico que en controles sanos sugiriendo que un incremento de su expresión podría estar relacionado con un aumento de las citoquinas inflamatorias, de hecho se ha observado que su expresión génica se incrementa hasta seis veces más cuando las células son estimuladas con la citoquina inflamatoria IL1- β , sugiriendo un papel en la señalización del proceso inflamatorio que tiene lugar en el desarrollo de la enfermedad.

Otro de los genes seleccionados fue KYNU, que codifica para una de las enzimas claves en el metabolismo del triptófano. Esta enzima es la responsable de transformar la 3-hidroxi quinurenina en el ácido 3-hidroxiantranílico, y es crucial en la biosíntesis de nucleótidos de nicotinamida (495) y también da



lugar a otros compuestos fisiopatológicos importantes tales como el ácido picolínico, que es un *enhancer* de la expresión de iNOS (496,497). En suero de pacientes artrósicos, se ha observado un aumento significativo de L-triptófano comparado con pacientes sanos (498) y se ha descrito que un aumento de triptófano aumenta la peroxidación lipídica provocando un aumento del estrés oxidativo (407). Previamente, se había identificado una diferencia significativa en la expresión de este gen entre pacientes con artrosis, mostrando una mayor expresión en los pacientes pertenecientes al *cluster-3*, grupo con un perfil inflamatorio (381). En este trabajo se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa en la expresión génica de KYNU mostrando una mayor expresión en pacientes artrósicos que en los controles sanos, sugiriendo que el gen KYNU está implicado en la patología artrósica independientemente de la articulación afectada. Además, se identificó un incremento significativo en los condrocitos estimulados con IL1- β , indicando su modulación por las citoquinas inflamatorias y sugiriendo una mayor producción del ácido picolínico, lo que aumentaría la producción de NO incrementando, a su vez, los niveles del estrés oxidativo.

El gen PLEK fue otro de los genes seleccionados por su diferencia entre su metilación y su expresión. Este gen es el substrato de la quinasa C de plaquetas y su función *in vivo* no está clara; no obstante es conocido por su implicación en la señalización de segundos mensajeros de distintas rutas y por inducir cambios en la forma celular por su interacción con distintas proteínas de membrana (408). Previamente, en el estudio de expresión génica, PLEK resultó significativamente aumentado en el *cluster* de pacientes con un perfil inflamatorio (381); en el presente trabajo la expresión génica de PLEK fue mayor en el grupo artrósico que en los controles sanos, indicando que su expresión no está asociada a la articulación de la rodilla sino que es común a ambas articulaciones y su mayor expresión puede ser debida al proceso inflamatorio y a la patología. De hecho, su expresión génica en condrocitos estimulados IL1- β mostró un incremento significativo lo que refuerza la idea de una asociación con la inflamación.

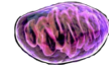
El gen CYTIP es un gen inducido por citoquinas expresado preferentemente en tejido hematopoyético y en células T, y cuya función se ha relacionado con la regulación de la adhesión de linfocitos y el contacto celular (499). También se ha asociado su inducción durante la maduración de las células dendríticas en humanos y se ha asociado con la respuesta inmune (500). Por otro lado se ha descrito que CYTIP modula la expresión de la citoquina IL12, sin embargo el mecanismo de esta regulación no se ha descubierto todavía (501).

Recientemente, se ha establecido una nueva función para CYTIP en el apoyo a la supervivencia bajo condiciones de estrés debido a su relación con las proteínas HIF (314). En este trabajo se observó una mayor expresión en pacientes con artrosis que en controles sanos, así como una diferencia significativa en los condrocitos estimulados con IL1- β , donde mostró una expresión mayor frente a los no estimulados, sugiriendo una modulación por las citoquinas inflamatorias que parece aumentar la expresión génica de CYTIP.

Entre los genes seleccionados se encuentra también MARCO, un receptor de macrófagos con estructura de colágeno, esencial para la unión de las LDL acetiladas, células apoptóticas y lípidos oxidados (409). Se sabe que su expresión se ve aumentada en macrófagos tras una infección bacteriana (502) y que presenta un papel importante en la autoinmunidad (503). También, se ha relacionado con la enfermedad del lupus eritematoso sistémico por su papel en la depuración de células apoptóticas, ya que se sabe que un defecto en la eliminación de las células apoptóticas favorece el desarrollo de esta enfermedad. MARCO es crucial en la depuración de células apoptóticas y un defecto en su expresión afecta a la endocitosis y fagocitosis (503). En este trabajo se ha determinado una mayor expresión en pacientes artrósicos que en controles sanos sugiriendo una mayor actividad de los procesos de endocitosis y fagocitosis. En cuanto a su modulación por citoquinas inflamatorias, ha mostrado también una expresión génica significativamente mayor en condrocitos estimulados con IL1- β , lo que sugiere un aumento de su expresión en procesos inflamatorios.

Por tanto en este estudio se validó en la cohorte de cadera la asociación significativa del gen KYNU que se había detectado en el estudio de la cohorte de rodilla, revelándose como una nueva región génica común a dos articulaciones afectadas por la misma patología. En relación al resto de genes seleccionados, la tendencia en la expresión fue la esperada pero, tal vez debido a la variabilidad en los resultados, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al analizar la expresión de estos genes tras la estimulación de los condrocitos con IL1- β , se detectó un aumento significativo de su expresión, sugiriendo su clara relación con el proceso inflamatorio presente en la patología artrósica.

En definitiva, el metabolismo del triptófano parece ser una potencial diana terapéutica independiente de la articulación afectada, y de gran utilidad para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la artrosis. Por otro lado, se ha identificado también la modulación de los genes LPTM5, PLEK, CYTIP, KYNU



y MARCO por el proceso inflamatorio, mostrando que un aumento de las citoquinas inflamatorias durante el proceso de inflamación causado por el estrés oxidativo (489–491), incrementa la expresión de estos genes, por lo que su estudio en profundidad sería de gran interés para esta enfermedad. Por todo lo expuesto anteriormente, estos genes constituyen nuevas regiones génicas a explorar en la patología artrósica bien para el diagnóstico de la enfermedad, o bien para la comprensión de su compleja patología.

5.2 OBJETIVO 2: DETERMINAR LA INFLUENCIA DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES, COMO AGENTES REGULADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO, EN EL METILOMA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.

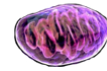
5.2.1 IMPACTO DE LOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES EN EL METILOMA DEL CARTÍLAGO

La influencia de la epigenética en la artrosis es cada vez más relevante (504) lo cual se ve reflejado en el incremento de bibliografía, bien mostrando una metilación diferencial de diversos genes implicados en la homeostasis del cartílago (368,370,505) o resaltando las alteraciones epigenéticas asociadas con la enfermedad por estudios de GWAS (381,382,380,379,383). Además, la importancia de la mitocondria se ha puesto de manifiesto debido a su relación en el proceso de regulación epigenético, ya que el metabolismo mitocondrial también regula los sustratos para la regulación epigenómica, por lo que se puede afirmar que alteraciones en el metabolismo mitocondrial alteran el estado epigenético (176). En cáncer, las modificaciones en la cromatina pueden ser moduladas directamente por el sistema OXPHOS mitocondrial y se han encontrado alteraciones en los patrones de metilación en células cancerosas con su ADNmt depleccionado, recuperándose los patrones iniciales de metilación con la restauración del ADNmt, lo que indica que existe una relación directa de causa y efecto entre la función mitocondrial y la metilación (384,402). Además, los niveles de metilación pueden verse influidos también por la formación de SAM y las funciones mitocondriales (176,384). Por todo esto, en este trabajo se estudió el perfil de metilación de los haplogrupos mitocondriales H, U y J, de las muestras incluidas en el array de metilación realizado por nuestro grupo (381).

El análisis mostró 1926 regiones DM entre los haplogrupos y se identificó un perfil de metilación característico para cada uno de ellos, lo que va en la línea de trabajos realizados en híbridos de osteosarcoma, donde observaron diferencias en la metilación en los haplogrupos mitocondriales y se determinó que, el haplogrupo mitocondrial J presentaba mayores niveles de metilación global en comparación con los portadores del haplogrupo H (403), así como en los híbridos humanos de células retinales, que mostraron diferencias en su metilación global y en los patrones de expresión para genes relacionados con la acetilación y la metilación, lo que sugiere que el trasfondo del ADNmt puede influenciar significativamente en los perfiles epigenéticos y crear un ambiente capaz de sobre-expresar vías específicas críticas en los procesos patológicos (404).

Los portadores del haplogrupo mitocondrial J han mostrado niveles aumentados de metilación y modificaciones en sus perfiles epigenéticos y de expresión (403,404), y se ha sugerido que los efectos fenotípicos provocados por este haplogrupo pueden ser causados parcialmente por cambios epigenéticos (403). En la patología artrósica se ha descrito que tanto la mitocondria como el haplogrupo mitocondrial influyen en la patogénesis de la enfermedad (180) y que el haplogrupo J está asociado con una menor tasa de prevalencia e incidencia de artrosis (250,208,83,84) a diferencia del haplogrupo H (285). Por estos motivos, en este trabajo el análisis de los resultados del *array* de metilación se centró en los haplogrupos H y J, que reveló un total de 538 regiones DMs entre ambos haplogrupos. Además, los resultados de este trabajo mostraron que el haplogrupo J presentaba unos mayores niveles de genes hipermetilados en relación al haplogrupo H, lo que iría en la línea de los trabajos descritos previamente.

La región CpG más diferencialmente hipermetilada entre los haplogrupos mitocondriales J y H resultó ser la enzima fucosidasa α -L1 (FUCA 1), una enzima lisosómica implicada en la degradación de glicoproteínas y glicolípidos que contienen fucosa; mutaciones en este gen provocan una enfermedad autosómica recesiva de almacenamiento lisosomal (Fucosidosis) (506,507) que presenta una maduración tardía del esqueleto y osteoporosis (508). Recientemente, se ha descrito que la α -fucosidasa se sobre-expresa durante la senescencia celular prematura inducida por daño en el ADN, sugiriendo su valor potencial como biomarcador de senescencia celular (509). En la patología artrósica, un reciente trabajo ha descrito que el envejecimiento prematuro asociado a cambios en la metilación del ADN es específico del cartílago artrósico (510). En este trabajo, FUCA1 presentó una mayor



metilación en los portadores del haplogrupo J, lo que sugeriría una menor expresión de esta enzima y una menor senescencia prematura. Estos hallazgos concuerdan con diversos trabajos que asocian una longevidad mayor con los portadores del haplogrupo J (256,221,511,255) y una longitud del telómero más larga, indicando un menor daño oxidativo (170). Por lo tanto, la hipermetilación encontrada en *FUCA1* podría estar relacionada también con lo descrito sobre el haplogrupo J y su papel protector frente al desarrollo de artrosis de rodilla y cadera (250,208,83,170,207).

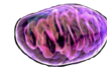
Por otro lado la región CpG más diferencialmente hipometilada en el haplogrupo J con respecto al H, se correspondió con el gen *homeobox D3* (*HOXD3*), que codifica para un factor de transcripción con un importante papel en la morfogénesis relacionado con la regulación de los procesos de adhesión celulares. La metilación de *HOXD3* se ha asociado como marcador pronóstico en cáncer de próstata (512); la hipermetilación de esta región se asoció con el aumento de grado tumoral y el estadio, indicando su valor potencial como marcador predictivo de la agresividad del cáncer de próstata (513). Además, la expresión de *HOXD3* se ha asociado con un incremento de integrinas (514), y en cartílago, se sabe que las integrinas son mediadores importantes de las interacciones célula-matriz que funcionan como sensores de integridad de la matriz extracelular. Las integrinas controlan la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación y la remodelación de la matriz, así como el desarrollo y mantenimiento del tejido, pero también intervienen en procesos patológicos relacionados con la destrucción de la matriz, como es el caso de la artrosis (515). Esto podría sugerir una relación entre la expresión de *HOXD3* y la degradación del cartílago en el proceso artrósico. En este trabajo, *HOXD3* presentaba una mayor metilación en el haplogrupo H, lo que sugiere una menor expresión de este gen que podría estar relacionado con el grado de degradación del cartílago. Esto va en la línea de los trabajos publicados que asocian el haplogrupo H con una mayor prevalencia y progresión en la artrosis (250,208,83,170,207) y también con los resultados obtenidos en cáncer de próstata donde la hipermetilación de este gen se ha relacionado con un aumento del grado tumoral y el estadio (513).

En la patología artrósica, debido a la producción excesiva de citoquinas inflamatorias y enzimas degradantes de la matriz, se produce un desequilibrio que activa la síntesis de la matriz extracelular como mecanismo compensatorio (516). La proliferación de condrocitos y la inducción de estrés oxidativo en un ambiente celular estresante conduce a la apoptosis de los condrocitos en la etapa progresiva de la artrosis (517,518), constituyendo estos procesos como

mecanismos clave en el desarrollo de la enfermedad. En este trabajo, los procesos más significativamente alterados fueron aquellos relacionados con la regulación de la apoptosis, lo que refuerza la importancia de esta vía en el proceso artrósico.

Entre los procesos más significativos e hipometilados en el haplogrupo H con respecto al J, se encontraron procesos relacionados con la regulación positiva de la apoptosis y la muerte celular, lo que sugiere un mayor mecanismo de apoptosis en este haplogrupo y un consecuente aumento de la muerte celular. Por el contrario, uno de los procesos más significativos e hipometilados en el haplogrupo J con respecto al H, fue la regulación negativa de la apoptosis sugiriendo una mayor expresión de los genes que regulan este mecanismo y, por tanto, una represión controlada del proceso apoptótico. Estos resultados van en la línea de estudios recientes en cíbridos transmitocondriales que mostraron que el haplogrupo J en comparación con el H, se asocia con una disminución de la expresión de genes específicos relacionados con la respuesta inflamatoria y la apoptosis (291) y además presentan un comportamiento fisiológico diferente que, en el caso del haplogrupo J, confiere un carácter protector frente al desarrollo de la enfermedad (84). Asimismo, se ha encontrado una hipometilación de la regulación negativa de la actividad catalítica asociada al haplogrupo J. Este hallazgo justificaría la menor expresión de enzimas catalíticas en el haplogrupo J, como es el caso de las MMPs, lo que va en la línea con lo publicado acerca de la influencia de los haplogrupos en los niveles séricos de MMP13, en cuyo estudio se reveló que los pacientes artrósicos portadores del haplogrupo J presentaban niveles más bajos de MMP13 que los portadores del haplogrupo H (285).

En un estudio realizado con cíbridos transmitocondriales, se mostró una producción significativamente menor de O_2^- y $NOOO^-$, así como una mayor capacidad para hacer frente al estrés oxidativo en el haplogrupo J en comparación con el H (84). En el presente trabajo, se ha obtenido una hipometilación significativa en la regulación negativa del proceso metabólico de compuestos nitrogenados para el haplogrupo H, lo que podría estar relacionado con el mayor estrés oxidativo encontrado en los portadores de este haplogrupo (519). La menor metilación encontrada para este proceso, sugiere un aumento de los RNS y un mayor estrés oxidativo, reforzando la idea de que ambos haplogrupos presentan una fisiología distinta a nivel mitocondrial y que actúan como moduladores principales de la bioenergética celular (291). Estos datos sugieren que el proceso apoptótico principal en esta patología se lleva a cabo mediante la vía mitocondrial o vía intrínseca de la apoptosis e indica la



posibilidad de una regulación distinta en base al haplogrupo. De hecho, se ha descrito una menor expresión del gen pro-apoptótico BBC3 (componente 3 de unión a BCL2) en híbridos con el haplogrupo J; este gen induce la apoptosis a través de la disfunción mitocondrial (84), lo que refuerza una vez más el papel de los haplogrupos mitocondriales en esta patología.

En el presente trabajo, se llevó a cabo un análisis del transcriptoma completo por RNA-Seq con el objetivo, por un lado, de validar los resultados de metilación y, por otro lado, para evaluar el efecto de los haplogrupos mitocondriales en los perfiles de expresión en cartílago.

5.2.2 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DEL CARTÍLAGO EN LOS HAPLOGRUPOS H Y J

En los últimos años, la técnica del *RNA-Seq* se ha revelado como una herramienta revolucionaria para el estudio del transcriptoma que genera medidas más precisas de los niveles de los transcritos que otros métodos. El transcriptoma es el conjunto completo de transcritos de una célula y su cantidad en un estadio o condición fisiológica específica. La comprensión del transcriptoma es esencial para interpretar los elementos funcionales del genoma y revelar los constituyentes moleculares de células y tejidos y también para comprender el desarrollo y la enfermedad (520). Esta tecnología ha demostrado tener una alta sensibilidad y seguridad comparado con los *arrays* de expresión génica, permitiendo la detección de genes con una expresión génica muy baja (418). En este trabajo se ha realizado, un estudio del transcriptoma a partir de cartílago articular humano, con el objetivo de estudiar, por primera vez en este tejido, la modulación que el genoma mitocondrial ejerce sobre potenciales genes involucrados en el proceso artrósico.

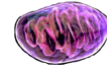
Entre los genes más diferencialmente expresados entre el haplogrupo H y el J, se encontró una mayor expresión del gen SELE (selectina-E) en el haplogrupo J. La selectina-E pertenece a una de las 3 familias más importantes de moléculas de adhesión que reclutan leucocitos de la sangre hacia los sitios donde existe inflamación (521). En artritis reumatoide se ha encontrado que la selectina-E y -P se expresan en el endotelio del sinovio de las articulaciones afectadas y, en el fluido sinovial, se han detectado también altos niveles de esta molécula (522). La selectina-E se ha descrito como una molécula de adhesión en el endotelio pero en la artrosis se ha visto que favorece la extravasación de leucocitos gracias a la capacidad quimio-atrayente de la galectina-3 (GAL3) y

que además, se ha encontrado que tiene una actividad inflamatoria en la artrosis (523). Lo que podría indicar una modulación del proceso inflamatorio relacionado con las galectinas por medio de los haplogrupos mitocondriales que no es conocido y que necesitaría un estudio más profundo.

Otro de los genes identificados es CD5, una glicoproteína expresada por los linfocitos T, cuya expresión resultó más elevada en el haplogrupo J. Su expresión génica en cartílago no se ha descrito; sin embargo, la sobre-expresión encontrada en este trabajo puede estar relacionada con la infiltración de linfocitos en el sinovio como parte del proceso de inflamación que conlleva la enfermedad. Por otro lado, un análisis de proteómica diferencial ha identificado un ligando de superficie de CD5 en líquido sinovial, que es un ligando alternativo para CD5 y también conocido como un inhibidor de apoptosis expresado en macrófagos (524). Lo que sugiere que su presencia en el cartílago no sólo es debida a un proceso inflamatorio sino que podría estar también relacionado con un menor proceso de apoptosis descrito para el haplogrupo J en comparación con el H.

El gen WNT7A, perteneciente a la vía de señalización *wnt*, ha resultado con una mayor expresión en el haplogrupo J. La vía *wnt* está altamente conservada y desempeña un papel crucial en el desarrollo (525); posee dos rutas principales de actuación: la canónica y la no canónica, la primera vía implica la acumulación de β -catenina en el núcleo y la inducción de genes diana como la *axina2* (526). Las proteínas del grupo de las axinas regulan las vías de β -catenina/*wnt* y la vía de señalización de TGF- β ; recientemente se ha descrito que regulan la maduración del condrocito y que son relevantes en los procesos de osificación endocondral y embriogénesis (527). Las rutas no canónicas incluyen vías de señalización múltiples, como la señalización de Ca^{+2} y NFAT (factor nuclear de células T activadas) o la activación de Akt (528,529); además, según el tipo celular, WNT7A actúa por una de las rutas descritas (529,530). El gen WNT7A se ha encontrado expresado en el cartílago (526) y recientemente un estudio ha mostrado que la sobreexpresión de este gen inhibe la inducción de la MMP13 y el colágeno X por la IL1- β en condrocitos y que, en un modelo murino de artrosis experimental, inhibe la progresión de la enfermedad revelándose como una nueva diana terapéutica (531). En este trabajo su sobre-expresión resultó incrementada en el haplogrupo J, lo que concuerda con una menor progresión y riesgo de la enfermedad descrita para este haplogrupo.

En cuanto a los genes que resultaron con una sobre-expresión más significativa en el haplogrupo H, se encontró el gen SCN5A, que codifica para la subunidad



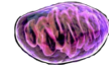
alfa 5 del canal mediado por voltaje de sodio. Este tipo de canales, son fundamentales para regular la excitabilidad de las neuronas y su sobre-expresión puede producir patrones anormales en el dolor crónico (532). La expresión génica diferencial entre los individuos de este canal podría justificar la variabilidad del dolor en esta patología ya que en ocasiones, el paciente no presenta una manifestación sintomática de dolor articular a pesar de que existen signos radiológicos (13,30). Otro de los genes encontrados sobre-expresados en el haplogrupo H fue SPTA1 (espectrina), que actualmente forma parte de un *micro-array* diseñado para determinar una etapa de desarrollo, estadio de enfermedad o condición de cultivo celular particular en los condrocitos. En el caso del gen MYT1L (símil del factor de transcripción 1 de mielina), sobre-expresado en el haplogrupo H, está relacionado con el sistema nervioso central. Un estudio sobre reprogramación celular en ratones, ha determinado que el uso de 3 factores de transcripción, entre ellos *myt1l*, convierte fibroblastos murinos en neuronas funcionales (533). Por lo que el gen MYTL1 podría estar relacionado con las señales transmisoras de dolor en el cartílago. A la vista de estos resultados, cabría esperar que los haplogrupos mitocondriales estuvieran también relacionados con los patrones de dolor que pueden sufrir los pacientes artrósicos, aspecto que hasta la fecha no ha sido investigado.

A partir de los datos obtenidos del estudio de *RNA-Seq*, se realizó un estudio de los procesos alterados en función de los genes diferencialmente expresados entre el haplogrupo H y J.

En el caso del haplogrupo H se han encontrado procesos relacionados con la apoptosis, la adhesión celular y la unión de iones de Ca^{+2} . El proceso apoptótico, tal y como se ha descrito previamente, es un proceso característico de esta patología y se encuentra aumentando en el haplogrupo H (84,291). El hecho de que entre los procesos significativos alterados en el haplogrupo J no aparezca la apoptosis, al contrario que en el haplogrupo H, es indicativo del papel que juegan estos dos haplogrupos en el desarrollo y progresión de esta patología (180,84,283). El proceso apoptótico está altamente regulado por conjuntos específicos de genes y señales intracelulares (481) y es responsable de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, en las cuales las funciones de las mitocondrias se encuentran alteradas. La alteración mitocondrial es un factor clave en la vía intrínseca de la apoptosis, ya que genera un aumento en la producción de ROS, del potencial y de la permeabilidad de membrana y de la incorporación de Ca^{+2} (534). Las alteraciones en algunas de las funciones mitocondriales, como la modulación

de los niveles de calcio en la mitocondria, se han relacionado con la inducción de la degradación del cartílago, el estrés oxidativo, la producción de citoquinas y la degradación de la matriz mediada por un proceso inflamatorio, la calcificación de la matriz del cartílago y la apoptosis (180). Por tanto, el aumento significativo en la expresión de genes para la unión de iones de Ca^{+2} encontrado en el haplogrupo H, podría estar relacionado con un desequilibrio de la homeostasis celular de este ión causado por una alteración en la mitocondria. Además con estos procesos se produciría un incremento de la degradación del cartílago lo que justifica la sobre-expresión de genes relacionados con la adhesión celular.

Entre los procesos biológicos cuyos genes mostraron una expresión génica significativa e incrementada para el haplogrupo J se encontraron la homeostasis del Ca^{+2} y procesos metabólicos de regulación del AMPc, un mensajero esencial en distintas vías de señalización celular. Este mensajero es sintetizado por enzimas como la adenilato ciclasa, que está potencialmente regulada por la calmodulina, la cual aparece como una función molecular significativamente alterada en este haplogrupo, y que a su vez se encuentra influenciada por los niveles de Ca^{+2} (535,536). En condrocitos, el AMPc está aumentado debido a la estimulación mecánica que sufre el tejido articular, de hecho en explantes bovinos de cartílago se ha descrito que esta molécula está involucrada en la regulación de la expresión de genes relacionados con la remodelación de la matriz y el catabolismo (537). Además se ha determinado que la estimulación mecánica sufrida por el cartílago activa la fosfolipasa C, que produce un aumento intracelular del Inositol-1,4,5 trifosfato, que puede provocar a su vez un aumento intracelular de Ca^{+2} y/o la activación de la proteína quinasa C (538). Diversos estudios, sugieren que la activación de la fosfolipasa C y la proteína quinasa C desencadenan la activación de las integrinas (539,540) y que tienen un papel clave en el control de la vía de señalización de las MAPK en los condrocitos, relacionada con la transducción de señales de la proliferación celular (541,542). De nuevo, la señalización celular por el Ca^{+2} aparece como un proceso relevante en este haplogrupo aunque, en este caso, actuaría como un segundo mensajero en procesos de proliferación celular, lo que podría estar relacionado con el carácter protector del haplogrupo J en la artrosis (250,208,83,84). Esto podría verse reflejado en una mayor proliferación celular y un menor deterioro del tejido articular que refuerza la relación entre este haplogrupo y la menor incidencia y progresión de la artrosis.



Otros procesos biológicos alterados en el haplogrupo J fueron el desarrollo del sistema inmune, mecanismo implicado en esta patología por la inflamación característica que se produce en el sinovio por la degradación de la matriz (543). Estudios recientes han mostrado la disminución de la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y el complemento en el haplogrupo J en un modelo de híbridos mitocondriales (291). Por tanto, dado el carácter protector de este haplogrupo, el aumento de la expresión de genes involucrados en este proceso podría sugerir una defensa inmunológica más eficaz frente a las agresiones en el tejido de la articulación. También resultó significativamente alterada en el haplogrupo J la regulación de la síntesis de lípidos, lo que podría estar relacionado con la obesidad, considerado un factor de riesgo en la artrosis (28). En este sentido, se ha descrito la implicación de algunos haplogrupos en las variaciones de la grasa corporal y el IMC (281,254).

En los últimos años, la epigenética ha sufrido una serie de modificaciones en sus bases conceptuales, ya que en sus inicios se basaba en que la regulación por el proceso de metilación de un gen provocaba una sobre-expresión o una inhibición de la expresión génica dependiendo de si sufría respectivamente una hipometilación o una hipermetilación en la región promotora. Sin embargo en los últimos años se ha demostrado que la regulación de la expresión génica por metilación es más compleja de lo que se pensaba y que su expresión es también dependiente del lugar donde se haya producido la metilación, bien en las islas CpG de la región promotora o bien en el cuerpo génico (459–461). Por este motivo se creyó indispensable identificar alguna relación entre todos los procesos encontrados diferencialmente metilados y expresados, tomando como base que una hipometilación de la región promotora del gen genera una sobreexpresión génica, con la finalidad de identificar un proceso biológico regulado de manera epigenética y a su vez modulado por los haplogrupos mitocondriales para el estudio de la enfermedad.

A nivel de los procesos biológicos, en el haplogrupo H se encontró una hipometilación significativa a nivel de la regulación positiva de la apoptosis, lo que se vio reflejado posteriormente en una sobre-expresión de genes que participan activamente en el proceso de apoptosis. Por otro lado, la menor metilación encontrada en el haplogrupo J para la regulación negativa de la apoptosis no mostró una correlación clara con la expresión génica. Estos datos sugieren que la apoptosis se encuentra regulada por un proceso de hipometilación mediado, al menos en parte, por el haplogrupo mitocondrial;

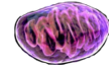
como consecuencia, una serie de genes implicados en el proceso apoptótico muestran una expresión aumentada en el haplogrupo H en relación al haplogrupo J; lo que va en la línea con lo descrito acerca de la influencia de los haplogrupos en la tasa de apoptosis en trabajos que utilizaron cíbridos transmitocondriales (84,291). Además, en el haplogrupo H se encontró una correlación entre la menor metilación de la actividad transmembrana de transportadores de Ca^{+2} y la mayor expresión de la unión de iones de Ca^{+2} ; lo que podría estar relacionado con una mayor propensión a un desequilibrio de la homeostasis del Ca^{+2} en los portadores de este haplogrupo, debido a una alteración de la función mitocondrial (534).

5.3 OBJETIVO 3: EXPLORAR EL PAPEL EN LA ARTROSIS DE LAS INTERACCIONES MITOCONDRIA-NÚCLEO A NIVEL DE GENES RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO

5.3.1 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA DETOXIFICACIÓN CELULAR

La artrosis es una enfermedad compleja que afecta a todas las estructuras que componen la articulación (544), su carácter multifactorial hace que factores extrínsecos e intrínsecos, factores ambientales, hormonales y, en cada paciente en particular, se vean implicados múltiples genes (545). Esta patología tiene un componente genético importante (546) y la identificación de factores genéticos en este tipo de enfermedades es de suma importancia, ya que permite aportar nuevos datos a la fisiopatología de la enfermedad, proporcionar nuevos elementos de diagnóstico y prevención así como identificar nuevas dianas terapéuticas (547,548).

La contribución de la mitocondria a la enfermedad se ha demostrado no sólo a nivel de la propia disfunción mitocondrial (180) sino también a nivel de los haplogrupos mitocondriales (216). Diversos trabajos han descrito que los portadores del haplogrupo mitocondrial J muestran un menor riesgo de padecer artrosis de rodilla, con una severidad menor en el caso de padecer la enfermedad (84,208,282), así como de artrosis de cadera (250). También se ha puesto de manifiesto que el haplogrupo J y el *cluster* TJ ejercen un papel protector frente a la progresión radiológica de la enfermedad, comparados con el haplogrupo H, el más eficiente energéticamente, pero que mostró un



comportamiento antagónico (180) ya que su progresión radiológica era también más rápida (283). En nuestro estudio hemos replicado de nuevo la asociación del *cluster* TJ como un factor protector frente a la artrosis de cadera (cohorte PROCOAC) y la tendencia observada indicó que la frecuencia del *cluster* TJ era menor en los pacientes artrósicos de la cohorte de validación de Santiago y en la cohorte de rodilla del OAI, bordeando la significación estadística. Además, estos resultados cuentan con la peculiaridad de que en el grupo de controles se ha confirmado la ausencia de artrosis mediante técnicas radiológicas, lo que añade más robustez a los resultados obtenidos. Los haplogrupos J y T comparten un origen filogenético común (220) y diversos estudios apoyan la idea de que ambos haplogrupos se caracterizan por la presencia de polimorfismos que inducen un comportamiento desacoplante en la mitocondria que, en combinación con el trasfondo nuclear, conduciría a una menor producción de ATP (129,288,549) y como resultado una reducción en la generación de ROS (218–220,550).

La creencia general es que la alta variabilidad en la secuencia del ADNmt conlleva pequeñas consecuencias celulares, sobre todo relativas a la producción de energía; sin embargo, las variaciones que ocurren de forma natural en el ADNmt no son neutras, sino que la interacción entre estas variantes y el genoma nuclear puede tener grandes efectos en la biología de los mamíferos (551). La interacción constante entre el ADNmt y el ADN nuclear establece una línea base de bioenergética que de alguna manera, afecta los niveles de expresión del ADN nuclear de vías celulares específicas como la inmunidad innata, la inflamación y la apoptosis (291). La secuenciación completa del ADNmt de los híbridos con el haplogrupo mitocondrial H y J mostró que la mayoría de los polimorfismos encontrados definían tanto al haplogrupo H como al J, y no se identificaron polimorfismos particulares o únicos que se encontrasen uniformemente entre los haplogrupos. Esto apoya el concepto de que las diferencias en la expresión génica entre haplogrupos no se deben a una única mutación, un SNP particular o exclusivo, sino a la acumulación de múltiples polimorfismos característicos de cada haplogrupo, o a un polimorfismo concreto no descubierto todavía, con propiedades para modular la expresión del gen nuclear por medio de una señalización retrógrada (404).

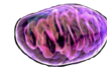
Un reciente trabajo realizado en ratones conplásticos, ratones con un mismo trasfondo nuclear pero diferentes variantes del ADNmt, mostró que el haplogrupo mitocondrial influye en la longevidad de la salud por medio de la homeostasis proteica mitocondrial y la generación de ROS, en la señalización

de la insulina, la obesidad, el acortamiento telomérico o la disfunción mitocondrial (336). Estos aspectos se encuentran relacionados con la artrosis, lo que sugiere que la variación del ADNmt podría afectar también a la biología funcional del cartílago. De hecho, un trabajo realizado por nuestro grupo con híbridos transmitocondriales, mostró que los polimorfismos del ADNmt del haplogrupo J alteran el metabolismo y la fisiología celular generando un microambiente que no favorece el desarrollo de la artrosis (84). Por estos motivos, es de gran interés el estudio de las interacciones de los haplogrupos mitocondriales con genes nucleares que presenten una asociación relevante con mecanismos asociados al desarrollo de la patología como el estrés oxidativo. En este trabajo se ha estudiado el efecto de los haplogrupos mitocondriales sobre distintos genes relacionados con la detoxificación celular y sus polimorfismos para identificar alguna interacción o efecto aditivo que afecte al comportamiento de la célula frente al estrés oxidativo.

5.3.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS CLUSTERS MITOCONDRIALES Y LOS POLIMORFISMOS NUCLEARES Y ESTUDIO FUNCIONAL

Los ROS son producidos en su mayoría por el sistema OXPHOS debido a la reducción incompleta del O₂ (139,177); la energía liberada por el flujo de electrones que se trasvasa entre los complejos de la CTE en la membrana interna mitocondrial es almacenada como un gradiente que es utilizado para múltiples propósitos, entre ellos la síntesis del ATP (174). Las proteínas desacoplantes están presentes en la membrana interna mitocondrial y su función fisiológica es transportar los protones a la matriz mitocondrial (552–555). La proteína UCP2 reduce el potencial de la membrana mitocondrial atenuando la producción de ROS y protegiéndola del daño oxidativo (556) y se ha descrito que está regulada a nivel transcripcional y traduccional (557).

El polimorfismo **rs659366** del gen UCP2, produce un cambio aminoacídico conservativo que no parece causar cambios funcionales en la proteína (558), el alelo salvaje (C) se ha asociado con un mayor riesgo de padecer diabetes (559,560) y el alelo mutante (T) con una mayor longevidad (558) y una mayor longitud del telómero en pacientes con diabetes (561). Además, se ha identificado una asociación de este SNP con unos niveles elevados de expresión de ARNm en el tejido adiposo y el incremento del IMC (562), sin embargo, otro estudio ha determinado que esta asociación está correlacionada



con la señalización de ácidos grasos y metabolismo lipídico, más que por la obesidad (563).

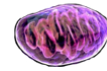
En nuestro trabajo hemos tratado de buscar interacciones entre el polimorfismo del gen UCP2 y los haplogrupos mitocondriales, encontrando una interacción que bordeó la significancia estadística para el *cluster* HV y el genotipo TT en la cohorte PROCOAC, donde la tendencia marcaba un riesgo mayor de padecer artrosis para los portadores del genotipo TT y el *cluster* HV. Estos resultados van en la línea de lo descrito anteriormente sobre el haplogrupo H y su asociación con la artrosis (180) y difieren con lo descrito sobre el alelo (T) del polimorfismo del gen UCP2 asociado a una atenuación en la generación de ROS y mayor longevidad (556,558). Esto sugeriría que el posible efecto sobre el riesgo de la enfermedad podría estar causado, en parte, por la interacción entre el genotipo nuclear y el haplogrupo mitocondrial. Estos resultados contrastan con los encontrados en un estudio de esclerosis múltiple, donde observaron que el *cluster* TJ (bioquímicamente antagónico al *cluster* HV) y la presencia de al menos un alelo C en el genotipo de UCP2, mostraba una tendencia protectora frente a la enfermedad (564). Sin embargo, en los resultados que los autores reflejan en este trabajo se observa también como la distribución de frecuencias del haplogrupo H y el alelo T muestra una tendencia de riesgo, al igual que los resultados encontrados en nuestro trabajo. Por otro lado, el efecto protector del haplogrupo J se ha demostrado en diversos estudios, tal como se ha expuesto previamente, por lo que es posible que la tendencia a la protección que asocian en el trabajo de esclerosis múltiple no se deba tanto al genotipo del polimorfismo **rs659366** de UCP2, como al efecto aditivo que causa la propia interacción.

Los niveles de ROS están relacionados con la producción de citoquinas inflamatorias asociadas a la degeneración del cartílago (146). A bajas concentraciones, los ROS son importantes mensajeros secundarios implicados en distintas vías de señalización celular (488); sin embargo, niveles elevados y crónicos provocan daño oxidativo en el ADN causando apoptosis, lo que contribuye al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades degenerativas (155,156). Frente al daño oxidativo causado en el ADNmt, la célula cuenta con la enzima ADN glucosidasa 1 de 8-oxoguanina (OGG1), que cataliza la eliminación de oxodeoxiguanosina del ADN, que es la lesión más abundante generada por el estrés oxidativo (565). Para neutralizar los ROS, la célula cuenta con un sistema de defensa antioxidante que incluye las enzimas SOD, catalasa y las GPx, las cuales tras una serie de reacciones transforman los ROS en moléculas inocuas (139).

El polimorfismo **rs1052133** del gen OGG1 genera una mutación sin sentido que se ha sugerido que produce una expresión incorrecta de la proteína codificada que podría interferir en la reparación adecuada del ADN (566). El alelo mutante (G) y su genotipo recesivo GG se ha asociado como un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama (566,567), sin embargo existen varios trabajos que contradicen esta asociación (411,568–570). En el presente estudio se analizó la interacción del polimorfismo **rs1052133** con los haplogrupos mitocondriales y el riesgo de padecer artrosis, sin encontrar una interacción significativa en ninguna de las cohortes analizadas. Los resultados que se muestran en este trabajo sugieren que los genotipos de este polimorfismo no interfieren en la reparación del ADN debido a la homogeneidad de las frecuencias encontradas entre controles sanos y pacientes artrósicos.

En el caso de las enzimas SOD se estudió el polimorfismo **rs4880** del gen SOD2, el más común y estudiado en diversas poblaciones, que se caracteriza por una mutación estructural que substituye una timina por una citosina en el exón 2 y que afecta al codón 16, substituyendo una alanina por una valina (571,572), generando un cambio estructural en la enzima que disminuye la eficiencia de su transporte a las mitocondrias (572). La variante salvaje (C) es incorporada a la matriz mitocondrial de forma más rápida que la variante mutante (T), que se queda en la membrana interna mitocondrial (573). Se ha determinado que la variante salvaje genera un 30-40% más de enzima activa que la variante mutante, permitiendo una mayor eficacia detoxificadora, sugiriendo que el genotipo homocigoto salvaje es más eficaz en la detoxificación que el alelo mutante (574–576). En este trabajo, hemos buscado posibles interacciones entre el polimorfismo **rs4880** y los haplogrupos mitocondriales, observando que el homocigoto salvaje (CC) en combinación con el *cluster* no-TJ se encontraba más representado en los controles sanos que en los pacientes artrósicos, sin alcanzar una significancia estadística en ninguna de las cohortes analizadas. Los resultados obtenidos en este trabajo hacen pensar que el homocigoto salvaje proporciona una mayor capacidad de detoxificación ya que, en haplogrupos mitocondriales asociados a un mayor riesgo de artrosis, su frecuencia es mayor en controles sanos.

Un estudio realizado recientemente analizó la relación de los niveles séricos de la enzima SOD2 y los haplogrupos mitocondriales en la artrosis, mostrando un incremento significativo de la enzima en el suero de pacientes artrósicos y también, que los niveles de la enzima se incrementaban con un mayor grado radiográfico. En cuanto a los haplogrupos mitocondriales, no se encontró una



asociación significativa con los niveles séricos de esta enzima (195). Por otro lado se ha determinado que la variante salvaje de la enzima produce unos niveles cuatro veces superiores de proteína exógena y que su expresión génica es dos veces superior a la de la variante mutante (382), por tanto el incremento de los niveles de la enzima en suero puede estar relacionado con el genotipo de la enzima ya que, dependiendo del genotipo, los niveles de proteína exógena varían. Además, en cartílago artrósico se ha identificado una inhibición de la enzima a nivel génico y proteico en la capa superficial (192,193) lo que parece indicar que esta represión podría estar causada, más que por el genotipo del polimorfismo de la enzima SOD2, por causas inherentes a la propia enfermedad, como podría ser el estrés oxidativo.

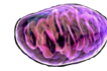
Otra de las enzimas incluidas en el sistema de detoxificación celular es la catalasa, que es capaz de eliminar alrededor del 60% del H_2O_2 generado por la célula, siendo la enzima mitocondrial más importante en prevenir el estrés oxidativo (577). Su alelo mutante (T) se ha asociado con una menor actividad enzimática comparado con el alelo salvaje (C), causando una menor actividad detoxificadora y generando un incremento en los niveles de ROS (173), sin embargo *Forsberg et al.* encontró unos niveles significativamente altos de catalasa en los sujetos con el alelo T (579) y *Gavalas et al.* relacionó el genotipo CC con una disminución significativa con la expresión de la enzima comparado con el resto de genotipos (580). En la patología artrósica se analizaron los niveles de la enzima catalasa en suero y aunque no se encontró una diferencia clara entre controles sanos y pacientes artrósicos, se determinó una diferencia que bordeó la significancia estadística entre los portadores del haplogrupo J y el resto de haplogrupos, presentando estos mayores niveles de catalasa (195). En un trabajo realizado en pacientes con artritis reumatoide se observó que el genotipo homocigoto mutante TT se asociaba de forma significativa con un menor proceso inflamatorio en comparación con pacientes portadores del genotipo homocigoto salvaje (305). En este estudio se ha determinado una asociación estadísticamente significativa para el genotipo homocigoto mutante TT con una mayor presencia en los controles sanos que en los enfermos en las cohortes de cadera estudiadas. En el caso de la cohorte de rodilla del OAI se determinó una interacción estadísticamente significativa entre alelo mutante (T) y los *clusters* TJ y HV asociado como un factor protector y de riesgo respectivamente.

Estos hallazgos siguen la línea de los resultados encontrados en los trabajos de *Forsberg et al.* y *Gavalas et al.* que relacionan el genotipo TT con una mayor expresión de la enzima, lo que sugiere una mayor actividad detoxificadora y

un menor proceso inflamatorio. De hecho, un artículo reciente muestra como la inducción de la expresión de CAT en ratones artrósicos disminuyó de forma significativa la destrucción del cartílago generando una artrosis menos severa, reforzando el papel del estrés oxidativo en la patología y la influencia de la enzima en esta enfermedad. En este mismo trabajo determinaron también que la sobre-expresión de CAT en la mitocondria se relaciona con pequeñas cantidades de la enzima en el citosol (581), lo que podría justificar los resultados encontrados en el estudio de la enzima en suero de pacientes artrósicos, donde no se encontró una asociación entre los pacientes y los controles sanos y reforzaría el papel del genotipo de la enzima encontrado en este trabajo, indicando una mayor expresión de la enzima para el genotipo TT.

La enzima GPX1 también forma parte del sistema de detoxificación celular y es, junto a la catalasa, una de las enzimas que se encargan de la eliminación del H_2O_2 (582). En este análisis se estudió el polimorfismo **rs105450**, que reside en la región codificante y produce una substitución aminoacídica de una prolina por una leucina; este cambio se asocia con la actividad de la enzima y se determinó que el alelo mutante (T) disminuía la actividad de la misma (583). En este trabajo se encontró una asociación estadísticamente significativa en el genotipo homocigoto salvaje (CC) con una mayor presencia en los pacientes artrósicos de la cohorte de cadera de Santiago, sin embargo, al no replicar esta asociación en la cohorte PROCOAC, las conclusiones al respecto deben ser tomadas con cautela. También se ha identificado una asociación significativa al comparar la interacción de los portadores del genotipo homocigoto salvaje (CC) con el *cluster* TJ y el HV en la cohorte de cadera PROCOAC. Estos resultados fueron replicados parcialmente en la cohorte de Santiago, ya que se identificó la misma asociación a nivel del *cluster* TJ), mientras que en el caso del *cluster* HV, con este mismo genotipo, la interacción bordeó la significancia estadística. Por tanto, esto sugiere que el factor protector frente a la artrosis recae principalmente en el *cluster* TJ, si bien, la disminución del riesgo de padecer la enfermedad se vería reforzada por el efecto aditivo del genotipo salvaje de GPX1.

Estos hallazgos van en la línea de los estudiado en una población china con la enfermedad osteoarticular degenerativa de Kashin-Beck, en la que ser portador del alelo mutante (T) incrementa el riesgo de padecer esta enfermedad (584). Por otro lado un estudio en cáncer determinó que los diferentes alelos de GPX1 presentan capacidades de detoxificación distintas frente a diferentes agentes oxidativos (585). También se ha descrito que la represión inducida del gen GPX1 no aumenta la sensibilidad al estrés oxidativo exógeno en la célula



sino que la expresión de este gen es inducida por un estrés reductor es decir, GPX1 está modulado por el estado redox celular. Un estado oxidativo activa el gen, aumentando la diferenciación condrogénica y la hipertrofia temprana en los condrocitos, mientras que un menor estrés oxidativo inhibe GPX1 (586,587). Además, un reciente estudio ha descrito una nueva función para esta enzima que es la de modular la función mitocondrial. La reducción de ROS por la sobre-expresión de GPX1 disminuye la formación de uniones proteicas de disulfuro dependientes de la mitocondria y disminuye el potencial de la membrana interna mitocondrial reduciendo la producción de ATP (588).

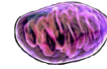
Esto sugiere que el metabolismo del *cluster* TJ podría modular la expresión de GPX1 inhibiendo o retrasando la degradación del cartílago y actuando como un factor protector en la artrosis. Esta asociación tiene su reflejo en los resultados del estudio funcional, en el que los portadores del genotipo CC y el *cluster* TJ muestran una menor producción de ROS que los pertenecientes al *cluster* HV, reforzando la hipótesis planteada sobre el efecto protector del *cluster* TJ y el efecto aditivo del genotipo de la enzima GPX1.

En la neutralización de ROS, las enzimas transforman el H_2O_2 en H_2O y O_2^- , el cual, si no es eliminado, puede reaccionar con el NO producido a concentraciones elevadas en la articulación artrósica, formando el radical ONOO⁻ (146). Este radical de nitrógeno es un potente oxidante que se une a residuos de tirosina en proteínas y forma 3-NT (165), que produce envejecimiento y favorece el desarrollo de la artrosis por el daño oxidativo (166). El NO es conocido por la inhibición de la síntesis de proteoglicanos y de colágeno (164), la activación de las MMPs, su implicación en la apoptosis celular, por promover respuestas inflamatorias en los condrocitos (161), y por controlar el consumo mitocondrial de oxígeno (589). En la articulación afectada, los procesos inflamatorios incrementan la producción de NO (162) y provocan la sobre-expresión de iNOS, que a su vez estimula la producción de citoquinas inflamatorias (163). La enzima iNOS, codificada por el gen NOS2A, es una enzima cuya expresión en células humanas es inducida por citoquinas como el IFN- γ , IL-1 β y el TNF- α (590), hipoxia y estrés oxidativo (591). También, se han descubierto mecanismos de regulación transcripcionales y post-transcripcionales para la inducción de la expresión génica de iNOS en diferentes tipos celulares (592). La enzima iNOS es la isoforma inducible con mayor capacidad de producción de NO y se creía que sólo se expresaba en condiciones patológicas (593). El gen NOS2A tiene una repetición en tándem muy polimórfica (CCTTT)_n que es funcionalmente importante en la regulación de la transcripción de iNOS (308,594). De hecho se ha considerado esta

repetición como un potenciador de la transcripción (*enhancer*) ya que cumple las dos características básicas de los *enhancers*: la capacidad de unirse a factores nucleares (595) y la independencia de la orientación o distancia al sitio de inicio de la transcripción (308). El aumento del espaciado asociado a las repeticiones crea flexibilidad en el ADN facilitando la interacción entre los factores nucleares flanqueantes, lo que sugiere que las repeticiones del pentanucleótido del gen NOS2A podrían afectar a la interacción del promotor del gen con factores nucleares o citoquinas como IFN- γ , IL-1 β y el TNF- α y sus vías de señalización (596).

En este trabajo, se ha determinado que el alelo más frecuente en las cohortes estudiadas es el de 12 repeticiones; estos datos coinciden con lo anteriormente publicado, indicando que esta repetición es la más común en la población Caucásica (595,597). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cohorte PROCOAC, donde los portadores del alelo con 11 repeticiones eran más frecuentes en pacientes artrósicos, mientras que los portadores del alelo con 13 repeticiones eran más comunes en sujetos radiológicamente sanos. Estos resultados fueron replicados parcialmente en la cohorte de Santiago, en la que se observó la asociación significativa a nivel del alelo de 13 repeticiones, más frecuente en el grupo sano. En el caso de la cohorte de rodilla del OAI no se encontraron diferencias significativas a nivel de los alelos. Por otro lado, se exploró la posible asociación de los genotipos de NOS2A con la enfermedad y se determinó una asociación significativa con el genotipo 12-13 como factor protector tanto para la artrosis de cadera como para la rodilla. Además, los análisis revelaron que el genotipo 11-12 tenía un comportamiento antagónico, mostrando una asociación significativa pero en este caso como factor de riesgo para la artrosis de cadera y rodilla. El análisis funcional realizado en condrocitos mostró que los portadores de 13 repeticiones producían más NO que los portadores de 11 repeticiones en medio con galactosa. En cuanto a los genotipos, los portadores del genotipo 12-13 producían mayores cantidades de NO al ser cultivados en medio con galactosa y frente al genotipo 11-12, diferencia que bordeó la significancia estadística.

Esto sugiere que la presencia de un alelo con 13 repeticiones actúa como un *enhancer* en condiciones de estrés oxidativo, aumentando la transcripción de la enzima iNOS. Se ha descrito que iNOS se encuentra sobre-expresada en la capa más superior del cartílago resultando en un exceso de NO que perpetúa la liberación de citoquinas y otros procesos catabólicos (163) y también se sabe que el NO tiene funciones en la regulación homeostática y en



mecanismos antiinflamatorios (598). Estudios en ratones usando inhibidores de NOS han sugerido que la producción de NO atenúa la inflamación intestinal (599) y experimentos en ratones *knockout* para iNOS han mostrado que son resistentes a la artrosis experimental (600). Para explicar esta dicotomía, la visión prevalente es que pequeñas cantidades de NO producidas bajo condiciones normales o condiciones inflamatorias agudas, la vía constitutiva de NOS puede actuar como un importante inhibidor endógeno de la inflamación; sin embargo, altos niveles de NO asociados a condiciones de inflamación crónica (vía iNOS) puede ser perjudicial (601). Por otro lado, un estudio en células cardíacas ha demostrado que un incremento moderado endógeno y prolongado de la enzima iNOS entre 2 y 3 veces más, lo que se correspondería con una sobre-expresión génica, otorga protección a las células cardíacas durante la isquemia promoviendo la respiración mitocondrial (602). Como se ha descrito previamente, esta enzima es específica de tejido (592) y afecta a la mitocondria (589), por tanto dependiendo del tipo celular estudiado puede ser que exista un patrón de expresión diferencial para iNOS así como niveles variables de producción de NO, lo que explicaría la variabilidad de los resultados encontrados y podría estar relacionado con el número de repeticiones presentes en el gen.

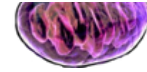
En el caso de la artrosis se ha descrito que iNOS se encuentra sobre-expresado (163) y que el líquido sinovial procedente de articulaciones de rodilla con artrosis presenta unos niveles altos de nitritos en comparación con articulaciones sanas (603), así como en artrosis primaria y también en plasma (604,605). Por otro lado, se ha publicado que iNOS funciona como una enzima constitutiva en determinadas condiciones fisiológicas (606), lo que sugiere que la mayor producción de NO asociado al alelo de 13 repeticiones actuaría como un mecanismo compensatorio para contrarrestar los efectos dañinos del NO protegiendo a la célula, y en el caso del alelo 11, que se ha descrito como bajos productores de NO (607), la menor producción no es suficiente para actuar como un inhibidor endógeno de la inflamación. De hecho, se ha postulado que las repeticiones largas generarían una versión más eficiente de la enzima iNOS capaz de desencadenar una producción mayor de NO para crear un mecanismo de defensa o inmunológico citotóxico inducible (608).

Estos resultados coinciden con distintos estudios en los que se describe una asociación del número de repeticiones con el riesgo de desarrollar ciertas patologías. Así, se ha encontrado que las repeticiones cortas representan un factor de riesgo para la demencia (597) y la artritis reumatoide (607), mientras

que las repeticiones largas representan un factor protector frente al desarrollo de cáncer de pulmón especialmente en no fumadores (608) y son un factor de riesgo en enfermedades como la acalasia (609). La mayoría de los estudios publicados realizan los análisis en base al número de repeticiones encontradas, englobándolas en dos grupos, repeticiones cortas (de 8 a 11 repeticiones) y largas (de 12 a 16 repeticiones) para buscar una asociación con la enfermedad. En este trabajo se pretendía determinar que alelo y qué genotipo se asociaban con la enfermedad. De esta forma, se ha determinado que el alelo con 13 repeticiones y el genotipo 12-13 es un factor protector frente al desarrollo de la artrosis, especialmente si se compara con el alelo de 11 repeticiones o el genotipo 11-12.

Capítulo 6
CONCLUSIONES





6.1 CONCLUSIONES

Las conclusiones relativas al objetivo 1 fueron las siguientes:

- Se han identificado 8 genes diferencialmente metilados entre cartílagos sanos y artrósicos de rodilla cuyo proceso biológico está relacionado con el estrés oxidativo: CASP8, EGLN1, GPX3, PKD2, SCARA3, PYCR1, IPCEF1 e INS
- El estatus de metilación de los 8 genes descritos se correlaciona inversamente con su expresión a nivel de los genes PKD2, SCARA3, GPX3, EGLN1 y PYCR1 en la artrosis de rodilla
- El gen KYNU está sobre-expresado en el cartílago articular independientemente de la articulación afectada
- La estimulación con IL1- β incrementa la expresión de los genes KYNU, LAPTM5, CYTIP, PLEK y MARCO en condrocitos en cultivo

Las conclusiones relativas al objetivo 2 fueron las siguientes:

- Los haplogrupos mitocondriales H y J inducen patrones de metilación y de expresión en cartílago que son específicos para cada haplogrupo
- Entre los procesos biológicos específicos de los haplogrupos H y J destaca una regulación diferencial de la apoptosis, siendo esta más activa en los portadores del haplogrupo H

Las conclusiones relativas al objetivo 3 fueron las siguientes:

- El genotipo TT del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT es un factor de protección en el desarrollo de la artrosis de cadera
- La combinación del alelo T del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT con el *cluster* mitocondrial TJ se asocia con un menor riesgo de artrosis de rodilla
- La combinación del alelo T del polimorfismo **rs1001179** del gen CAT con el *cluster* mitocondrial HV se asocia con un mayor riesgo de artrosis de rodilla
- La combinación del genotipo CC del polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1 con el *cluster* mitocondrial TJ se asocia con menor riesgo de artrosis de cadera pero no en la de rodilla
- La combinación del genotipo CC del polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1 con un *cluster* mitocondrial que no sea TJ se asocia con mayor riesgo de artrosis de cadera pero no en la de rodilla

Conclusiones

- La combinación del *cluster* TJ con el alelo C del polimorfismo **rs1050450** del gen GPX1 produce menos ROS totales que la combinación del *cluster* HV con este mismo alelo
- El genotipo 12-13 del microsatélite del gen NOS2A es un factor de protección y el genotipo 11-12 es un factor de riesgo en el desarrollo de la artrosis de cadera y rodilla
- Los condrocitos portadores del alelo de 13 repeticiones o del genotipo 12-13 del gen NOS2A producen más Óxido nítrico que los portadores del alelo de 11 repeticiones, o el resto de genotipos, cuando son cultivados en un medio con galactosa

Capítulo 7
BIBLIOGRAFÍA



7.1 BIBLIOGRAFÍA

1. Lane NE, Brandt K, Hawker G, Peeva E, Schreyer E, Tsuji W, et al. OARSI-FDA initiative: Defining the disease state of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2011;19(5):478–82.
2. Conaghan PG, Kloppenburg M, Schett G, Bijlsma JWJ. Osteoarthritis research priorities: a report from a EULAR ad hoc expert committee. *Ann Rheum Dis.* 2014 Jul 3;73(8):1442 LP-1445.
3. Felson DT. Osteoarthritis: priorities for osteoarthritis research: much to be done. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(8):447–8.
4. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(8):1233–41.
5. Gardner DL. Problems and paradigms in joint pathology*. *J Anat.* 1994;184(July 1993):465–76.
6. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;1(391 Suppl):S26–33.
7. Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, et al. Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis.* 2014 Dec 4;74(1):275 LP-284.
8. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *Br Med Bull.* 2008;87(1):77–95.
9. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009;1(6):461–8.
10. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 1986;29(8):1039–49.
11. Roach HI, Aigner T, Soder S, Haag J, Welkerling H. Pathobiology of osteoarthritis: pathomechanisms and potential therapeutic targets. *Curr Drug Targets.* 2007 Feb;8(2):271–82.
12. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment os osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1956;16(3):494–502.
13. Wesseling J, Bierma-Zeinstra SMA, Kloppenburg M, Meijer R, Bijlsma JWJ. Worsening of pain and function over 5 years in individuals with “early” OA is related to structural damage: data from the Osteoarthritis Initiative and CHECK (Cohort Hip & Cohort Knee) study. *Ann Rheum Dis.* 2013 Nov 15;
14. Finan PH, Buenaver LF, Bounds SC, Hussain S, Park RJ, Haque UJ, et al. Discordance Between Pain and Radiographic Severity in Knee Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*

- 2013;65(2).
15. Altman RD, Gold GM. Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised 1. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15:Supple A:A1-56.
 16. Reumatología. SE de. Artrosis : fisiopatología, diagnóstico y tratamiento / Sociedad Española de Reumatología. 2010. p. 560.
 17. Carmona L, Gabriel R, Ballina J, Laffon A, Grupo de Estudio EPISER. Proyecto EPISER 2000: prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española. *Rev Española Reumatol.* 2001;28(1):18-25.
 18. Castaño Carou A, Pita Fernández S, Pértega Díaz S, de Toro Santos FJ, Sánchez JR, Botaya RM, et al. Perfil clínico, grado de afectación y manejo terapéutico de pacientes con artrosis en atención primaria: Estudio multicéntrico nacional EVALÚA. *Reumatol Clin.* 2015;11(6):353-60.
 19. Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: A systematic review. *Osteoarthr Cartil.* 2011;19(11):1270-85.
 20. Cross M, Smith E, Hoy D, Nolte S, Ackerman I, Fransen M, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis.* 2014 Feb 19;
 21. Bustabad S, Díaz-gonzález F. Estudio EPISER 2016 . El porqué de un nuevo estudio epidemiológico EPISER 2016 study : Why another epidemiological study ? 2017;13(1):1-3.
 22. Jobanputra P. Rheumatology in general practice [letter]. *Br J Rheumatol.* 1988;27(4):332-3.
 23. Puig-Junoy J, Ruiz Zamora A. Socio-economic costs of osteoarthritis: A systematic review of cost-of-illness studies. *Semin Arthritis Rheum.* 2015;44(5):531-41.
 24. Loza E, Lopez-Gomez JM, Abasolo L, Maese JJ, Carmona L, Batlle-Gualda E. Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. *Arthritis Rheum.* 2009;61(2):158-65.
 25. Hunter DJ, Schofield D, Callander E. The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(7):1-5.
 26. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 2003;81(9):646-56.
 27. Garstang S V, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil.* 2006;85(11 Suppl):S2-NaN-S14.
 28. Litwic A, Registrar S, Edwards M, Clinical M. Europe PMC Funders Group Epidemiology and Burden of Osteoarthritis. 2013;44(0):185-99.
 29. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. the framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 1987;30(8):914-8.
 30. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman BN, Aliabadi P, et al. The



- incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly, the framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 1995;38(10):1500–5.
31. Boyan BD, Tosi LL, Coutts RD, Enoka RM, Hart DA, Nicoletta DP, et al. Addressing the gaps: sex differences in osteoarthritis of the knee. *Biol Sex Differ.* 2013;4(1):4.
 32. Fernández-Caggiano M, Barallobre-Barreiro J, Rego-Pérez I, Crespo-Leiro MG, Paniagua MJ, Grill Z, et al. Mitochondrial Haplogroups H and J: Risk and Protective Factors for Ischemic Cardiomyopathy. *PLoS One.* 2012;7(8):1–7.
 33. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2005;13(9):769–81.
 34. Maleki-Fischbach M, Jordan JM. New developments in osteoarthritis. Sex differences in magnetic resonance imaging-based biomarkers and in those of joint metabolism. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(4):212.
 35. Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM. Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum.* 1995;38(8):1134–41.
 36. Zhang Y and MJM. Epidemiology of Osteoarthritis. *clin Geriatr Med.* 2010;26(3):355–69.
 37. Chaganti RK, Lane NE. Risk factors for incident osteoarthritis of the hip and knee. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2011;4(3):99–104.
 38. Nelson AE, Golightly YM, Renner JB, Schwartz TA, Kraus VB, Helmick CG, et al. NIH Public Access. 2014;65(2):373–7.
 39. Foley B, Cleveland RJ, Renner JB, Jordan JM, Nelson AE. Racial differences in associations between baseline patterns of radiographic osteoarthritis and multiple definitions of progression of hip osteoarthritis: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Res Ther.* 2015;17:366.
 40. Zhang Y, Terkeltaub R, Nevitt M, Xu L, Neogi T, Aliabadi P, et al. Lower prevalence of chondrocalcinosis in Chinese subjects in Beijing than in white subjects in the United States: The Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 2006;54(11):3508–12.
 41. Fernández-Moreno M, Rego I, Carreira-García V, Blanco FJ. Genetics in osteoarthritis. *Curr Genomics.* 2008;9(8):542–7.
 42. Warner S, Valdes A. The Genetics of Osteoarthritis: A Review. *J Funct Morphol Kinesiol.* 2016;1(1):140–53.
 43. Abel K, Reneland R, Kammerer S, Mah S, Hoyal C, Cantor CR, et al. Genome-wide SNP association: Identification of susceptibility alleles for osteoarthritis. Vol. 5, *Autoimmunity Reviews.* 2006. p. 258–63.
 44. Riley JH, Allan CJ, Lai E, Roses A. The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes. *Pharmacogenomics.* 2000 Feb;1(1):39–47.

45. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, et al. Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol.* 2001;153(1):87–99.
46. Blanco FJ, Ruiz-Romero C. New targets for disease modifying osteoarthritis drugs: chondrogenesis and Runx1. *Ann Rheum Dis.* 2013 Apr 4;72(5):631 LP-634.
47. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, et al. Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2462–70.
48. Gelse K, Ekici AB, Cipa F, Swoboda B, Carl HD, Olk A, et al. Molecular differentiation between osteophytic and articular cartilage - clues for a transient and permanent chondrocyte phenotype. *Osteoarthr Cartil.* 2012;20(2):162–71.
49. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, et al. C/EBPB and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2alpha as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet.* 2012;21(5):1111–23.
50. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre G V, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science (80-).* 1996;273(5275):613–22.
51. Alvarez J, Sohn P, Zeng X, Doetschman T, Robbins DJ, Serra R. TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Development.* 2002;129(8):1913–24.
52. Serra R, Karaplis A, Sohn P. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J Cell Biol.* 1999;145(4):783–94.
53. Chen CG, Thuillier D, Chin EN, Alliston T. Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses Runx2-inducible matrix metalloproteinase 13 expression to maintain articular cartilage and prevent osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(10):3278–89.
54. Settle SH, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse Gdf6 and Gdf5 genes. *Dev Biol.* 2003;254(1):116–30.
55. Valdes a M, Spector TD, Doherty S, Wheeler M, Hart DJ, Doherty M. Association of the DVWA and GDF5 polymorphisms with osteoarthritis in UK populations. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(12):1916–20.
56. Egli RJ, Southam L, Wilkins JM, Lorenzen I, Pombo-Suarez M, Gonzalez A, et al. Functional analysis of the osteoarthritis susceptibility-associated GDF5 regulatory polymorphism. *Arthritis Rheum.* 2009;60(7):2055–64.
57. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, et al. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet.* 2007;39(4):529–33.
58. Southam L, Rodriguez-Lopez J, Wilkins JM, Pombo-Suarez M, Snelling S, Gomez-Reino JJ,



- et al. An SNP in the 5'-UTR of GDF5 is associated with osteoarthritis susceptibility in Europeans and with in vivo differences in allelic expression in articular cartilage. *Hum Mol Genet.* 2007;16(18):2226–32.
59. Chapman K, Takahashi A, Meulenbelt I, Watson C, Rodriguez-lopez J, Egli R, et al. A meta-analysis of European and Asian cohorts reveals a global role of a functional SNP in the 5' UTR of GDF5 with osteoarthritis susceptibility. *Hum Mol Genet.* 2008;17(10):1497–504.
 60. Tsumaki N, Tanaka K, Arikawa-Hirasawa E, Nakase T, Kimura T, Terrig Thomas J, et al. Role of CDMP-1 in skeletal morphogenesis: Promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation. *J Cell Biol.* 1999;144(1):161–73.
 61. Coleman CM, Tuan RS. Growth/differentiation factor 5 enhances chondrocyte maturation. *Dev Dyn.* 2003;228(2):208–16.
 62. Wang T, Liang Y, Li H, Li H, He Q, Xue Y, et al. Single Nucleotide Polymorphisms and Osteoarthritis. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(7):e2811.
 63. Schneider EM, Du W, Fiedler J, Hogel J, Gunther KP, Brenner H, et al. The (-765 G-->C) promoter variant of the COX-2/PTGS2 gene is associated with a lower risk for end-stage hip and knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Aug;70(8):1458–60.
 64. He Y, Liang X, Wu X, Meng C, Wu B, Fu D, et al. Association between interleukin 8 -251 A/T and +781 C/T polymorphisms and osteoarthritis risk. *Immunol Lett.* 2014 Nov;162(1 Pt A):207–11.
 65. Fernandez-Torres J, Hernandez-Diaz C, Espinosa-Morales R, Camacho-Galindo J, Galindo-Sevilla N del C, Lopez-Macay A, et al. Polymorphic variation of hypoxia inducible factor-1 A (HIF1A) gene might contribute to the development of knee osteoarthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015 Aug;16:218.
 66. Okuda T, Mita S, Yamauchi S, Matsubara T, Yagi F, Yamamori D, et al. Molecular cloning, expression, and chromosomal mapping of human chondroitin 4-sulfotransferase, whose expression pattern in human tissues is different from that of chondroitin 6-sulfotransferase. *J Biochem.* 2000;128(5):763–70.
 67. Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. Vol. 72, *Chemical Biology and Drug Design.* 2008. p. 455–82.
 68. Consortium O, Collaborators O. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet.* 2012;380(12):815–23.
 69. Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, Brittberg M, Pruss A, Sittlinger M, et al. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18(4):581–92.
 70. Xu Y, Barter MJ, Swan DC, Rankin KS, Rowan AD, Santibanez-Koref M, et al. Identification of the pathogenic pathways in osteoarthritic hip cartilage: Commonality and discord between hip and knee OA. *Osteoarthr Cartil.* 2012;20(9):1029–38.
 71. Wang J, Zhang C, Wu SG, Shang C, Huang L, Zhang T, et al. Additional Evidence Supports Association of Common Variants in COL11A1 with Increased Risk of Hip Osteoarthritis

- Susceptibility. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2017 Feb;21(2):86–91.
72. Pufe T, Kurz B, Petersen W, Varoga D, Mentlein R, Kulow S, et al. The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the bone and joint system. *Ann Anat*. 2005;187(5–6):461–72.
 73. Ludin A, Sela JJ, Schroeder A, Samuni Y, Nitzan DW, Amir G. Injection of vascular endothelial growth factor into knee joints induces osteoarthritis in mice. *Osteoarthr Cartil*. 2013;21(3):491–7.
 74. Rodríguez-Fontenla C, Calaza M, Evangelou E, Valdes AM, Arden N, Blanco FJ, et al. Assessment of osteoarthritis candidate genes in a meta-analysis of nine genome-wide association studies. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(4):940–9.
 75. Evangelou E, Chapman K, Meulenbelt I, Karassa FB, Loughlin J, Carr A, et al. Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis Rheum*. 2009 Jun;60(6):1710–21.
 76. Kerkhof HJM, Lories RJ, Meulenbelt I, Jonsdottir I, Valdes AM, Arp P, et al. A genome-wide association study identifies an osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 7q22. *Arthritis Rheum*. 2010;62(2):499–510.
 77. Evangelou E, Valdes a M, Kerkhof HJM, Styrkarsdottir U, Zhu YY, Meulenbelt I, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(2):349–55.
 78. Day-Williams AG, Southam L, Panoutsopoulou K, Rayner NW, Esko T, Estrada K, et al. A variant in MCF2L is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet*. 2011 Sep;89(3):446–50.
 79. Barter MJ, Bui C, Young DA. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. Vol. 20, *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012. p. 339–49.
 80. Castaño Betancourt MC, Cailotto FF, Kerkhof HJ, Cornelis FMF, Doherty SA, Hart DJ, et al. Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(21):8218–23.
 81. Castano-Betancourt MC, Evans DS, Ramos YFM, Boer CG, Mestrus S, Liu Y, et al. Novel Genetic Variants for Cartilage Thickness and Hip Osteoarthritis. *PLoS Genet*. 2016 Oct;12(10):e1006260.
 82. Rego-Perez I, Fernández-Moreno M, Soto-Hermida A, Fernández-López C, Oreiro N, Blanco FJ. Mitochondrial genetics and osteoarthritis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2013 Jan;5:360–8.
 83. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Oreiro N, Fernández-López C, Pértega S, Cortés-Pereira E, et al. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups influence the progression of knee osteoarthritis. Data from the osteoarthritis initia(OAI). *PLoS One*. 2014;9(11).
 84. Fernández-Moreno M, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, Cortés-Pereira E, Relação S, Hermida-Gómez T, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of incident



- knee osteoarthritis in OAI and CHECK cohorts. A meta-analysis and functional study. *Ann Rheum Dis*. 2016;annrheumdis-2016-210131.
85. Valdes AM, Lories RJ, van Meurs JB, Kerkhof H, Doherty S, Hofman A, et al. Variation at the ANP32A gene is associated with risk of hip osteoarthritis in women. *Arthritis Rheum*. 2009 Jul;60(7):2046–54.
86. Zeggini E, Panoutsopoulou K, Southam L, Rayner NW, Day-Williams AG, Lopes MC, et al. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet (London, England)*. 2012 Sep;380(9844):815–23.
87. Mototani H, Iida A, Nakamura Y, Ikegawa S. Identification of sequence polymorphisms in CALM2 and analysis of association with hip osteoarthritis in a Japanese population. *J Bone Miner Metab*. 2010 Sep;28(5):547–53.
88. Panoutsopoulou K, Southam L, Elliott KS, Wrayner N, Zhai G, Beazley C, et al. Insights into the genetic architecture of osteoarthritis from stage 1 of the arcOGEN study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(5):864–7.
89. Nakki A, Videman T, Kujala UM, Suhonen M, Mannikko M, Peltonen L, et al. Candidate gene association study of magnetic resonance imaging-based hip osteoarthritis (OA): evidence for COL9A2 gene as a common predisposing factor for hip OA and lumbar disc degeneration. *J Rheumatol*. 2011 Apr;38(4):747–52.
90. Meulenbelt I, Chapman K, Dieguez-Gonzalez R, Shi D, Tsezou A, Dai J, et al. Large replication study and meta-analyses of DVWA as an osteoarthritis susceptibility locus in European and Asian populations. *Hum Mol Genet*. 2009;18(8):1518–23.
91. Limer KL, Tosh K, Bujac SR, McConnell R, Doherty S, Nyberg F, et al. Attempt to replicate published genetic associations in a large, well-defined osteoarthritis case-control population (the GOAL study). *Osteoarthr Cartil*. 2009 Jun;17(6):782–9.
92. Evans DS, Cailotto F, Parimi N, Valdes AM, Castano-Betancourt MC, Liu Y, et al. Genome-wide association and functional studies identify a role for IGFBP3 in hip osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Oct;74(10):1861–7.
93. Wang L, Guo L, Tian F, Hao R, Yang T. Analysis of single nucleotide polymorphisms within ADAM12 and risk of knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Biomed Res Int*. 2015;2015:518643.
94. Liang W, Gao B, Xu G, Weng D, Xie M, Qian Y. Association between single nucleotide polymorphisms of asporin (ASPN) and BMP5 with the risk of knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Dec;70(3):1603–8.
95. Ikeda T, Mabuchi A, Fukuda A, Kawakami A, Ryo Y, Yamamoto S, et al. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in cartilage-specific collagen genes with knee and hip osteoarthritis in the Japanese population. *J Bone Miner Res*. 2002 Jul;17(7):1290–6.
96. Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M, Ozaki K, Sudo A, Kotani A, et al. Common variants in DVWA on chromosome 3p24.3 are associated with susceptibility to knee osteoarthritis. *Nat Genet*. 2008 Aug;40(8):994–8.

97. Ren Y, Tan B, Yan P, You Y, Wu Y, Wang Y. Association between polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene and osteoarthritis susceptibility: a meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015 Feb;16:44.
98. Lee SW, Song JH, Choi WS, Yoon JH, Kim O, Park YG, et al. The single nucleotide polymorphism (SNP) of the estrogen receptor-beta gene, rs1256049, is associated with knee osteoarthritis in Korean population. *Knee*. 2014 Jan;21(1):242–6.
99. Zhang R, Yao J, Xu P, Ji B, Luck J V, Chin B, et al. A comprehensive meta-analysis of association between genetic variants of GDF5 and osteoarthritis of the knee, hip and hand. *Inflamm Res*. 2015 Jun;64(6):405–14.
100. Luo S-X, Li S, Zhang X-H, Zhang J-J, Long G-H, Dong G-F, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-16 and risk of knee osteoarthritis. *PLoS One*. 2015;10(5):e0123442.
101. Han L, Lee HS, Yoon JH, Choi WS, Park YG, Nam SW, et al. Association of IL-17A and IL-17F single nucleotide polymorphisms with susceptibility to osteoarthritis in a Korean population. *Gene*. 2014 Jan;533(1):119–22.
102. Fernandes MTP, Fernandes KBP, Marquez AS, Colus IMS, Souza MF, Santos JPM, et al. Association of interleukin-6 gene polymorphism (rs1800796) with severity and functional status of osteoarthritis in elderly individuals. *Cytokine*. 2015 Oct;75(2):316–20.
103. Nakki A, Rodriguez-Fontenla C, Gonzalez A, Harilainen A, Leino-Arjas P, Heliovaara M, et al. Association study of MMP8 gene in osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. 2016;57(1):44–52.
104. Cui L, Li G, Zhong W, Bian Y, Su S, Sheng Y, et al. Polycystic ovary syndrome susceptibility single nucleotide polymorphisms in women with a single PCOS clinical feature. *Hum Reprod*. 2015 Mar;30(3):732–6.
105. Valdes AM, Spector TD, Tamm A, Kisand K, Doherty SA, Dennison EM, et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010 Aug;62(8):2347–52.
106. Etokebe GE, Jotanovic Z, Mihelic R, Mulac-Jericevic B, Nikolic T, Balen S, et al. Susceptibility to large-joint osteoarthritis (hip and knee) is associated with BAG6 rs3117582 SNP and the VNTR polymorphism in the second exon of the FAM46A gene on chromosome 6. *J Orthop Res*. 2015 Jan;33(1):56–62.
107. Zhu Z-H, Jin X, Zhang W, Chen M, Ye D-Q, Zhai Y, et al. Associations between vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis: an updated meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Jun;53(6):998–1008.
108. Cong Y, Ru J-Y, Bao N-R, Guo T, Zhao J-N. A single nucleotide polymorphism in the TGF-beta1 gene (rs1982073 C>T) may contribute to increased risks of bone fracture, osteoporosis, and osteoarthritis: a meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2016 Apr;35(4):973–85.
109. Nakajima M, Takahashi A, Kou I, Rodriguez-Fontenla C, Gomez-Reino JJ, Furuichi T, et al. New sequence variants in HLA Class II/III region associated with susceptibility to knee Osteoarthritis identified by genome-wide association study. *PLoS One*. 2010;5(3):1–6.



110. King LK, March L, Anandacoomarasamy A. Obesity & osteoarthritis. Vol. 138, Indian Journal of Medical Research. 2013. p. 185–93.
111. Jiang L, Tian W, Wang Y, Rong J, Bao C, Liu Y, et al. Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2012;79(3):291–7.
112. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery a, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):24–33.
113. Grotle M, Hagen KB, Natvig B, Dahl FA, Kvien TK. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskeletal Disord*. 2008;9(132):1–5.
114. L.S. L, M.G. DV, J. R, P.M. N, G. E. Incidence of severe knee and hip osteoarthritis in relation to different measures of body mass: A population-based prospective cohort study. Vol. 68, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009. p. 490–6.
115. Yusuf E, Nelissen RG, Ioan-Facsinay A, Stojanovic-Susulic V, DeGroot J, van Osch G, et al. Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(4):761–5.
116. Thijssen E, van Caam A, van der Kraan PM. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. Vol. 54, *Rheumatology (Oxford, England)*. 2015. p. 588–600.
117. Berenbaum F, Eymard F, Houard X. Osteoarthritis, inflammation and obesity. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(1):114–8.
118. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthr Cartil*. 2013;21(1):16–21.
119. Reyes C, Leyland KM, Peat G, Cooper C, Arden NK, Prieto-Alhambra D. Association Between Overweight and Obesity and Risk of Clinically Diagnosed Knee, Hip, and Hand Osteoarthritis: A Population-Based Cohort Study. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2016;68(8):1869–75.
120. Palmer KT. Occupational activities and osteoarthritis of the knee. Vol. 102, *British Medical Bulletin*. 2012. p. 147–70.
121. Jensen LK. Hip osteoarthritis: influence of work with heavy lifting, climbing stairs or ladders, or combining kneeling/squatting with heavy lifting. *Occup Environ Med*. 2007 Dec 18;65(1):6 LP-19.
122. Hui M, Doherty M, Zhang W. Does smoking protect against osteoarthritis? Meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1231–7.
123. Ding C, Cicuttini F, Blizzard L, Jones G. Smoking interacts with family history with regard to change in knee cartilage volume and cartilage defect development. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1521–8.

124. Ding C, Cicuttini F, Blizzard L, Jones G. Smoking interacts with family history with regard to change in knee cartilage volume and cartilage defect development. *Arthritis Rheum.* 2007 May;56(5):1521–8.
125. Spector TD, Harris PA, Hart DJ, Cicuttini FM, Nandra D, Etherington J, et al. Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: A radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis Rheum.* 1996;39(6):988–95.
126. Hyldahl RD, Evans A, Kwon S, Ridge ST, Robinson E, Hopkins JT, et al. Running decreases knee intra-articular cytokine and cartilage oligomeric matrix concentrations: a pilot study. *Eur J Appl Physiol.* 2016 Dec;116(11–12):2305–14.
127. Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, Roos H. High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum.* 2004 Oct;50(10):3145–52.
128. Wang Y, Simpson JA, Wluka AE, Teichtahl AJ, English DR, Giles GG, et al. Is physical activity a risk factor for primary knee or hip replacement due to osteoarthritis? A prospective cohort study. *J Rheumatol.* 2011;38(2):350–7.
129. Niemi A-K, Majamaa K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(8):965–9.
130. Timmins KA, Leech RD, Batt ME, Edwards KL. Running and Knee Osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 2016 Aug;363546516657531.
131. Arden N, Blanco F, Cooper C, Guermazi A, Hayashi D, Hunter D, et al. Atlas of Osteoarthritis. *Atlas Osteoarthr.* 2014;90.
132. Riancho JA, Garcia-Ibarbia C, Gravani A, Raine E V, Rodriguez-Fontenla C, Soto-Hermida A, et al. Common Variations In Estrogen-Related Genes Are Associated With Severe Large Joint Osteoarthritis: A Multicenter Genetic And Functional Study. *Osteoarthr Cartil.* 2010;
133. Claassen H, Schünke M, Kurz B. Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. *Cell Tissue Res.* 2005;319(3):439–45.
134. Linn S, Murtaugh B, Casey E. Role of Sex Hormones in the Development of Osteoarthritis. *PM R.* 2012;4(5 SUPPL.).
135. Nevitt MC, Felson DT. Sex hormones and the risk of osteoarthritis in women: epidemiological evidence. *Ann Rheum Dis.* 1996;55(9):673–6.
136. Nevitt MC, Zhang Y, Javaid MK, Neogi T, Curtis JR, Niu J, et al. High systemic bone mineral density increases the risk of incident knee OA and joint space narrowing, but not radiographic progression of existing knee OA: the MOST study. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(1):163–8.
137. Barbour KE, Murphy LB, Helmick CG, Hootman JM, Renner JB, Jordan JM. Bone Mineral Density and the Risk of Hip and Knee Osteoarthritis: The Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2017 Jan;



138. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82:291–5.
139. T F, NJ H. Biology of ageing. *Nature.* 2000;408(November):112–6.
140. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11(3):298–300.
141. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049–55.
142. Ku HH, Brunk UT, Sohal RS. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med.* 1993;15(6):621–7.
143. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? Vol. 26, *Free Radical Biology and Medicine.* 1999. p. 1034–53.
144. Gibson JS, Milner PI, White R, Fairfax TPA, Wilkins RJ. Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: Modulators of ionic homeostasis. Vol. 455, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* 2008. p. 563–73.
145. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules.* Vol. 17, *BioEssays.* 1995. p. 1039–48.
146. Davies CM, Guilak F, Weinberg JB, Fermor B. Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(5):624–30.
147. Lane JM, Brighton CT, Menkowitz BJ. Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage. *J Rheumatol.* 1977;4(4):334–42.
148. Agarwal S, Deschner J, Long P, Verma A, Hofman C, Evans CH, et al. Role of NF- κ B transcription factors in antiinflammatory and proinflammatory actions of mechanical signals. *Arthritis Rheum.* 2004;50(11):3541–8.
149. Guilak F, Butler DL, Goldstein SA. Functional tissue engineering: the role of biomechanics in articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(391 Suppl):S295–305.
150. Del Carlo M, Loeser RF. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum.* 2002;46(2):394–403.
151. Horton WE, Feng L, Adams C. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. Vol. 17, *Matrix Biology.* 1998. p. 107–15.
152. Kurz B, Lemke A, Kehn M, Domm C, Patwari P, Frank EH, et al. Influence of Tissue Maturation and Antioxidants on the Apoptotic Response of Articular Cartilage after Injurious Compression. *Arthritis Rheum.* 2004;50(1):123–30.
153. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JPL. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. Vol. 11, *Osteoarthritis and Cartilage.* 2003. p. 747–55.
154. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and

- superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 2007;74(4):324–9.
155. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. Vol. 567, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 2004. p. 1–61.
 156. Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. Vol. 64, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007. p. 2202–10.
 157. Kikuchi H, Furuta A, Nishioka KI, Suzuki SO, Nakabeppu Y, Iwaki T. Impairment of mitochondrial DNA repair enzymes against accumulation of 8-oxo-guanine in the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2002;103(4):408–14.
 158. Jaiswal M, LaRusso NF, Shapiro RA, Billiar TR, Gores GJ. Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. *Gastroenterology*. 2001;120(1):190–9.
 159. Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, et al. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54(11):3533–44.
 160. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Vol. 333, *Nature*. 1988. p. 664–6.
 161. Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthr Cartil*. 2008;16(SUPPL. 2).
 162. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*. 1995;146(1):75–85.
 163. Amin A, Di Cesare P, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar T, et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 1995;182(6):2097–102.
 164. Taskiran D, Stefanovicracic M, Georgescu H, Evans C. Nitric-Oxide Mediates Suppression of Cartilage Proteoglycan Synthesis by Interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200(1):142–8.
 165. Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2000;275(42):32460–6.
 166. Loeser RF, Carlson CS, Del Carlo M, Cole A. Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1?? and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum*. 2002;46(9):2349–57.
 167. Curtis JF, Reddy NG, Mason RP, Kalyanaraman B, Eling TE. Nitric oxide: a prostaglandin H synthase 1 and 2 reducing cosubstrate that does not stimulate cyclooxygenase activity or prostaglandin H synthase expression in murine macrophages. *Arch Biochem Biophys*. 1996;335(2):369–76.
 168. Nédélec E, Abid A, Cipolletta C, Presle N, Terlain B, Netter P, et al. Stimulation of cyclooxygenase-2-activity by nitric oxide-derived species in rat chondrocyte: Lack of



- contribution to loss of cartilage anabolism. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(8):965–78.
169. Maneiro E, López-Armada MJ, de Andres MC, Caramés B, Martín MA, Bonilla A, et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(3):388–95.
 170. Fernández-Moreno M, Tamayo M, Soto-Hermida A, Mosquera A, Oreiro N, Fernández-López C, et al. mtDNA haplogroup J Modulates telomere length and Nitric Oxide production. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12(1):283.
 171. Rego-perez I, Fernandez-moreno M, Soto-hermida A, Fenandez-lopez C, Oreiro N, Blanco FJ. Mitochondrial genetics and osteoarthritis. *Front Biosci (Schol Ed).* 2013;5:360–8.
 172. Taanman J-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 1999;1410:103–23.
 173. Van Den Heuvel L, Smeitink J. The oxidative phosphorylation (OXPHOS) system: Nuclear genes and human genetic diseases. Vol. 23, *BioEssays.* 2001. p. 518–25.
 174. Wallace DC. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem.* 2007;76(1):781–821.
 175. Werner J. H Koopman, Peter HGM Willems JAMS. Mechanisms of Disease Monogenic Mitochondrial Disorders. *N Engl J Med.* 2012;366:1132–41.
 176. Wallace DC, Fan W. ENERGETICS, EPIGENETICS, MITOCHONDRIAL GENETICS. 2010;10(1):12–31.
 177. Reed KN, Wilson G, Pearsall A, Grishko VI. The role of mitochondrial reactive oxygen species in cartilage matrix destruction. *Mol Cell Biochem.* 2014;397(1–2):195–201.
 178. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12(5):913–22.
 179. Blanco FJ, López-Armada MJ, Maneiro E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion.* 2004;4(5–6 SPEC. ISS.):715–28.
 180. Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(3):161–9.
 181. Johnson K, Jung A, Murphy A, Andreyev A, Dykens J, Terkeltaub R. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum.* 2000;43(7):1560–70.
 182. Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A, Ghosh S. Invited review: The mitochondrion in osteoarthritis. Vol. 1, *Mitochondrion.* 2002. p. 301–19.
 183. Maneiro E, Martín MA, de Andres MC a C, López-Armada MJ, Fernández-Sueiro JL, del Hoyo P, et al. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2003;48(3):700–8.
 184. Ruiz-Romero C, Calamia V, Rocha B, Mateos J, Fernández-Puente P, Blanco FJ. Hypoxia conditions differentially modulate human normal and osteoarthritic chondrocyte

- proteomes. *J Proteome Res.* 2010;9(6):3035–45.
185. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt 2):335–44.
186. Cillero-Pastor B, Carames B, Lires-Dean M, Vaamonde-Garcia C, Blanco FJ, Lopez-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction activates cyclooxygenase 2 expression in cultured normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2008;58(8):2409–19.
187. Tomita M, Sato EF, Nishikawa M, Yamano Y, Inoue M. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2001;44(1):96–104.
188. López-Armada MJ, Caramés B, Martín MA, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Fuentes-Boquete I, et al. Mitochondrial activity is modulated by TNF α and IL-1 β in normal human chondrocyte cells. *Osteoarthr Cartil.* 2006;14(10):1011–22.
189. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006;443(7113):787–95.
190. Zapico SC, Ubelaker DH. mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. *Aging Dis.* 2013;4(6):364–80.
191. Kokoszka JE, Coskun P, Esposito L a, Wallace DC. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2278–83.
192. Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martínez-Gomariz M, Fernández M, et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(1):172–89.
193. Scott JL, Gabrielides C, Davidson RK, Swingler TE, Clark IM, Wallis GA, et al. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(8):1502–10.
194. Gavriilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, Taylor RW, Young DA. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum.* 2013 Feb;65(2):378–87.
195. Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Pertega S, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Rego-Perez I, et al. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups and serum levels of anti-oxidant enzymes in patients with osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12(1):264.
196. De Andrés MC, Maneiro E, Martín MA, Arenas J, Blanco FJ. Nitric oxide compounds have different effects profiles on human articular chondrocyte metabolism. *Arthritis Res Ther.* 2013;15:R115.
197. Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Iv AWP, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes z Department of Cell Biology and Neuroscience , University of South Alabama , College of Medicine ,. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18(3):424–32.



198. Dave M, Attur M, Palmer G, Al-Mussawir HE, Kennish L, Patel J, et al. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis Rheum.* 2008;58(9):2786–97.
199. Landis WJ. Application of electron probe X-ray microanalysis to calcification studies of bone and cartilage. *Scan Electron Microsc.* 1979;(2):555–70.
200. Shapiro IM, Golub EE, Kakuta S, Hazelgrove J, Havery J, Chance B, et al. Initiation of endochondral calcification is related to changes in the redox state of hypertrophic chondrocytes. *Science* (80-). 1982;217(4563):950–2.
201. Grishko VI, Ho R, Wilson GL, Pearsall a W. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(1):107–13.
202. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. [Review] [59 refs]. *Science* (80-). 1998;281(August):1309–12.
203. Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. Vol. 252, *European Journal of Biochemistry.* 1998. p. 1–15.
204. Zamzami BN, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssi J, Petit PX, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med.* 1995;181(May):1661–72.
205. Kim H a, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets.* 2007;8:333–45.
206. L. W, L. L, H. L, Q. C, H. L. Mitochondrial pathology in Osteoarthritic chondrocytes. Vol. 15, *Current Drug Targets.* 2014. p. 710–9.
207. Fernández-Moreno M, Soto-Hermida A, Oreiro N, Pértega S, Fenández-López C, Rego-Pérez I, et al. Mitochondrial haplogroups define two phenotypes of osteoarthritis. *Front Physiol.* 2012;3 MAY(May):1–8.
208. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups: Role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(8):2387–96.
209. Anderson S, Bankier A, Barrell B, de Bruijn M, Coulson A, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457–65.
210. Coskun PE, Ruiz-Pesini EE, Wallace DC. Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation and a forensic conundrum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2174–6.
211. Wallace DC. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen.* 2010;51(5):440–50.
212. Ankel-Simons F, Cummins JM. Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: Implications for theories on human evolution. *Trans Kansas Acad Sci.* 1996;93:13859–63.

213. Whelan SP, Zuckerbraun BS. Mitochondrial signaling: Forwards, backwards, and in between. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013.
214. Malyarchuk BA, Rogozin IB, Berikov VB, Derenko M V. Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. *Hum Genet*. 2002;111(1):46–53.
215. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 1988;331(6158):717–9.
216. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, et al. Classification of european mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*. 1996;144(4):1835–50.
217. Ienco EC, Simoncini C, Orsucci D, Petrucci L, Filosto M, Mancuso M, et al. May “mitochondrial eve” and mitochondrial haplogroups play a role in neurodegeneration and Alzheimer’s disease? *Int J Alzheimers Dis*. 2011;2011:709061.
218. Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, et al. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):171–6.
219. Wallace DC, Ruiz-Pesini E, Mishmar D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2003. p. 479–86.
220. Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V, Wallace DC. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science*. 2004;303(January):223–6.
221. Domínguez-Garrido E, Martínez-Redondo D, Martín-Ruiz C, Gómez-Durán A, Ruiz-Pesini E, Madero P, et al. Association of mitochondrial haplogroup J and mtDNA oxidative damage in two different North Spain elderly populations. *Biogerontology*. 2009;10(4):435–42.
222. Marom S, Friger M, Mishmar D. MtDNA meta-analysis reveals both phenotype specificity and allele heterogeneity: a model for differential association. *Sci Rep*. 2017;7(January):43449.
223. McKusick VA. The growth and development of human genetics as a clinical discipline. *Am J Hum Genet*. 1975 May;27(3):261–73.
224. McKusick VA. On lumpers and splitters, or the nosology of genetic disease. *Perspect Biol Med*. 1969;12(2):298–312.
225. Loscalzo J, Kohane I, Barabasi A-L. Human disease classification in the postgenomic era: a complex systems approach to human pathobiology. *Mol Syst Biol*. 2007;3(124):124.
226. Barabási A-L, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12(1):56–68.
227. Sawabe M, Tanaka M, Chida K, Arai T, Nishigaki Y, Fuku N, et al. Mitochondrial



- haplogroups A and M7a confer a genetic risk for coronary atherosclerosis in the Japanese elderly: an autopsy study of 1,536 patients. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18(2):166–75.
228. Kofler B, Mueller EE, Eder W, Stanger O, Maier R, Weger M, et al. Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med Genet.* 2009 Apr;10:35.
229. Jia Z, Wang X, Qin Y, Xue L, Jiang P, Meng Y, et al. Coronary heart disease is associated with a mutation in mitochondrial tRNA. *Hum Mol Genet.* 2013 Oct;22(20):4064–73.
230. Hendrickson SL, Hutcheson HB, Ruiz-Pesini E, Poole JC, Lautenberger J, Sezgin E, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression. *AIDS.* 2008 Nov;22(18):2429–39.
231. Micheloud D, Berenguer J, Guzman-Fulgencio M, Campos Y, Garcia-Alvarez M, Catalan P, et al. European mitochondrial DNA haplogroups and metabolic disorders in HIV/HCV-coinfected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011 Dec;58(4):371–8.
232. Alexe G, Fuku N, Bilal E, Ueno H, Nishigaki Y, Fujita Y, et al. Enrichment of longevity phenotype in mtDNA haplogroups D4b2b, D4a, and D5 in the Japanese population. *Hum Genet.* 2007 May;121(3–4):347–56.
233. Martikainen MH, Ronnema T, Majamaa K. Prevalence of mitochondrial diabetes in southwestern Finland: a molecular epidemiological study. *Acta Diabetol.* 2013 Oct;50(5):737–41.
234. Fang H, Shen L, Chen T, He J, Ding Z, Wei J, et al. Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer.* 2010 Aug;10:421.
235. Chen H, Zheng J, Xue L, Meng Y, Wang Y, Zheng B, et al. The 12S rRNA A1555G mutation in the mitochondrial haplogroup D5a is responsible for maternally inherited hypertension and hearing loss in two Chinese pedigrees. *Eur J Hum Genet.* 2012 Jun;20(6):607–12.
236. Lu Z, Chen H, Meng Y, Wang Y, Xue L, Zhi S, et al. The tRNAMet 4435A>G mutation in the mitochondrial haplogroup G2a1 is responsible for maternally inherited hypertension in a Chinese pedigree. *Eur J Hum Genet.* 2011 Nov;19(11):1181–6.
237. Jones MM, Manwaring N, Wang JJ, Rohtchina E, Mitchell P, Sue CM. Mitochondrial DNA haplogroups and age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 2007 Sep;125(9):1235–40.
238. Khusnutdinova E, Gilyazova I, Ruiz-Pesini E, Derbeneva O, Khusainova R, Khidiyatova I, et al. A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec;1147:1–20.
239. Gaweda-Walerych K, Maruszak A, Safranow K, Bialecka M, Klodowska-Duda G, Czyzewski K, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and subhaplogroups are associated with Parkinson's disease risk in a Polish PD cohort. *J Neural Transm.* 2008

- Nov;115(11):1521–6.
240. Santoro A, Balbi V, Balducci E, Pirazzini C, Rosini F, Tavano F, et al. Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2010 Aug;5(8):e12037.
 241. Coskun P, Wyrembak J, Schriener SE, Chen H-W, Marciniack C, Laferla F, et al. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May;1820(5):553–64.
 242. Estopinal CB, Chocron IM, Parks MB, Wade EA, Roberson RM, Burgess LG, et al. Mitochondrial haplogroups are associated with severity of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Aug;55(9):5589–95.
 243. Giacchetti M, Monticelli a, De Biase I, Pianese L, Turano M, Filla a, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence the Friedreich's ataxia phenotype. *J Med Genet*. 2004;41(4):293–5.
 244. Lorente L, Iceta R, Martin MM, Lopez-Gallardo E, Sole-Violan J, Blanquer J, et al. Severe septic patients with mitochondrial DNA haplogroup JT show higher survival rates: a prospective, multicenter, observational study. *PLoS One*. 2013;8(9):e73320.
 245. Palacin M, Alvarez V, Martin M, Diaz M, Corao AI, Alonso B, et al. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion*. 2011 Jan;11(1):176–81.
 246. Hu S-P, Du J-P, Li D-R, Yao Y-G. Mitochondrial DNA haplogroup confers genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in Chaoshanese from Guangdong, China. *PLoS One*. 2014;9(1):e87795.
 247. Hagen CM, Aidt FH, Hedley PL, Jensen MK, Havndrup O, Kanters JK, et al. Mitochondrial haplogroups modify the risk of developing hypertrophic cardiomyopathy in a Danish population. *PLoS One*. 2013;8(8):e71904.
 248. Fernandez-Caggiano M, Barallobre-Barreiro J, Rego-Perez I, Crespo-Leiro MG, Paniagua MJ, Grille Z, et al. Mitochondrial DNA haplogroup H as a risk factor for idiopathic dilated cardiomyopathy in Spanish population. *Mitochondrion*. 2013 Jul;13(4):263–8.
 249. Li Y-J, Minear MA, Qin X, Rimmler J, Hauser MA, Allingham RR, et al. Mitochondrial polymorphism A10398G and Haplogroup I are associated with Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Jun;55(7):4577–84.
 250. Rego I, Fernández-Moreno M, Fernández-López C, Gómez-Reino JJ, González A, Arenas J, et al. Role of European mitochondrial DNA haplogroups in the prevalence of hip osteoarthritis in Galicia, Northern Spain. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(1):210–3.
 251. Brown MD, Sun F, Wallace DC. Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet*. 1997 Feb;60(2):381–7.
 252. Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, et al. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role



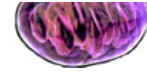
- in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet.* 1997 May;60(5):1107–21.
253. Rea IM, McNerlan SE, Archbold GP, Middleton D, Curran MD, Young IS, et al. Mitochondrial J haplogroup is associated with lower blood pressure and anti-oxidant status: findings in octo/nonagenarians from the BELFAST Study. *Age (Dordr).* 2013 Aug;35(4):1445–56.
 254. Nardelli C, Labruna G, Liguori R, Mazzaccara C, Ferrigno M, Capobianco V, et al. Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed Res Int.* 2013;2013:631082.
 255. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, De Luca M, Falcone E, Passarino G, et al. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1999 Sep;13(12):1532–6.
 256. Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylha M, Majamaa K. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Hum Genet.* 2003;112(1):29–33.
 257. Rose G, Passarino G, Carrieri G, Altomare K, Greco V, Bertolini S, et al. Paradoxes in longevity: sequence analysis of mtDNA haplogroup J in centenarians. *Eur J Hum Genet.* 2001 Sep;9(9):701–7.
 258. Chen A, Raule N, Chomyn A, Attardi G. Decreased reactive oxygen species production in cells with mitochondrial haplogroups associated with longevity. *PLoS One.* 2012;7(10):e46473.
 259. Pierron D, Rocher C, Amati-Bonneau P, Reynier P, Martin-Negrier M-L, Allouche S, et al. New evidence of a mitochondrial genetic background paradox: impact of the J haplogroup on the A3243G mutation. *BMC Med Genet.* 2008 May;9:41.
 260. Ghezzi D, Marelli C, Achilli A, Goldwurm S, Pezzoli G, Barone P, et al. Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians. *Eur J Hum Genet.* 2005 Jun;13(6):748–52.
 261. van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, et al. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet.* 2003 Apr;72(4):804–11.
 262. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, et al. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett.* 2004 Jul;365(1):28–32.
 263. Christiansen M, Hagen CM, Hedley PL. Mitochondrial haplogroups are associated with hypertrophic cardiomyopathy in the Indian population. Vol. 20, *Mitochondrion.* Netherlands; 2015. p. 105–6.
 264. Garcia-Alvarez M, Guzman-Fulgencio M, Berenguer J, Micheloud D, Campos Y, Lopez JC, et al. European mitochondrial DNA haplogroups and liver fibrosis in HIV and hepatitis C virus coinfecting patients. *AIDS.* 2011 Aug;25(13):1619–926.

265. Udar N, Atilano SR, Memarzadeh M, Boyer DS, Chwa M, Lu S, et al. Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Jun;50(6):2966–74.
266. Crispim D, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KEP, Roisenberg I. The European-specific mitochondrial cluster J/T could confer an increased risk of insulin-resistance and type 2 diabetes: an analysis of the m.4216T > C and m.4917A > G variants. *Ann Hum Genet*. 2006 Jul;70(Pt 4):488–95.
267. Soini HK, Moilanen JS, Finnila S, Majamaa K. Mitochondrial DNA sequence variation in Finnish patients with matrilineal diabetes mellitus. *BMC Res Notes*. 2012 Jul;5:350.
268. Loo J-H, Trejaut JA, Yen J-C, Chen Z-S, Ng W-M, Huang C-Y, et al. Mitochondrial DNA association study of type 2 diabetes with or without ischemic stroke in Taiwan. *BMC Res Notes*. 2014 Apr;7:223.
269. Liou C-W, Chen J-B, Tiao M-M, Weng S-W, Huang T-L, Chuang J-H, et al. Mitochondrial DNA coding and control region variants as genetic risk factors for type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012 Oct;61(10):2642–51.
270. Fuku N, Park KS, Yamada Y, Nishigaki Y, Cho YM, Matsuo H, et al. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. *Am J Hum Genet*. 2007 Mar;80(3):407–15.
271. Darvishi K, Sharma S, Bhat AK, Rai E, Bamezai RNK. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer. *Cancer Lett*. 2007 May;249(2):249–55.
272. Gutierrez Povedano C, Salgado J, Gil C, Robles M, Patino-Garcia A, Garcia-Foncillas J. Analysis of BRCA1 and mtDNA haplotypes and mtDNA polymorphism in familial breast cancer. *Mitochondrial DNA*. 2015 Apr;26(2):227–31.
273. Tipirisetti NR, Lakshmi RK, Govatati S, Govatati S, Vuree S, Singh L, et al. Mitochondrial genome variations in advanced stage breast cancer: a case-control study. *Mitochondrion*. 2013 Jul;13(4):372–8.
274. Bai R-K, Leal SM, Covarrubias D, Liu A, Wong L-JC. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Res*. 2007 May;67(10):4687–94.
275. Arning L, Haghikia A, Taherzadeh-Fard E, Saft C, Andrich J, Pula B, et al. Mitochondrial haplogroup H correlates with ATP levels and age at onset in Huntington disease. *J Mol Med (Berl)*. 2010 Apr;88(4):431–6.
276. Booker LM, Habermacher GM, Jessie BC, Sun QC, Baumann AK, Amin M, et al. North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer. *J Urol*. 2006 Feb;175(2):463–8.
277. Raby BA, Klanderma B, Murphy A, Mazza S, Camargo CAJ, Silverman EK, et al. A common mitochondrial haplogroup is associated with elevated total serum IgE levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Aug;120(2):351–8.
278. Ban M, Elson J, Walton A, Turnbull D, Compston A, Chinnery P, et al. Investigation of the



- role of mitochondrial DNA in multiple sclerosis susceptibility. *PLoS One*. 2008 Aug;3(8):e2891.
279. Manwaring N, Jones MM, Wang JJ, Rohtchina E, Howard C, Newall P, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and age-related hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007 Sep;133(9):929–33.
280. Knoll N, Jarick I, Volckmar A-L, Klingenspor M, Illig T, Grallert H, et al. Mitochondrial DNA variants in obesity. *PLoS One*. 2014;9(5):e94882.
281. Yang T-L, Guo Y, Shen H, Lei S-F, Liu Y-J, Li J, et al. Genetic association study of common mitochondrial variants on body fat mass. *PLoS One*. 2011;6(6):e21595.
282. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Oreiro N, Fernández-López C, Rego-Pérez I, Blanco FJ. MtDNA haplogroups and osteoarthritis in different geographic populations. *Mitochondrion*. 2014;15(1):18–23.
283. Soto-Hermida A, Fernández-Moreno M, Pértega-Díaz S, Oreiro N, Fernández-López C, Blanco FJ, et al. Mitochondrial DNA haplogroups modulate the radiographic progression of Spanish patients with osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2014;35(2):337–44.
284. Fernández-Moreno M, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, Cortés-Pereira E, Pértega S, Relaño S, et al. A replication study and meta-analysis of mitochondrial DNA variants in the radiographic progression of knee osteoarthritis. *Rheumatology*. 2017 Feb 1;56(2):263–70.
285. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M, Pértega S, Fernández-López C, Oreiro N, et al. Mitochondrial DNA haplogroups modulate the serum levels of biomarkers in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(5):910–7.
286. Rego-Pérez I, Fernández-Moreno M, Deberg M, Pértega S, Fernández-López C, Oreiro N, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and serum levels of proteolytic enzymes in patients with osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(4):646–52.
287. Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, Montoya J, López-Pérez MJ, et al. Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum Mol Genet*. 2010;19(17):3343–53.
288. Ruiz-Pesini E, Lapeña C, Díez-Sánchez C, Pérez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J Hum Genet*. 2000;67(3):682–96.
289. Martínez-Redondo D, Marcuello A, Casajús JA, Ara I, Dahmani Y, Montoya J, et al. Human mitochondrial haplogroup H: The highest VO₂max consumer - Is it a paradox? *Mitochondrion*. 2010;10(2):102–7.
290. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(12):878–90.
291. Cristina Kenney M, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: Insights into mitochondrial-nuclear interactions. *Hum Mol Genet*.

- 2014;23(13):3537–51.
292. Tsuji J, Frith MC, Tomii K, Horton P. Mammalian NUMT insertion is non-random. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(18):9073–88.
293. Hazkani-Covo E, Zeller RM, Martin W. Molecular poltergeists: Mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes. *PLoS Genet.* 2010;6(2).
294. Kotiadis VN, Duchen MR, Osellame LD. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2014;1840(4):1254–65.
295. Holt IJ, Reyes A. Human mitochondrial DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12).
296. Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-Nuclear Communications. *Annu Rev Biochem.* 2007;76(1):701–22.
297. Jazwinski SM. The retrograde response: When mitochondrial quality control is not enough. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(2):400–9.
298. Liu Z, Butow R a. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet.* 2006;40:159–85.
299. Wang C-H, Wu S-B, Wu Y-T, Wei Y-H. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(5):450–60.
300. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(8):662–80.
301. Bae SH, Sung SH, Lee HE, Kang HT, Lee SK, Oh SY, et al. Peroxiredoxin III and sulfiredoxin together protect mice from pyrazole-induced oxidative liver injury. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17(10):1351–61.
302. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Vol. 45, *Free Radical Biology and Medicine.* 2008. p. 549–61.
303. Murphy MP. Mitochondrial Thiols in Antioxidant Protection and Redox Signaling: Distinct Roles for Glutathionylation and Other Thiol Modifications. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(6):476–95.
304. Goth SL, Eaton J. Catalase deficiency , diabetes , and mitochondrial function. *Lancet.* 2001;357:2001.
305. Bohanec Grabar P, Logar D, Tomsic M, Rozman B, Dolzan V. Genetic polymorphisms modifying oxidative stress are associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Dis Markers.* 2009;26(1):41–8.
306. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:397–440.
307. Woo CH, Kim TH, Choi JA, Ryu HC, Lee JE, You HJ, et al. Inhibition of receptor internalization attenuates the TNF α -induced ROS generation in non-phagocytic cells.



- Biochem Biophys Res Commun. 2006;351(4):972–8.
308. Warpeha KM, Xu W, Liu L, Charles IG, Patterson CC, Ah-Fat F, et al. Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)(n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1999 Oct;13(13):1825–32.
 309. Wang Q, Liu D, Song P, Zou M-H. Deregulated tryptophan-kynurenine pathway is linked to inflammation, oxidative stress, and immune activation pathway in cardiovascular diseases. *Front Biosci.* 2016;20:1116–43.
 310. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 2007;26(7):1749–60.
 311. Huang J, Lam GY, Brumell JH. Autophagy signaling through reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(11):2215–31.
 312. López De Figueroa P, Lotz MK, Blanco FJ, Caramés B. Autophagy activation and protection from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(4):966–76.
 313. Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA, Kim PK. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy.* 2012;8(10):1462–76.
 314. Vanharanta S, Shu W, Brenet F, Hakimi AA, Heguy A. NIH Public Access. *Nat Med.* 2013;19(1):50–6.
 315. Arnoult D, Rismanchi N, Grodet A, Roberts RG, Seeburg DP, Estaquier J, et al. Bax/bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol.* 2005;15(23):2112–8.
 316. Lyamzaev KG, Nepryakhina OK, Saprunova VB, Bakeeva LE, Pletjushkina OY, Chernyak B V., et al. Novel mechanism of elimination of malfunctioning mitochondria (mitoptosis): Formation of mitoptotic bodies and extrusion of mitochondrial material from the cell. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2008;1777(7–8):817–25.
 317. Runkel ED, Baumeister R, Schulze E. Mitochondrial stress: Balancing friend and foe. *Exp Gerontol.* 2014;56:194–201.
 318. Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moullan N, Katsyuba E, Ryu D, Cant?? C, et al. XThe NAD+/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell.* 2013;154(2).
 319. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer’s disease genes and A beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(11):6336–41.
 320. Tajima H, Niikura T, Hashimoto Y, Ito Y, Kita Y, Terashita K, et al. Evidence for in vivo production of Humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer’s disease-related insults. *Neurosci Lett.* 2002;324(3):227–31.

321. Niikura T, Hashimoto Y, Tajima H, Ishizaka M, Yamagishi Y, Kawasumi M, et al. A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease-relevant insults. *Eur J Neurosci*. 2003;17(6):1150–8.
322. Ying G, Iribarren P, Zhou Y, Gong W, Zhang N, Yu Z, et al. Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J Immunol*. 2004;172(11):7078–85.
323. Hoang PT, Park P, Cobb LJ, Paharkova-Vatchkova V, Hakimi M, Cohen P, et al. The neurosurvival factor Humanin inhibits beta-cell apoptosis via signal transducer and activator of transcription 3 activation and delays and ameliorates diabetes in nonobese diabetic mice. *Metabolism*. 2010;59(3):343–9.
324. Oh YK, Bachar AR, Zacharias DG, Kim SG, Wan J, Cobb LJ, et al. Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic ApoE deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011;219(1):65–73.
325. Muzumdar RH, Huffman DM, Atzmon G, Buettner C, Cobb LJ, Fishman S, et al. Humanin: A novel central regulator of peripheral insulin action. *PLoS One*. 2009;4(7).
326. Tranah G. NIH Public Access. *Ageing Res Rev*. 2011;10(2):238–52.
327. Park CB, Larsson N-G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol*. 2011;193(5):809–18.
328. Larsson NG, Clayton D a. Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genet*. 1995;29:151–78.
329. Zhu X, Peng X, Guan M-X, Yan Q. Pathogenic mutations of nuclear genes associated with mitochondrial disorders. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2009;41(3):179–87.
330. Kemp JP, Smith PM, Pyle A, Neeve VCM, Tuppen HAL, Schara U, et al. Nuclear factors involved in mitochondrial translation cause a subgroup of combined respiratory chain deficiency. *Brain*. 2011;134(1):183–95.
331. Tynismaa H, Ylikallio E, Patel M, Molnar MJ, Haller RG, Suomalainen A. A Heterozygous Truncating Mutation in RRM2B Causes Autosomal-Dominant Progressive External Ophthalmoplegia with Multiple mtDNA Deletions. *Am J Hum Genet*. 2009;85(2):290–5.
332. Hudson G, Mowbray C, Elson JL, Jacob A, Boggild M, Torroni A, et al. Does mitochondrial DNA predispose to neuromyelitis optica (Devic's disease)? *Brain*. 2008 Apr 1;131(4):e93–e93.
333. Wallace DC. Bioenergetic origins of complexity and disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:1–16.
334. Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-Mahan K, McManus M, Crimi M, Waymire K, et al. Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell*. 2012;151(2):333–43.
335. Maruszak A, Canter JA, Styczyńska M, Zekanowski C, Barcikowska M. Mitochondrial haplogroup H and Alzheimer's disease-Is there a connection? *Neurobiol Aging*.



- 2009;30(11):1749–55.
336. Latorre-Pellicer A, Moreno-Loshuertos R, Lechuga-Vieco AV, Sánchez-Cabo F, Torroja C, Acín-Pérez R, et al. Mitochondrial and nuclear DNA matching shapes metabolism and healthy ageing. *Nature*. 2016;535(7613):561–5.
 337. Guantes R, Rastrojo A, Neves R, Lima A, Aguado B, Iborra FJ. Global variability in gene expression and alternative splicing is modulated by mitochondrial content. *Genome Res*. 2015;125(5):633–44.
 338. Loughlin J. Genetic contribution to osteoarthritis development: current state of evidence. *Curr Opin Rheumatol*. 2015;27(3):284–8.
 339. Blanco FJ, Rego-Pérez I. Is it time for epigenetics in osteoarthritis? *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(9):2324–7.
 340. Roach HI, Aigner T. DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthr Cartil*. 2007;15(2):128–37.
 341. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate 's Role. *Am Soc Nutr*. 2012;3(14):21–38.
 342. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. Vol. 128, *Cell*. 2007. p. 693–705.
 343. Swygart SG, Peterson CL. Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. Vol. 1839, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2014. p. 728–36.
 344. Clayton AL, Hazzalin CA, Mahadevan LC. Enhanced Histone Acetylation and Transcription: A Dynamic Perspective. Vol. 23, *Molecular Cell*. 2006. p. 289–96.
 345. Gregoret I V., Lee YM, Goodson H V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*. 2004;338(1):17–31.
 346. Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Oshimura M. The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. Vol. 6, *Cell Cycle*. 2007. p. 1011–8.
 347. Zhang M, Lu Q, Egan B, Zhong X b., Brandt K, Wang J. Epigenetically mediated spontaneous reduction of NFAT1 expression causes imbalanced metabolic activities of articular chondrocytes in aged mice. *Osteoarthr Cartil*. 2016;24(7):1274–83.
 348. Kim K Il, Park YS, Im G Il. Changes in the epigenetic status of the SOX-9 promoter in human osteoarthritic cartilage. *J Bone Miner Res*. 2013;28(5):1050–60.
 349. Higashiyama R, Miyaki S, Yamashita S, Yoshitaka T, Lindman G, Ito Y, et al. Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol*. 2010;20(1):11–7.
 350. Hong S, Derfoul A, Pereira-Mouries L, Hall DJ. A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes. *FASEB J*.

- 2009;23:3539–52.
351. Huber LC, Brock M, Hemmatazad H, Giger OT, Moritz F, Trenkmann M, et al. Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2007;56(4):1087–93.
 352. Huh YH, Ryu J, Chun J. Regulation of type II collagen expression by histone deacetylase in articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 2007;282(23):17123–31.
 353. Trojer P, Reinberg D. Histone Lysine Demethylases and Their Impact on Epigenetics. Vol. 125, *Cell.* 2006. p. 213–7.
 354. El Mansouri FE, Chabane N, Zayed N, Kapoor M, Benderdour M, Martel-Pelletier J, et al. Contribution of H3K4 methylation by SET-1A to interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1):168–79.
 355. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011 Dec;12(12):861–74.
 356. Shen J, Abu-Amer Y, O’Keefe RJ, McAlinden A. Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis. *Connect Tissue Res.* 2017 Jan 7;58(1):49–63.
 357. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010 Aug 12;466(7308):835–40.
 358. Tardif G, Hum D, Pelletier J, Duval N, Martel-pelletier J. miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. 2009;11:1–11.
 359. Ramos YFM, Meulenbelt I. The role of epigenetics in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2016;1.
 360. Ludwig AK, Zhang P, Cardoso MC. Modifiers and readers of DNA modifications and their impact on genome structure, expression, and stability in disease. Vol. 7, *Frontiers in Genetics.* 2016.
 361. Sliker RC, Bos SD, Goeman JJ, Bovée JV, Talens RP, van der Breggen R, et al. Identification and systematic annotation of tissue-specific differentially methylated regions using the Illumina 450k array. *Epigenetics Chromatin.* 2013;6(1):26.
 362. Jones P a, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet.* 2009;10(11):805–11.
 363. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987;196(2):261–82.
 364. Gonzalzo ML, Jones PA. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. Vol. 386, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research.* 1997. p. 107–18.
 365. Antequera F, Bird A. CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. Vol. 9, *Current Biology.* 1999.
 366. Barter MJ, Bui C, Young DA. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthr Cartil.* 2012;20(5):339–49.



367. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247–57.
368. Roach HI, Yamada N, Cheung KSC, Tilley S, Clarke NMP, Oreffo ROC, et al. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum*. 2005;52(10):3110–24.
369. Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donnell ST, Shepstone L, Porter S, et al. Expression Profiling of Metalloproteinases and Their Inhibitors in Cartilage. *Arthritis Rheum*. 2004;50(1):131–41.
370. Cheung KSC, Hashimoto K, Yamada N, Roach HI. Expression of ADAMTS-4 by chondrocytes in the surface zone of human osteoarthritic cartilage is regulated by epigenetic DNA de-methylation. *Rheumatol Int*. 2009 Mar;29(5):525–34.
371. Sesselmann S, Söder S, Voigt R, Haag J, Grogan SP, Aigner T. DNA methylation is not responsible for p21WAF1/CIP1 down-regulation in osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthr Cartil*. 2009;17(4):507–12.
372. Zimmermann P, Boeuf S, Dickhut A, Boehmer S, Olek S, Richter W. Correlation of COL10A1 induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the COL10A1 promoter. *Arthritis Rheum*. 2008 Sep;58(9):2743–53.
373. Takahashi A, de Andrés MC, Hashimoto K, Itoi E, Oreffo ROC. Epigenetic regulation of interleukin-8, an inflammatory chemokine, in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2015;23(11):1946–54.
374. Iliopoulos D, Malizos KNN, Tsezou A. Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(12):1616–21.
375. Bradley EW, Carpio LR, McGee-Lawrence ME, Castillejo Becerra C, Amanatullah DF, Ta LE, et al. Phlpp1 facilitates post-traumatic osteoarthritis and is induced by inflammation and promoter demethylation in human osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2016;24(6):1021–8.
376. Papatasiou I, Kostopoulou F, Malizos KN, Tsezou A. DNA methylation regulates sclerostin (SOST) expression in osteoarthritic chondrocytes by bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induced changes in Smads binding affinity to the CpG region of SOST promoter. *Arthritis Res Ther*. 2015 Jun;17:160.
377. De Andrés MC, Imagawa K, Hashimoto K, Gonzalez A, Roach HI, Goldring MB, et al. Loss of methylation in CpG sites in the NF- κ B enhancer elements of inducible nitric oxide synthase is responsible for gene induction in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2013;65(3):732–42.
378. Imagawa K, de Andres MC, Hashimoto K, Itoi E, Otero M, Roach HI, et al. Association of reduced type IX collagen gene expression in human osteoarthritic chondrocytes with epigenetic silencing by DNA hypermethylation. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2014

- Nov;66(11):3040–51.
379. Rushton MD, Reynard LN, Barter MJ, Refaie R, Rankin KS, Young DA, et al. Characterization of the cartilage DNA methylome in knee and hip osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(9):2450–60.
380. den Hollander W, Ramos YFM, Bos SD, Bomer N, van der Breggen R, Lakenberg N, et al. Knee and hip articular cartilage have distinct epigenomic landscapes: implications for future cartilage regeneration approaches. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(12):2208–12.
381. Fernández-Tajes J, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, Cortés-Pereira E, Mosquera A, Fernández-Moreno M, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(4):668–77.
382. Jeffries MA, Donica M, Baker LW, Stevenson ME, Annan AC, Humphrey MB, et al. Genome-Wide DNA methylation study identifies significant epigenomic changes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(10):2804–15.
383. Moazedi-Fuerst FC, Hofner M, Gruber G, Weinhaeusel A, Stradner MH, Angerer H, et al. Epigenetic differences in human cartilage between mild and severe OA. *J Orthop Res.* 2014;32(12):1636–45.
384. Naviaux RK. Mitochondrial control of epigenetics. Vol. 7, *Cancer Biology and Therapy.* 2008. p. 1191–3.
385. Shaughnessy DT, McAllister K, Worth L, Haugen AC, Meyer JN, Domann FE, et al. Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. *Environ Health Perspect.* 2015;122(12):1271–8.
386. Salminen A, Kauppinen A, Hiltunen M, Kaarniranta K. Krebs cycle intermediates regulate DNA and histone methylation: Epigenetic impact on the aging process. Vol. 16, *Ageing Research Reviews.* 2014. p. 45–65.
387. Cosentino C, Mostoslavsky R. Metabolism, longevity and epigenetics. Vol. 70, *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2013. p. 1525–41.
388. Iacobazzi V, Infantino V. Citrate-new functions for an old metabolite. *Biol Chem.* 2014;395(4):387–99.
389. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui T V, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Sci (New York, NY).* 2009;324(5930):1076–80.
390. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulated major cellular functions. *Science (80-).* 2009;325(2009):834–40.
391. Du Z, Song J, Wang Y, Zhao Y, Guda K, Yang S, et al. DNMT1 stability is regulated by proteins coordinating deubiquitination and acetylation-driven ubiquitination. *Sci Signal.* 2010;3(146):ra80.



392. Iacobazzi V, Castegna A, Infantino V, Andria G. Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool. Vol. 110, *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013. p. 25–34.
393. Agrimi G, Di Noia MA, Marobbio CM, Fiermonte G, Lasorsa FM, Palmieri F. Identification of the human mitochondrial S-adenosylmethionine transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution. *Biochem J*. 2004;379(Pt 1):183–90.
394. Chinnery PF, Elliott HR, Hudson G, Samuels DC, Relton CL. Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol*. 2012;41(1):177–87.
395. Shock LS, Thakkar P V, Peterson EJ, Moran RG, Taylor SM. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(9):3630–5.
396. Pollack Y, Kasir J, Shemer R, Metzger S, Szyf M. Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. 1984;12(12):4811–24.
397. Bellizzi D, D'Aquila P, Scafone T, Giordano M, Riso V, Riccio A, et al. The Control Region of Mitochondrial DNA Shows an Unusual CpG and Non-CpG Methylation Pattern. *DNA Res*. 2013 Dec 1;20(6):537–47.
398. Rebelo AP, Williams SL, Moraes CT. In vivo methylation of mtDNA reveals the dynamics of protein-mtDNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(20):6701–15.
399. Wallace DC. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philos Trans R Soc L B Biol Sci*. 2013;368(1622):20120267.
400. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. Vol. 51, *Free Radical Biology and Medicine*. 2011. p. 1289–301.
401. Kelly RDW, Mahmud A, McKenzie M, Trounce IA, St John JC. Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(20):10124–38.
402. Smiraglia DJ, Kulawiec M, Bistulfi GL, Gupta SG, Singh KK. A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus. *Cancer Biol Ther*. 2008;7(8):1182–90.
403. Bellizzi D, D'Aquila P, Giordano M, Montesanto A, Passarino G. Global DNA methylation levels are modulated by mitochondrial DNA variants. *Epigenomics*. 2012;4:17–27.
404. Atilano SR, Malik D, Chwa M, Cáceres-Del-Carpio J, Nesburn AB, Boyer DS, et al. Mitochondrial DNA variants can mediate methylation status of inflammation, angiogenesis and signaling genes. *Hum Mol Genet*. 2015;24(16):4491–503.
405. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Vol. 57, *Journal of the Royal Statistical Society B*. 1995. p. 289–300.
406. Pak Y, Glowacka WK, Bruce MC, Pham N, Rotin D. Transport of LAPTM5 to lysosomes

- requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPT5 ubiquitination. *J Cell Biol.* 2006;175(4):631–45.
407. Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;64(4):517–26.
408. Lian L, Wang Y, Flick M, Choi J, Scott EW, Degen J, et al. Loss of pleckstrin defines a novel pathway for PKC-mediated exocytosis. *Blood J.* 2009;113(15):3577–85.
409. Ohta M, Moriyama M, Maehara T, Gion Y. OBSERVATIONAL STUDY DNA Microarray Analysis of Submandibular Glands in IgG4-Related Disease Indicates a Role for MARCO and Other Innate Immune-Related Proteins. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(7):1–8.
410. Andres MC De, Caramé B, Galdo F, Arenas J, Blanco FJ. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:388–95.
411. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993;15(3):532–7.
412. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN : an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;14:1–14.
413. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, et al. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(6):1–12.
414. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product By Utilizing the 5'-3' Exonuclease Activity of *Thermus-Aquaticus* Dna-Polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7276–80.
415. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq : a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2010;10(1):57–63.
416. Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. RNA-seq: A method for comprehensive transcriptome analysis. *Curr Protoc Mol Biol.* 2010;(SUPPL. 89):1–13.
417. Zhao S, Zhang Y, Gordon W, Quan J, Xi H, Du S, et al. Comparison of stranded and non-stranded RNA-seq transcriptome profiling and investigation of gene overlap. *BMC Genomics.* 2015;16(1):675.
418. Illumina. RNA-Seq Solution for Gene Expression Studies.
419. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-Seq quantification. 2016;34(5):4–8.
420. Compeau PEC, Pevzner PA, Tesler G. How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. *Nat Biotech.* 2011 Nov;29(11):987–91.
421. Sonesson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research.*



- 2015;4(1521).
422. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* 2014;15(2):R29.
 423. Smyth G. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3.
 424. Zhang L, Wei S, Tang J, Guo L, Zheng F, Yang J, et al. PEP-1-CAT protects hypoxia / reoxygenation- induced cardiomyocyte apoptosis through multiple signaling pathways. *J Transl Med.* 2013;11(113):1–9.
 425. Schrauwen P, Hesselink M. Review UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol.* 2002;205:2275–85.
 426. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, et al. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res.* 2000;60(22):6381–3.
 427. Jong Park YH and TAS. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and prostate cancer risk. *Methods Mol Biol.* 2009;(471):361–85.
 428. De Luca C, Gugliandolo A, Calabr?? C, Curr?? M, Ientile R, Raskovic D, et al. Role of polymorphisms of inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase in idiopathic environmental intolerances. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:6–9.
 429. Eckstein F, Kwok CK, Link TM. Imaging research results from the Osteoarthritis Initiative (OAI): a review and lessons learned 10 years after start of enrolment. *Ann Rheum Dis.* 2014;2006(Figure 3):1289–300.
 430. Rego I, Fernandez-moreno M, Relaño S, Arenas J, Blanco FJ. The Use of Single Base Extension (SBE) for the Assessment of European Mitochondrial DNA Haplogroups in Galician Population. *Open Cell Dev {&} Biol J.* 2008;1:10–6.
 431. Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC. Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: A screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol.* 1992;48(2):122–6.
 432. Jakobsson M, Rosenberg NA. CLUMPP : a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics.* 2007;23(14):1801–6.
 433. Aref-Eshghi E, Zhang Y, Liu M, Harper PE, Martin G, Furey A, et al. Genome-wide DNA methylation study of hip and knee cartilage reveals embryonic organ and skeletal system morphogenesis as major pathways involved in osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015;16(1):1–10.
 434. Yen A, Kellis M. Systematic chromatin state comparison of epigenomes associated with diverse properties including sex and tissue type. *Nat Commun.* 2015;6:7973.
 435. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal RNA-Seq quantification.

436. van der Auwera I, Yu W, Suo L, van Neste L, van Dam P, van Marck EA, et al. Array-based DNA methylation profiling for breast cancer subtype discrimination. *PLoS One*. 2010;5(9):1–10.
437. Marsit CJ, Koestler DC, Christensen BC, Karagas MR, Houseman EA, Kelsey KT. DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(9):1133–9.
438. Abramson SB. Inflammation in Osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2004;31(SUPPL. 70):70–6.
439. Reynard LN, Bui C, Canty-laird EG, Young DA, Loughlin J. Expression of the osteoarthritis-associated gene GDF5 is modulated epigenetically by DNA methylation. *Hum Mol Genet*. 2011;20(17):3450–60.
440. Bui C, Barter MJ, Scott JL, Xu Y, Galler M, Reynard LN, et al. cAMP response element-binding (CREB) recruitment following a specific CpG demethylation leads to the elevated expression of the matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes and osteoarthritis. *FASEB J*. 2012;26(7):3000–11.
441. Hashimoto K, Oreffo ROC, Gibson MB, Goldring MB, Roach HI. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2009;60(11):3303–13.
442. Reynard LN, Bui C, Syddall CM, Loughlin J. CpG methylation regulates allelic expression of GDF5 by modulating binding of SP1 and SP3 repressor proteins to the osteoarthritis susceptibility SNP rs143383. *Hum Genet*. 2014;133(8):1059–73.
443. Yudoh K, Nguyen van T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(2):R380-91.
444. Bruyère O, Cooper C, Arden N, Branco J, Brandi ML, Herrero-Beaumont G, et al. Can We Identify Patients with High Risk of Osteoarthritis Progression Who Will Respond to Treatment? A Focus on Epidemiology and Phenotype of Osteoarthritis. *Drugs {&} Aging*. 2015;32(3):179–87.
445. Portal-Núñez S, Esbrit P, Alcaraz MJ, Largo R. Oxidative stress, autophagy, epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis. *Biochem Pharmacol*. 2016;108:1–10.
446. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotech*. 2010 Oct;28(10):1069–78.
447. Culley KL, Hui W, Barter MJ, Davidson RK, Swingler TE, DeStrument APM, et al. Class I Histone Deacetylase Inhibition Modulates Metalloproteinase Expression and Blocks Cytokine-Induced Cartilage Degradation. *Arthritis Rheum*. 2013;65(7):1822–30.
448. Steinberg J, Zeggini E. Functional genomics in osteoarthritis: Past, present, and future. *J Orthop Res*. 2016;34(7):1105–10.
449. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, et al. PKD2, a



- gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science*. 1996 May;272(5266):1339–42.
450. Lee EJ. Cell Proliferation and Apoptosis in ADPKD. *Adv Exp Med Biol*. 2016;933:25–34.
451. Brown CO, Schibler J, Fitzgerald MP, Singh N, Salem K, Zhan F, et al. Scavenger receptor class a member 3 (SCARA3) in disease progression and therapy resistance in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2013;37(8):963–9.
452. Karachanak-Yankova S, Dimova R, Nikolova D, Nesheva D, Koprinarova M, Maslyankov S, et al. Epigenetic Alterations in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Balk J Med Genet*. 2015;18(2):15–24.
453. Rahman MM, Cibere J, Anis AH, Goldsmith CH, Kopec JA. Risk of Type 2 Diabetes among Osteoarthritis Patients in a Prospective Longitudinal Study. *Int J Rheumatol*. 2014;2014:620920.
454. Nieves-Plaza M, Castro-Santana LE, Font YM, Mayor AM, Vilá LM. Association of Hand or Knee Osteoarthritis With Diabetes Mellitus in a Population of Hispanics From Puerto Rico. *JCR J Clin Rheumatol*. 2013;1.
455. Cimmino MA, Cutolo M. Plasma glucose concentration in symptomatic osteoarthritis: a clinical and epidemiological survey. *Clin Exp Rheumatol*. 1990;8(3 PG-251-7):251–7.
456. Hart DJ, Doyle D V., Spector TD. Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: The Chingford study. *J Rheumatol*. 1995;22(6):1118–23.
457. Babu M, Devi TD, Mäkinen P, Kaikkonen M, Lesch HP, Junttila S, et al. Differential Promoter Methylation of Macrophage Genes Is Associated with Impaired Vascular Growth in Ischemic Muscles of Hyperlipidemic and Type 2 Diabetic Mice: Genome-Wide Promoter Methylation Study. *Circ Res*. 2015;117(3):289–99.
458. Speedy HE, Di Bernardo MC, Sava GP, Dyer MJS, Holroyd A, Wang Y, et al. A genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2014;46(1):56–60.
459. Gibbs JR, van der Brug MP, Hernandez DG, Traynor BJ, Nalls MA, Lai S-L, et al. Abundant Quantitative Trait Loci Exist for DNA Methylation and Gene Expression in Human Brain. Flint J, editor. *PLoS Genet*. 2010 May 13;6(5):e1000952.
460. Zhang D, Cheng L, Badner JA, Chen C, Chen Q, Luo W, et al. Genetic control of individual differences in gene-specific methylation in human brain. *Am J Hum Genet*. 2010 Mar;86(3):411–9.
461. Bell JT, Pai AA, Pickrell JK, Gaffney DJ, Pique-Regi R, Degner JF, et al. DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol*. 2011 Jan 20;12(1):R10–R10.
462. Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Ku HT, Al-Abdullah IH, Kandeel F, et al. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One*. 2009;4(9).
463. Feil R, Walter J, Allen ND, Reik W. Developmental control of allelic methylation in the

- imprinted mouse *Igf2* and *H19* genes. *Development*. 1994;120(10):2933–2943.
464. Vu TH, Li T, Nguyen D, Nguyen BT, Yao XM, Hu JF, et al. Symmetric and asymmetric DNA methylation in the human *IGF2-H19* imprinted region. *Genomics*. 2000;64(2):132–43.
465. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J Biol Chem*. 1992 Jan;267(1):166–72.
466. Zeng H, Cao JJ, Combs GF. Selenium in Bone Health: Roles in Antioxidant Protection and Cell Proliferation. *Nutrients*. 2013 Jan 10;5(1):97–110.
467. Foger-Samwald U, Vekszler G, Horz-Schuch E, Salem S, Wipperfich M, Ritschl P, et al. Molecular mechanisms of osteoporotic hip fractures in elderly women. *Exp Gerontol*. 2016 Jan;73:49–58.
468. Zhou J, Lin J, Zhang T, Ma J, Yang L, Wen X, et al. *GPX3* methylation in bone marrow predicts adverse prognosis and leukemia transformation in myelodysplastic syndrome. *Cancer Med*. 2017 Jan 28;6(1):267–74.
469. An BC, Jung N-K, Park CY, Oh I-J, Choi Y-D, Park J-I, et al. Epigenetic and Glucocorticoid Receptor-Mediated Regulation of Glutathione Peroxidase 3 in Lung Cancer Cells. *Mol Cells*. 2016 Aug;39(8):631–8.
470. He Y, Wang Y, Li P, Zhu S, Wang J, Zhang S. Identification of *GPX3* epigenetically silenced by CpG methylation in human esophageal squamous cell carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2011;56(3):681–8.
471. Mohamed MM, Sabet S, Peng DF, Nouh MA, El-Shinawi M, El-Rifai W. Promoter hypermethylation and suppression of glutathione peroxidase 3 are associated with inflammatory breast carcinogenesis. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
472. Peng D-F, Hu T-L, Schneider BG, Chen Z, Xu Z-K, El-Rifai W. Silencing of glutathione peroxidase 3 through DNA hypermethylation is associated with lymph node metastasis in gastric carcinomas. *PLoS One*. 2012;7(10):e46214.
473. Kritsiligkou P, Chatzi A, Charalampous G, Mironov A, Grant CM, Tokatlidis K. Unconventional Targeting of a Thiol Peroxidase to the Mitochondrial Intermembrane Space Facilitates Oxidative Protein Folding. *Cell Rep*. 2017 Mar 14;18(11):2729–41.
474. Hatzimichael E, Dasoula A, Shah R, Syed N, Papoudou-Bai A, Coley HM, et al. The polyhydroxylase *EGLN3* and not *EGLN1* is inactivated by methylation in plasma cell neoplasia. *Eur J Haematol*. 2010;84(1):47–51.
475. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol*. 2000;203(Pt 8):1253–63.
476. Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 α in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res & Ther*. 2005;7(4):R904.



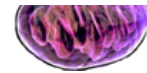
477. Phang JM, Liu W, Hancock C. Bridging epigenetics and metabolism: Role of non-essential amino acids. *Epigenetics*. 2013 Mar 1;8(3):231–6.
478. Hancock CN, Liu W, Alvord WG, Phang JM. Co-regulation of mitochondrial respiration by proline dehydrogenase/oxidase and succinate. *Amino Acids*. 2016 Mar;48(3):859–72.
479. Pandhare J, Donald SP, Cooper SK, Phang JM. Regulation and function of proline oxidase under nutrient stress. *J Cell Biochem*. 2009 Jul;107(4):759–68.
480. Liu W, Glunde K, Bhujwalla ZM, Raman V, Sharma A, Phang JM. Proline oxidase promotes tumor cell survival in hypoxic tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2012 Jul;72(14):3677–86.
481. Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26035–54.
482. Kruidering M, Evan GI. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of “the end”? *IUBMB Life*. 2000 Aug;50(2):85–90.
483. Li H, Zhu H, Xu C-J, Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell*. 1998;94:491–501.
484. Rabkin SW, Klassen SS. Nitric oxide differentially regulates the gene expression of caspase genes but not some autophagic genes. *Nitric oxide Biol Chem*. 2007 May;16(3):339–47.
485. Cho S, Lee JH, Cho SB, Yoon KW, Park SY, Lee WS, et al. Epigenetic methylation and expression of caspase 8 and survivin in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int*. 2010 Mar;60(3):203–11.
486. van Eijk KR, de Jong S, Boks MPM, Langeveld T, Colas F, Veldink JH, et al. Genetic analysis of DNA methylation and gene expression levels in whole blood of healthy human subjects. *BMC Genomics*. 2012 Nov;13:636.
487. Alvarez-Garcia O, Fisch KM, Wineinger NE, Akagi R, Saito M, Sasho T, et al. Increased DNA Methylation and Reduced Expression of Transcription Factors in Human Osteoarthritis Cartilage. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(8):1876–86.
488. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. Vol. 10, *Current Opinion in Cell Biology*. 1998. p. 248–53.
489. Simone Reuter BBA. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2011;49(11):1603–16.
490. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. Vol. 121, *International Journal of Cancer*. 2007. p. 2373–80.
491. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. Vol. 121, *International Journal of Cancer*. 2007. p. 2381–6.
492. Glowacka WK, Alberts P, Ouchida R, Wang J-Y, Rotin D. LAPT5 Protein Is a Positive Regulator of Proinflammatory Signaling Pathways in Macrophages. *J Biol Chem*. 2012 Aug

- 10;287(33):27691–702.
493. Cai X, Qiao Y, Chen Y, Du S, Chen D, Yu S, et al. Expression and Polymorphisms of Lysosome-Associated Protein Transmembrane 5 (LAPTM5) in Patients with Systemic Lupus Erythematosus in a Chinese Population. *Biochem Genet.* 2015 Aug;53(7–8):200–10.
 494. Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Sugino Y, Hosoi H, et al. Lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas. *PLoS One.* 2009;4(9).
 495. Walsh HA, Botting NP. Purification and biochemical characterization of some of the properties of recombinant human kynureninase. *Eur J Biochem.* 2002;269(8):2069–74.
 496. Melillo G, Musso T, Sica A, Taylor LS, Cox GW, Varesio L. A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med.* 1995 Dec 1;182(6):1683 LP-1693.
 497. Alberati-Giani D, Buchli R, Malherbe P, Broger C, Lang G, Kohler C, et al. Isolation and expression of a cDNA clone encoding human kynureninase. *Eur J Biochem.* 1996;239(2):460–8.
 498. Zhang Q, Li H, Zhang Z, Yang F, Chen J. Serum metabolites as potential biomarkers for diagnosis of knee osteoarthritis. *Dis Markers.* 2015;2015.
 499. Chen Q, Coffey A, Bourgoin SG, Gadina M. Cytohesin binder and regulator augments T cell receptor-induced nuclear factor of activated T cells-AP-1 activation through regulation of the JNK pathway. *J Biol Chem.* 2006;281(29):19985–94.
 500. Tang P, Cheng TP, Agnello D, Wu C-Y, Hissong BD, Watford WT, et al. Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 5;99(5):2625–9.
 501. Heib V, Sparber F, Tripp CH, Ortner D, Stoitzner P, Heufler C. Cytip regulates dendritic-cell function in contact hypersensitivity. *Eur J Immunol.* 2012 Mar 4;42(3):589–97.
 502. Kraal G, Van Der Laan LJW, Elomaa O, Tryggvason K. The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect.* 2000;2(3):313–6.
 503. Rogers NJ, Lees MJ, Gabriel L, Maniati E, Rose SJ, Potter PK, et al. A defect in Marco expression contributes to systemic lupus erythematosus development via failure to clear apoptotic cells. *J Immunol.* 2009;182(4):1982–90.
 504. Rushton MD, Reynard LN, Young DA, Shepherd C, Aubourg G, Gee F, et al. Methylation quantitative trait locus analysis of osteoarthritis links epigenetics with genetic risk. *Hum Mol Genet.* 2015 Dec 20;24(25):7432–44.
 505. Hashimoto K, Otero M, Imagawa K, De Andrés MC, Coico JM, Roach HI, et al. Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1 β (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG sites. *J Biol Chem.* 2013;288(14):10061–72.
 506. Durand P, Borrone C, Della Cella G. A NEW MUCOPOLYSACCHARIDE LIPIDSTORAGE



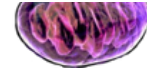
- DISEASE? *Lancet*. 2017 Apr 12;288(7476):1313–4.
507. Van Hoof F, Hers HG. Mucopolysaccharidosis by absence of alpha-fucosidase. *Lancet* (London, England). 1968 Jun;1(7553):1198.
508. Lee FA, Donnell GN, Gwinn JL. Radiographic features of fucosidosis. *Pediatr Radiol*. 1977;5(4):204–8.
509. Hildebrand DG, Lehle S, Borst A, Haferkamp S, Essmann F, Schulze-Osthoff K. α -Fucosidase as a novel convenient biomarker for cellular senescence. *Cell Cycle*. 2013;12(12):1922–7.
510. Vidal-Bralo L, Lopez-Golan Y, Mera-Varela A, Rego-Perez I, Horvath S, Zhang Y, et al. Specific premature epigenetic aging of cartilage in osteoarthritis. *Aging* (Albany NY). 2016 Sep;8(9):2222–31.
511. Ross OA, McCormack R, Curran MD, Duguid RA, Barnett YA, Rea IM, et al. Mitochondrial DNA polymorphism: its role in longevity of the Irish population. *Exp Gerontol*. 2001 Jul;36(7):1161–78.
512. Kron KJ, Liu L, Pethe V V, Demetrashvili N, Nesbitt ME, Trachtenberg J, et al. DNA methylation of HOXD3 as a marker of prostate cancer progression. *Lab Invest*. 2010 Jul;90(7):1060–7.
513. Chen LN, Rubin RS, Othepa E, Cer C, Yun E, Agarwal RP, et al. Correlation of HOXD3 promoter hypermethylation with clinical and pathologic features in screening prostate biopsies. *Prostate*. 2014 May 21;74(7):714–21.
514. Boudreau NJ, Varner JA. The Homeobox Transcription Factor Hox D3 Promotes Integrin α 5 β 1 Expression and Function during Angiogenesis. *J Biol Chem*. 2004;279(6):4862–8.
515. Loeser RF. Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol*. 2014 Oct 25;39:11–6.
516. Im H-J, Li X, Muddasani P, Kim G-H, Davis F, Rangan J, et al. Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine pathway in human adult articular chondrocytes. *J Cell Physiol*. 2008 May;215(2):452–63.
517. Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB, Attur M, Corr M, Felson D, et al. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthr Cartil*. 2006 Aug;14(8):723–7.
518. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum*. 1998 Feb;41(2):284–9.
519. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999 Mar;283(5407):1482–8.
520. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10.
521. Issekutz AC, Mu JY, Liu G, Melrose J, Berg EL. E-Selectin , but Not P-Selectin , Is Required

- for Development of Adjuvant-Induced Arthritis in the Rat. 2001;44(6):1428–37.
522. Carson CW, Beall LD, Hunder GG, Johnson CM, Newman W. Soluble E-selectin is increased in inflammatory synovial fluid. *J Rheumatol*. 1994 Apr;21(4):605–11.
523. Weinmann D, Schlangen K, André S, Schmid S, Walzer SM, Kubista B, et al. Galectin-3 Induces a Pro- degradative / inflammatory Gene Signature in Human Chondrocytes , Teaming Up with Galectin-1 in Osteoarthritis Pathogenesis. 2016;(August):1–15.
524. Balakrishnan L, Bhattacharjee M, Ahmad S, Nirujogi RS, Renuse S, Subbannayya Y, et al. Differential proteomic analysis of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Clin Proteomics*. 2014;11(1):1–14.
525. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006 Nov;127(3):469–80.
526. Yates KE, Shortkroff S, Reish RG. Wnt influence on chondrocyte differentiation and cartilage function. *DNA Cell Biol*. 2005 Jul;24(7):446–57.
527. Dao DY, Yang X, Flick LM, Chen D, Hilton MJ, Regis J, et al. Axin2 Regulates Chondrocyte Maturation and Axial Skeletal Development. *J Orthop Res*. 2010;28(1):89–95.
528. De A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011 Oct;43(10):745–56.
529. von Maltzahn J, Bentzinger CF, Rudnicki MA. Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nat Cell Biol*. 2011 Dec;14(2):186–91.
530. Carmon KS, Loose DS. Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2008 Jun;6(6):1017–28.
531. Gibso AL, Hui CK, Andrea TF, Tomoya U. Wnt7a Inhibits IL-1 β Induced Catabolic Gene Expression and Prevents Articular Cartilage Damage in Experimental Osteoarthritis. 2017;(August 2016):1–16.
532. Lai J, Porreca F, Hunter JC, Gold MS. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:371–97.
533. Ishii R, Kami D, Toyoda M, Makino H, Gojo S, Ishii T, et al. Placenta to cartilage: direct conversion of human placenta to chondrocytes with transformation by defined factors. Tanaka E, editor. *Mol Biol Cell*. 2012 Sep 15;23(18):3511–21.
534. Hroudová J, Singh N, Fišar Z. Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: Relevance to alzheimer's disease. Vol. 2014, BioMed Research International. 2014.
535. Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:461–80.
536. Sadana R, Dessauer CW. Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neurosignals*. 2009;17(1):5–22.



537. Fitzgerald JB, Jin M, Dean D, Wood DJ, Zheng MH, Grodzinsky AJ. Mechanical compression of cartilage explants induces multiple time-dependent gene expression patterns and involves intracellular calcium and cyclic AMP. *J Biol Chem.* 2004 May;279(19):19502–11.
538. Valhmu WB, Raia FJ. myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate and Ca(2+)/calmodulin-dependent factors mediate transduction of compression-induced signals in bovine articular chondrocytes. *Biochem J.* 2002 Feb;361(Pt 3):689–96.
539. Lee H-S, Millward-Sadler SJ, Wright MO, Nuki G, Al-Jamal R, Salter DM. Activation of Integrin-RACK1/PKCalpha signalling in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Osteoarthr Cartil.* 2002 Nov;10(11):890–7.
540. Ivaska J, Bosca L, Parker PJ. PKCepsilon is a permissive link in integrin-dependent IFN-gamma signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat Cell Biol.* 2003 Apr;5(4):363–9.
541. Short SM, Boyer JL, Juliano RL. Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in G protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2000 Apr;275(17):12970–7.
542. Moro L, Venturino M, Bozzo C, Silengo L, Altruda F, Beguinot L, et al. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 1998 Nov;17(22):6622–32.
543. Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013;5(2):77–94.
544. Kraus, V. B.; Blanco, Francisco; Englund, Martin; Karsdal, Morten; Lohmander S. Call for Standardized Definitions of Osteoarthritis and Risk Stratification for Clinical Trials and Clinical Use. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(8):1233–41.
545. Reginato AM, Olsen BR. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res.* 2002;4(6):337–45.
546. Valdes AM, Spector TD. The Contribution of Genes to Osteoarthritis. *Med Clin North Am.* 2009;93(1):45–66.
547. Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1404–7.
548. Valdes AM, Spector TD. The clinical relevance of genetic susceptibility to osteoarthritis. Vol. 24, *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology.* 2010. p. 3–14.
549. Castro MG, Terrados N, Reguero JR, Alvarez V, Coto E. Mitochondrial haplogroup T is negatively associated with the status of elite endurance athlete. *Mitochondrion.* 2007;7(5):354–7.
550. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, et al. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: Implications for population susceptibility to diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014;1842(2):208–19.

551. Wallace DC. Mitochondrial DNA in evolution and disease. *Nature*. 2016;535(July):498–500.
552. Rousset S, Alves-Guerra M-C, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier A-M, Bouillaud F, et al. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 1(February):S130–5.
553. Ledesma A, de Lacoba MG, Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol*. 2002;3(12):REVIEWS3015.
554. Mattiasson G, Sullivan PG. The Emerging Functions of UCP2 in Health, Disease, and Therapeutics. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:243–70.
555. Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. Vol. 2, *Cell Metabolism*. 2005. p. 85–93.
556. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet*. 2000;26(4):435–9.
557. Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Lévi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, et al. Uncoupling Protein 2, in Vivo Distribution, Induction upon Oxidative Stress, and Evidence for Translational Regulation. *J Biol Chem*. 2001;276(12):8705–12.
558. Rose G, Crocco P, de Rango F, Montesanto A, Passarino G. Further support to the uncoupling-to-survive theory: The genetic variation of human UCP genes is associated with longevity. *PLoS One*. 2011;6(12):1–7.
559. Yu X, Jacobs DRJ, Schreiner PJ, Gross MD, Steffes MW, Fornage M. The uncoupling protein 2 Ala55Val polymorphism is associated with diabetes mellitus: the CARDIA study. *Clin Chem*. 2005 Aug;51(8):1451–6.
560. Shen Y, Wen Z, Wang N, Zheng Z, Liu K, Xia X, et al. Investigation of variants in UCP2 in Chinese type 2 diabetes and diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2014;9(11):e112670.
561. Zhou Y, Simmons D, Hambly BD, McLachlan CS. Interactions between UCP2 SNPs and telomere length exist in the absence of diabetes or pre-diabetes. *Sci Rep*. 2016 Sep;6:33147.
562. Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, et al. Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans. *J Clin Invest*. 1997;100(11):2665–70.
563. Sreedhar A, Zhao Y. Uncoupling protein 2 and metabolic diseases. *Mitochondrion*. 2017;
564. Otaegui D, Saenz a, Ruiz-Martinez J, Olaskoaga J, López de Munain a. UCP2 and mitochondrial haplogroups as a multiple sclerosis risk factor. *Mult Scler*. 2007;13(4):454–8.
565. Kim I-J, Ku J-L, Kang HC, Park J-H, Yoon K-A, Shin Y, et al. Mutational analysis of OGG1, MYH, MTH1 in FAP, HNPCC and sporadic colorectal cancer patients: R154H OGG1 polymorphism is associated with sporadic colorectal cancer patients. *Hum Genet*. 2004



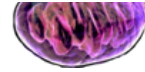
- Nov;115(6):498–503.
566. Rodrigues P, de Marco G, Furriol J, Mansego ML, Pineda-Alonso M, Gonzalez-Neira A, et al. Oxidative stress in susceptibility to breast cancer: study in Spanish population. *BMC Cancer*. 2014 Nov 21;14:861.
567. Romanowicz H, Pyziak L, Jablonski F, Brys M, Forma E, Smolarz B. Analysis of DNA Repair Genes Polymorphisms in Breast Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2017 Jan;23(1):117–23.
568. Yuan W, Xu L, Feng Y, Yang Y, Chen W, Wang J, et al. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Aug;122(3):835–42.
569. Cai Q, Shu X-O, Wen W, Courtney R, Dai Q, Gao Y-T, et al. Functional Ser326Cys polymorphism in the hOGG1 gene is not associated with breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Feb;15(2):403–4.
570. Choi J-Y, Hamajima N, Tajima K, Yoo K-Y, Yoon K-S, Park SK, et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism and breast cancer risk among Asian women. *Breast Cancer Res Treat*. 2003 May;79(1):59–62.
571. Bag A, Bag N. Target Sequence Polymorphism of Human Manganese Superoxide Dismutase Gene and Its Association with Cancer Risk: A Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev*. 2008 Dec 8;17(12):3298 LP-3305.
572. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Sep;226(2):561–5.
573. Holley AK, Dhar SK, Xu Y, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids*. 2012 Jan;42(1):139–58.
574. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 2003 Mar;13(3):145–57.
575. Vats P, Sagar N, Singh TP, Banerjee M. Association of Superoxide dismutases (SOD1 and SOD2) and Glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. *Free Radic Res*. 2015 Jan;49(1):17–24.
576. Bresciani G, Cruz IBM, de Paz JA, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res*. 2013 Oct;47(10):781–92.
577. Bai J, Cederbaum a I. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept*. 2001;10(3–4):189–99.
578. Ahn J, Nowell S, McCann SE, Yu J, Carter L, Lang NP, et al. Associations between catalase phenotype and genotype: modification by epidemiologic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Jun;15(6):1217–22.

579. Forsberg L, Lyrenäs L, De Faire U, Morgenstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(5):500–5.
580. Gavalas NG, Akhtar S, Gawkrödger DJ, Watson PF, Weetman AP, Kemp EH. Analysis of allelic variants in the catalase gene in patients with the skin depigmenting disorder vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;345(4):1586–91.
581. Collins JA, Wood ST, Nelson KJ, Rowe MA, Carlson CS, Chubinskaya S, et al. Oxidative stress promotes peroxiredoxin hyperoxidation and attenuates pro-survival signaling in aging chondrocytes. *J Biol Chem*. 2016;291(13):6641–54.
582. Vlahos R, Bozinovski S. Glutathione peroxidase-1 as a novel therapeutic target for COPD. *Redox Rep*. 2013 Jul 1;18(4):142–9.
583. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*. 2006 Apr;27(4):820–5.
584. Xiong YM, Mo XY, Zou XZ, Song RX, Sun WY, Lu W, et al. Association study between polymorphisms in selenoprotein genes and susceptibility to Kashin-Beck disease. *Osteoarthr Cartil*. 2010 Jun;18(6):817–24.
585. Bera S, Weinberg F, Ekoue DN, Ansenberger-Fricano K, Mao M, Bonini MG, et al. Natural allelic variations in glutathione peroxidase-1 affect its subcellular localization and function. *Cancer Res*. 2014;74(18):5118–26.
586. Koretsi V, Kirschneck C, Proff P, Romer P. Expression of glutathione peroxidase 1 in the spheno-occipital synchondrosis and its role in ROS-induced apoptosis. *Eur J Orthod*. 2015 Jun;37(3):308–13.
587. Pritchard MR, Horton JA, Keenawinna LS, Damron TA. Microarray analysis of irradiated growth plate zones following laser microdissection shows later importance of differentially expressed genes during radiorecovery. *Cells Tissues Organs*. 2010;192(4):240–9.
588. Handy DE, Lubos E, Yang Y, Galbraith JD, Kelly N, Zhang YY, et al. Glutathione peroxidase-1 regulates mitochondrial function to modulate redox-dependent cellular responses. *J Biol Chem*. 2009;284(18):11913–21.
589. PACHER PÁL, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315–424.
590. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 1;500(1–3):255–66.
591. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6(12):3051–64.
592. Mankan AK, Lawless MW, Gray SG, Kelleher D, McManus R. NF-kappaB regulation: the nuclear response. *J Cell Mol Med*. 2009;13(4):631–43.



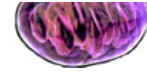
593. San Martín A, Arce-Molina R, Galaz A, Pérez-Guerra G, Barros LF. Nanomolar nitric oxide concentrations quickly and reversibly modulate astrocytic energy metabolism. *J Biol Chem.* 2017 Mar;
594. Xu W, Liu L, Emson PC, Harrington CR, Charles IG. Evolution of a homopurine–homopyrimidine pentanucleotide repeat sequence upstream of the human inducible nitric oxide synthase gene. *Gene.* 1997 Dec 19;204(1–2):165–70.
595. Motallebipour M, Rada-iglesias A, Jansson M, Wadelius C. The promoter of inducible nitric oxide synthase implicated in glaucoma based on genetic analysis and nuclear factor binding. 2005;(March).
596. Gazquez I, Lopez-Escamez J a, Moreno A, Campbell C a, Meyer NC, Carey JP, et al. Functional variants in NOS1 and NOS2A are not associated with progressive hearing loss in Ménière’s disease in a European Caucasian population. *DNA Cell Biol.* 2011;30(9):699–708.
597. Xu W, Humphries S, Tomita M, Okuyama T, Matsuki M, Burgner D, et al. Survey of the allelic frequency of a NOS2A promoter microsatellite in human populations: assessment of the NOS2A gene and predisposition to infectious disease. *Nitric oxide Biol Chem.* 2000 Aug;4(4):379–83.
598. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995 Jul;96(1):60–8.
599. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Bursztyn M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut.* 1995;37:247–55.
600. Salerno L, Sorrenti V, Di Giacomo C, Romeo G, Siracusa MA. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des.* 2002;8(3):177–200.
601. Hogaboam CM, Jacobson K, Collins SM, Blennerhassett MG. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *Am J Physiol.* 1995 Apr;268(4 Pt 1):G673-84.
602. Lizano P, Rashed E, Stoll S, Zhou N, Wen H, Hays TT, et al. The valosin-containing protein is a novel mediator of mitochondrial respiration and cell survival in the heart in vivo. *Sci Rep.* 2017 Apr;7:46324.
603. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 1992;51(11):1219–22.
604. Karan A, Karan MA, Vural P, Erten N, Tascioglu C, Aksoy C, et al. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol.* 2003 Dec;22(6):397–9.
605. Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, Tanpowpong T, Tanavalee A, Yuktanandana P, et al. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in primary knee osteoarthritis. *J Med Assoc Thai.* 2015 Jan;98 Suppl 1:S91-7.

606. Blanco FJ, Toro FJ De, Galdo F. El óxido nítrico y el cartílago articular. *Rev Española Reumatol.* 2005;32(3):126–33.
607. Gonzalez-Gay M a, Llorca J, Sanchez E, Lopez-Nevot M a, Amoli MM, Garcia-Porrúa C, et al. Inducible but not endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in northwest Spain. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(9):1182–5.
608. Ryk C, Hou SM, Pershagen G, Wiklund NP, Nyberg F, De Verdier PJ. The (CCTTT)_n microsatellite polymorphism in the NOS2 gene may influence lung cancer risk and long-term survival, especially in non-smokers. *Tumor Biol.* 2014;35(5):4425–34.
609. Sarnelli G, Grosso M, Palumbo I, Pesce M, D'Alessandro A, Zaninotto G, et al. Allele-specific transcriptional activity of the variable number of tandem repeats of the inducible nitric oxide synthase gene is associated with idiopathic achalasia. *United Eur Gastroenterol J.* 2017 Mar;5(2):200–7.



ANEXO I

Ejemplo de consentimiento informado.



DOCUMENTO DE INFORMACIÓN **PARTICIPANTE EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

TÍTULO LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: COLECCIÓN DE MUESTRAS PARA LA INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES REUMATOLÓGICAS.

IDENTIDAD RESPONSABLE: DR. FRANCISCO JAVIER BLANCO GARCÍA.

SERVICIO MÉDICO / GRUPO DE INVESTIGACIÓN: SERVICIO DE REUMATOLOGÍA.

CENTRO HOSPITALARIO: XERENCIA XESTIÓN INTEGRADA A CORUÑA (XXIAC). – INSTITUTO INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA A CORUÑA (INIBIC)

FINALIDAD DE LA PARTICIPACIÓN.-

Le invitamos a colaborar en la Línea de investigación de de las enfermedades reumatológicas, es decir, patologías reumáticas y/o del aparato locomotor.

Las muestras obtenidas para el diagnóstico o control de las enfermedades una vez empleadas con esta finalidad, resultan también útiles y necesarias para ser utilizadas en investigación. De hecho, muchos de los avances científicos obtenidos en los últimos años en medicina son fruto de este tipo de estudios.

Toda investigación biomédica requiere recoger datos y muestras biológicas de personas afectadas por la patología a estudiar y de personas no afectadas por dicha enfermedad, para analizarlas y obtener conclusiones para conocer mejor y avanzar en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades que se van a investigar.

El objetivo principal de esta **Línea de investigación** es poder utilizar estas muestras en los distintos proyectos de investigación en los que participe el responsable de la misma, el Dr. Francisco Javier Blanco García y cualquier otro personal adscrito o colaborador del Grupo de Investigación del Servicio de Reumatología del CHUAC - XXIAC y/o del INIBIC; siempre y cuando, dichos estudios se enmarquen en el análisis de las patologías reumatológicas en general, y particularmente enfermedades reumáticas y/o del aparato locomotor.

Debe saber que la realización de los proyectos de investigación en los que se utilicen muestras humanas, será previamente autorizada por el Comité de Ética competente.

La finalidad principal de esta investigación es progresar en el conocimiento de la patología a estudiar y en su prevención, diagnóstico, pronóstico y tratamiento, tanto médico como quirúrgico.

Toda la información que le facilitamos en este documento y la actividad del Grupo de investigación y el Biobanco están reguladas por la *Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD)*, la *Ley 14/2007, de 3 de Julio de Investigación Biomédica (LIBM)*, el *Real Decreto 1716/2011, de 11 de noviembre*.

Su participación es totalmente voluntaria. Si firma el consentimiento informado, confirmará que desea participar. Puede negarse a participar o retirar su consentimiento en cualquier momento posterior a la firma sin tener que explicar los motivos. **Su no-participación o retirada posterior del consentimiento no afectará en modo alguno a su atención sanitaria presente o futura. Antes de firmar el consentimiento puede preguntarnos cualquier duda que le surja o consultar con terceras personas.**

MUESTRAS BIOLÓGICAS E INFORMACIÓN ASOCIADA. RIESGOS.-

MUESTRAS BIOLÓGICAS (*Sangre, Líquidos Biológicos, Tejidos*) que se le han obtenido durante su atención sanitaria en este centro hospitalario y que ya no es necesario utilizarlas para la finalidad por la que se obtuvieron.

El responsable guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad del **Dr. Francisco Javier Blanco García**.

Es muy importante subrayar que, para la obtención de las muestras, no se le someterá a ninguna prueba ni riesgo adicional a los que deriven de su adecuada atención médica.

La donación de estas muestras no impedirá que usted o su familia puedan usarlas, cuando sea necesario por motivos de salud, siempre que estén disponibles y no hayan sido anonimizadas.

INFORMACIÓN CLÍNICA que, junto con los resultados de los estudios realizados en las muestras, nos permita extraer conclusiones útiles para el manejo de las enfermedades. Para el buen desarrollo de los estudios de investigación, es necesario obtener datos clínicos relativos al donante de las muestras, por lo que necesitaremos acceder a su historia clínica para recabar la información que será conservada junto a la muestra. (*Más información en el apartado de Confidencialidad.*)

En caso de ser necesaria alguna información o muestra adicional, y siempre que usted nos lo autorice en la hoja de consentimiento, la institución sanitaria se podría poner en contacto con usted para solicitarle nuevamente su colaboración.

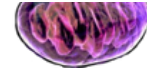
CONDICIONES DE LA DONACIÓN.-

La donación y utilización de muestras biológicas humanas será gratuita, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. Usted renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios económicos que puedan derivarse de las investigaciones que se realicen con la muestra que cede.

Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo para su salud como resultado de su donación. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de los resultados de la investigación corresponderá al investigador y a la Institución donde se realice la investigación.

CONFIDENCIALIDAD.-



Toda la información referida a usted será considerada confidencial y tratada en base a las indicaciones establecidas en la normativa indicada al inicio de este documento. Tal información sólo estará disponible para el personal autorizado, el cual tiene el **deber legal de guardar secreto**. Sus muestras y sus datos clínicos asociados a las mismas, pasarán a formar parte del fichero de datos de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña (XXIAC).

Para garantizar la confidencialidad de su identidad (asegurar que la información de su muestra no se relaciona con su identidad), su muestra sólo irá identificada, desde su entrada en la investigación, con un código. Sólo este código, y nunca su identidad aparecerá en el material con el que se trabaje. La relación entre su código y su identidad, quedará custodiada por el personal autorizado, en una base de datos que cumple todos los requisitos legales exigidos. De esta manera podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de sus muestras, permanezca confidencial pero pueda ser asociada a sus datos, por si fuera información de interés clínico.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores colaboradores con esta investigación, se realizará de manera codificada (se mantendrá por el investigador responsable en este centro el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

Por otro lado, es posible que los resultados de las investigaciones sean publicados en la literatura científica, pero entendiendo estos resultados como los obtenidos de la totalidad de las muestras, no los resultados individuales. Si este fuera el caso, su identidad permanecerá completamente confidencial y nunca formará parte de ninguna publicación.

Con su aceptación a participar con esta línea de investigación de enfermedades reumatológicas usted accede a que esta información pueda ser transferida en las mencionadas condiciones. Usted puede no autorizarnos a realizar las cesiones aquí indicadas, indicando su decisión en el apartado correspondiente de la hoja del consentimiento informado.

Puede ejercitar los **DERECHOS ACCESO, RECTIFICACIÓN, CANCELACIÓN Y/O OPOSICIÓN (DERECHOS ARCO)** que le reconoce la normativa española, dirigiendo su solicitud por escrito junto a una copia de su DNI (con el fin de garantizar que el ejercicio de estos derechos es realizado por la persona autorizada para ello) a:

- **ENTREGA EN PERSONA**, en la Secretaría del Servicio de Reumatología de la XXIAC, a la atención del Dr. Francisco Javier Blanco García.
- **CORREO POSTAL**: Dr. Francisco Javier Blanco García. Consultas Externas Reumatología. Planta 3ª, Hospital Universitario A Coruña. Xerencia Xestión Integrada A Coruña. As Xubias, 84. A Coruña. 15006
- **CORREO ELECTRÓNICO**: Fblagar@sergas.es

Usted puede contactar con el responsable de la Línea de investigación de enfermedades reumatológicas, D. Francisco J. Blanco García si le surge cualquier duda sobre su participación en esta investigación, en el **Teléfono: 981 17 63 99 / 981 17 63 06**. En todo momento se pondrán los medios necesarios para facilitarle la información más adecuada.

Si usted decide **REVOCAR SU CONSENTIMIENTO**, deberá hacernos llegar, de cualquiera de las maneras descritas anteriormente, a la atención del responsable de esta investigación D. Francisco Javier Blanco García, la hoja de revocación totalmente cubierta y firmada que aparece al final de este documento.

Usted debe saber que la revocación tendrá efectos a partir del momento en que se formalice y no afectará a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo hasta ese momento.

RESTRICCIONES DE USO DE LA MUESTRA.-

Usted puede indicarnos si quiere establecer algún tipo de restricción sobre sus muestras y datos, en relación a su posible uso en determinados proyectos de investigación o en cuanto a determinadas cesiones. Para ello dispone de un apartado específico en la hoja de firma del consentimiento informado.

INFORMACIÓN SOBRE RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.-

La evaluación de los resultados se hará sólo por grupos (por ejemplo, hombres / mujeres, grupos de edad, diagnósticos, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudieran obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la suya exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados de las distintas pruebas, si es que los hay, sólo serán conocidas cuando se haya completado la investigación.

El responsable de la investigación tendrá a disposición de los participantes la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras y datos.

En determinadas circunstancias el Comité de Ética competente podrá decidir si es necesario contactar con el participante para facilitarle información de manera individualizada.

Las diferentes investigaciones en las que se utilicen sus muestras y datos pueden requerir la realización de **estudios de biología celular y genéticos**, y a partir de ellos se puede obtener información que puede ser relevante para su salud o la de su familia. En los **estudios genéticos** se puede descubrir información no buscada, lo que se denominan hallazgos inesperados. Cuando esto se produzca, los resultados obtenidos serán validados y analizados por profesionales para determinar si son fiables en un porcentaje óptimo que aconseje su comunicación a las personas afectadas.

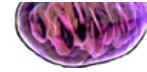
Usted debe saber que tiene derecho a conocer, o no, la información obtenida con el análisis de sus muestras.

En el caso de que usted decida no ser informado, la ley establece que cuando la información obtenida sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de sus familiares, un Comité de expertos estudiará el caso y deberá decidir entre la conveniencia o no de informar a los afectados o a sus representantes legales.

DESTINO FINAL DE LA MUESTRA

Cuando así lo determine la persona responsable de la Línea de investigación con la que usted accedió a colaborar con sus muestras y datos, y siempre que así lo autorice en la hoja de firma del consentimiento informado, las muestras sobrantes junto a los datos asociados serán depositadas en el Biobanco A Coruña.

Los Biobancos son bancos de almacenamiento de muestras de origen humano para su utilización en investigaciones nacionales o internacionales dentro del campo de la biomedicina. Su funcionamiento se



centra en gestionar, bajo criterios de seguridad, calidad y eficiencia; la recepción, procesamiento, almacenamiento y posterior cesión de muestras a los investigadores solicitantes, para que utilicen las mismas en sus proyectos de investigación; siempre y cuando, éstos cumplan todos los requisitos éticos y legales exigibles para este tipo de prácticas.

El Biobanco guardará y dispondrá de estas muestras sobrantes para realizar los estudios de investigación biomédica. Las muestras y la información asociada a las mismas se almacenarán en las áreas establecidas para tal fin, dentro de las instalaciones de la Xerencia Xestión Integrada A Coruña, bajo la responsabilidad de la Dirección del Biobanco A Coruña.

La cesión de las muestras y los datos asociados a las mismas, a los investigadores solicitantes de las muestras, comunitarios (países miembros de la Unión Europea) o extracomunitarios (no miembros), se efectuará con carácter general de manera anónima o disociada, es decir, sólo se cederá la muestra asociada a datos genéricos, sin que se pueda identificar por medios razonables su identidad. En las investigaciones en las que se considere necesario para el desarrollo de las mismas, a propuesta del investigador responsable y previa autorización del comité de ética competente, podrán enviarse sus muestras codificadas (se mantendrá por el biobanco el vínculo que relaciona su identidad con la muestra cedida). A todos ellos se les exigirá que nos garanticen que trabajarán con el mismo nivel de protección de datos exigido por la normativa española.

El Biobanco A Coruña asume como propio todo lo descrito en los apartados previos de este documento en relación a la confidencialidad, los posibles hallazgos, etc.

El biobanco podrá repercutir únicamente los costes de obtención, procesado y envío de las muestras a los investigadores/instituciones que las solicitaron.

BIOBANCO A CORUÑA

TITULAR DIRECCIÓN CIENTÍFICA: Angel Concha López

TELÉFONO DE CONTACTO: 981 17 64 37. CORREO ELECTRÓNICO:
BioBanco.CHUAC@sergas.es

CIERRE DEL BIOBANCO.-

De producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en la página web del Biobanco y/o Centro Hospitalario http://www.inibic.es/inv_apoyo_biobanco.html y en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica del Instituto de Salud Carlos III (ISC III), con página web www.isciii.es, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PARTICIPANTE MAYOR DE EDAD

(Espacio para colocar la etiqueta con los datos del donante muestra)

Yo,..... *(Nombre y apellidos del participante manuscritos)* he leído la hoja de información y pude hacer todas las preguntas que consideré necesarias, y acepto participar en la Línea de investigación de enfermedades reumatológicas con mis muestras y datos para que se utilicen en las condiciones que me han informado.

RESTRICCIONES DE USO (usted podrá indicarnos cruzando la correspondiente casilla las restricciones de uso que considere. En caso de no marcar ninguna casilla entenderemos que NO manifiesta ninguna condición de uso).

- NO** autorizo a utilizar mis muestras y datos en investigaciones que
.....
.....
.....
- NO** autorizo a que consulten y obtengan información de mi historia clínica.
- NO** acepto que contacten conmigo cuando sea necesario.
- NO** quiero ser informado de los resultados de las investigaciones que sean de interés para mi salud.
- NO** autorizo la cesión de mis muestras y datos de manera codificada (disociada).
- NO** autorizo la cesión de mis muestras y datos fuera de la Unión Europea.
- NO** autorizo el depósito en el **Biobanco A Coruña** de mis muestras y datos en las condiciones indicadas en la hoja de información

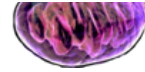
Si acepta que se contacte con usted cuando sea necesario, por favor indique su Teléfono / E-mail de contacto:

.....
.....

Firma del participante
Identidad del participante:
.....

Firma de la persona que informa
Identidad de la persona que informa:

Firma del testigo
Confirмо el consentimiento verbal del participante, el cual lo autoriza a firmar en su nombre



Identidad del testigo: **DNI:**
.....

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante no pueda leer y/o escribir y delegue la firma en el testigo.

Firma del representante legal

Identidad representante legal: **DNI:**
.....

Solo se firmará en aquellos casos en los que el participante esté incapacitado legalmente.

En, **a** **de** **de**

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina.

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo, D./Dña: con DNI
.....

Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha:

Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al(nombre del Centro Sanitario), que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.
La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.
- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....

Yo, D./Dña: con DNI
.....

En calidad de: (señale la opción aplicable a su caso)

- Testigo que firma en lugar
- Representante legal

de D./Dña: con DNI,

Revoco / anulo el consentimiento prestado en fecha:

Y no deseo proseguir la donación voluntaria realizada al(nombre del Centro Sanitario), que doy con esta fecha por finalizada.

- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE LAS MUESTRAS.
- SOLICITO ELIMINACIÓN SOLO DE MIS DATOS PERSONALES.
La muestra quedará anonimizada irreversiblemente y podrá ser utilizada en proyectos de investigación.
- SOLICITO ELIMINACIÓN TOTAL DE MIS DATOS Y MUESTRAS.

Fdo.:

En.....a.....de.....de 20.....



ANEXO II

Tabla con las regiones DMs hipermetiladas en el haplogrupo J en relación al H, ordenadas de forma decreciente por sus diferencias en el valor- β .

ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
FUCA1	0,3993	0,2808	-0,1185	2_TssAFlnk	0,0278	KIF17	0,0231	0,0158	-0,0073	1_TssA	0,0096
SCGB3A2	0,4639	0,3764	-0,0875	14_ReprPC Wk	0,0390	SLC31A2	0,0364	0,0291	-0,0073	1_TssA	0,0039
BATF	0,4005	0,3135	-0,0870	1_TssA	0,0193	PCDH1	0,0467	0,0394	-0,0073	1_TssA	0,0251
SMAD9	0,6520	0,5694	-0,0826	5_TxWk	0,0201	DDT	0,0358	0,0286	-0,0072	15_Quies	0,0381
PARC	0,5195	0,4409	-0,0786	5_TxWk	0,0368	TTK	0,0487	0,0416	-0,0071	1_TssA	0,0465
RP11-631M21.2	0,6617	0,5863	-0,0754	13_ReprPC	0,0459	KDM3A	0,0481	0,0410	-0,0071	1_TssA	0,0227
MAP3K7IP1	0,6907	0,6155	-0,0753	15_Quies	0,0022	LGI3	0,0498	0,0427	-0,0071	11_BivFlnk	0,0427
CHRN3	0,5328	0,4588	-0,0740	14_ReprPC Wk	0,0462	FLRT2	0,0262	0,0191	-0,0071	1_TssA	0,0020
C4orf50	0,2582	0,1859	-0,0722	15_Quies	0,0466	DNAJB4	0,0565	0,0495	-0,0070	1_TssA	0,0325
MT2A	0,2529	0,1822	-0,0707	2_TssAFlnk	0,0468	ATP2A3	0,0449	0,0380	-0,0070	11_BivFlnk	0,0078
GPR132	0,4636	0,3932	-0,0705	7_Enh	0,0250	PTPLA	0,0669	0,0599	-0,0069	2_TssAFlnk	0,0445
JAK2	0,5386	0,4718	-0,0668	2_TssAFlnk	0,0050	NDUFC2	0,0504	0,0435	-0,0069	1_TssA	0,0180

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
MILT6	0,1775	0,1175	-0,0601	2_TssAFlnk	0,0101	PER1	0,0339	0,0270	-0,0069	1_TssA	0,0210
MCCC1	0,2090	0,1506	-0,0584	1_TssA	0,0413	MYH10	0,0419	0,0350	-0,0069	1_TssA	0,0378
CIAO1	0,4120	0,3545	-0,0575	2_TssAFlnk	0,0308	C15orf57	0,0540	0,0473	-0,0068	1_TssA	0,0392
EI24	0,1412	0,0869	-0,0543	1_TssA	0,0024	C4orf22	0,0331	0,0263	-0,0068	1_TssA	0,0475
KCNQ1	0,3054	0,2523	-0,0531	2_TssAFlnk	0,0161	FOXA3	0,0367	0,0300	-0,0067	10_TssBiv	0,0085
DCUN1D1	0,3432	0,2905	-0,0527	1_TssA	0,0034	WNT2B	0,0319	0,0252	-0,0067	2_TssAFlnk	0,0236
SLC7A7	0,6903	0,6378	-0,0525	5_TxWk	0,0283	DCBLD2	0,0363	0,0296	-0,0067	1_TssA	0,0269
HIGD1B	0,6051	0,5528	-0,0523	5_TxWk	0,0182	EPHB1	0,0298	0,0231	-0,0067	2_TssAFlnk	0,0149
LBP	0,7702	0,7181	-0,0521	13_ReprPC	0,0409	LETM2	0,0404	0,0337	-0,0067	1_TssA	0,0003
GALNT1	0,7107	0,6596	-0,0511	7_Enh	0,0435	PRR16	0,0380	0,0313	-0,0067	1_TssA	0,0371
BECN1	0,1461	0,0956	-0,0505	1_TssA	0,0030	PFKP	0,0448	0,0381	-0,0067	1_TssA	0,0297
SMAD9	0,9018	0,8522	-0,0496	4_Tx	0,0052	GLUL	0,0333	0,0267	-0,0066	1_TssA	0,0324
SCG2	0,1688	0,1193	-0,0495	7_Enh	0,0006	LSS	0,0320	0,0254	-0,0066	1_TssA	0,0261

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
MLC1	0,4067	0,3573	-0,0494	2_TssAFlnk	0,0323	BMP2K	0,0434	0,0368	-0,0066	1_TssA	0,0313
GOLGA9P	0,8010	0,7542	-0,0468	15_Quies	0,0460	NDUFB8	0,0572	0,0506	-0,0066	1_TssA	0,0123
35673	0,7655	0,7188	-0,0467	15_Quies	0,0249	MLH3	0,0471	0,0405	-0,0066	2_TssAFlnk	0,0033
ATP2C1	0,2603	0,2141	-0,0463	1_TssA	0,0375	ADAP2	0,0480	0,0414	-0,0066	10_TssBiv	0,0342
H6PD	0,3824	0,3363	-0,0461	2_TssAFlnk	0,0393	RAB8B	0,0311	0,0245	-0,0066	1_TssA	0,0006
OCM2	0,7301	0,6851	-0,0450	14_ReprPC Wk	0,0423	MRC2	0,0428	0,0362	-0,0066	1_TssA	0,0027
LTA	0,6876	0,6435	-0,0442	14_ReprPC Wk	0,0415	ARRHGFF17	0,0336	0,0270	-0,0065	1_TssA	0,0228
PPP2R4	0,4732	0,4307	-0,0424	2_TssAFlnk	0,0199	FN1	0,0400	0,0335	-0,0065	3_TxFlnk	0,0345
NCRNA00175	0,8675	0,8264	-0,0411	15_Quies	0,0239	CREB3	0,0317	0,0252	-0,0065	1_TssA	0,0416
SCN2A	0,2830	0,2435	-0,0395	1_TssA	0,0289	RNF19B	0,0646	0,0581	-0,0065	1_TssA	0,0289
ARF5	0,4841	0,4460	-0,0381	2_TssAFlnk	0,0072	RETSAT	0,0380	0,0315	-0,0065	2_TssAFlnk	0,0107

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
GPR26	0,2750	0,2369	-0,0380	13_ReprPC	0,0310	DNAJC18	0,0366	0,0302	-0,0065	1_TssA	0,0215
CNGB3	0,8610	0,8236	-0,0374	15_Quies	0,0153	SMOC2	0,0486	0,0422	-0,0064	11_BivFlnk	0,0332
CCB2	0,6327	0,5953	-0,0374	15_Quies	0,0399	PEX5	0,0360	0,0296	-0,0064	1_TssA	0,0109
CRBN	0,1881	0,1507	-0,0374	2_TssAFlnk	0,0118	BOP1	0,0429	0,0365	-0,0064	1_TssA	0,0329
THOP1	0,1227	0,0854	-0,0373	2_TssAFlnk	0,0116	LHFP	0,0326	0,0263	-0,0064	1_TssA	0,0007
ALPL2	0,8100	0,7728	-0,0372	14_ReprPC Wk	0,0404	EEF2	0,0467	0,0403	-0,0064	2_TssAFlnk	0,0287
LEPR	0,1665	0,1295	-0,0370	1_TssA	0,0154	STK36	0,0462	0,0399	-0,0063	1_TssA	0,0351
TMEM92	0,1964	0,1607	-0,0357	7_Enh	0,0479	FAM70B	0,0322	0,0258	-0,0063	2_TssAFlnk	0,0090
ABHD12B	0,8233	0,7878	-0,0355	13_ReprPC	0,0090	SFRS14	0,0440	0,0376	-0,0063	2_TssAFlnk	0,0372
ACP6	0,4165	0,3831	-0,0334	5_TxWk	0,0405	MCM7	0,0455	0,0392	-0,0063	1_TssA	0,0401
HLA-DRA	0,7927	0,7603	-0,0323	14_ReprPC Wk	0,0086	C10orf2	0,0369	0,0306	-0,0063	1_TssA	0,0381

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
SP6	0,6241	0,5920	-0,0321	14_ReprPC Wk	0,0283	TIGD3	0,0304	0,0241	-0,0063	2_TssAFlnk	0,0427
CCDC82	0,0949	0,0629	-0,0320	1_TssA	0,0361	PTPN23	0,0340	0,0278	-0,0063	1_TssA	0,0073
SIT1	0,7727	0,7411	-0,0316	5_TxWk	0,0451	NINJ1	0,0332	0,0269	-0,0062	2_TssAFlnk	0,0472
TNNC2	0,8195	0,7884	-0,0311	5_TxWk	0,0349	UTP3	0,0389	0,0327	-0,0062	1_TssA	0,0094
NANOS1	0,2559	0,2254	-0,0305	2_TssAFlnk	0,0372	NUP54	0,0310	0,0248	-0,0062	1_TssA	0,0148
CLEC2D	0,8563	0,8264	-0,0299	5_TxWk	0,0137	REXO2	0,0434	0,0373	-0,0061	2_TssAFlnk	0,0155
PFKM	0,8175	0,7884	-0,0290	5_TxWk	0,0285	MATR3	0,0348	0,0287	-0,0061	2_TssAFlnk	0,0107
TFEC	0,1570	0,1290	-0,0280	7_Enh	0,0278	LOXL2	0,0317	0,0255	-0,0061	1_TssA	0,0225
KCNN4	0,1184	0,0912	-0,0272	2_TssAFlnk	0,0163	TUBA1B	0,0363	0,0302	-0,0061	2_TssAFlnk	0,0036
CTSO	0,0867	0,0598	-0,0270	1_TssA	0,0053	CWF19L1	0,0473	0,0413	-0,0061	1_TssA	0,0125
ZNF114	0,0812	0,0548	-0,0264	1_TssA	0,0045	TMEM199	0,0488	0,0427	-0,0061	1_TssA	0,0497

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
KIAA1191	0,1086	0,0822	-0,0263	2_TssAFlnk	0,0444	SF3A3	0,0299	0,0239	-0,0060	1_TssA	0,0299
DUSP12	0,1206	0,0949	-0,0257	2_TssAFlnk	0,0067	RPS27A	0,0356	0,0296	-0,0060	1_TssA	0,0010
TNFSF13B	0,1171	0,0915	-0,0257	2_TssAFlnk	0,0222	WDSUB1	0,0314	0,0253	-0,0060	1_TssA	0,0211
CDKAL1	0,1195	0,0940	-0,0255	1_TssA	0,0212	BBS4	0,0534	0,0474	-0,0060	1_TssA	0,0183
NUP214	0,1562	0,1311	-0,0251	2_TssAFlnk	0,0136	CNDP2	0,0629	0,0569	-0,0060	1_TssA	0,0350
ZNF12	0,1182	0,0936	-0,0246	2_TssAFlnk	0,0047	DPP3	0,0259	0,0200	-0,0059	1_TssA	0,0053
RRP15	0,1174	0,0929	-0,0245	1_TssA	0,0404	ZNF660	0,0318	0,0259	-0,0059	2_TssAFlnk	0,0165
PKP4	0,2762	0,2524	-0,0238	1_TssA	0,0185	ULK1	0,0266	0,0206	-0,0059	1_TssA	0,0033
MCCC2	0,1296	0,1059	-0,0237	2_TssAFlnk	0,0263	PSMG1	0,0297	0,0238	-0,0059	1_TssA	0,0137
ANKRA2	0,1619	0,1383	-0,0236	1_TssA	0,0183	NUDT22	0,0356	0,0297	-0,0059	1_TssA	0,0155
SP100	0,1210	0,0974	-0,0236	1_TssA	0,0182	GAS6	0,0322	0,0263	-0,0059	1_TssA	0,0169
DEFB1	0,9004	0,8770	-0,0234	13_ReprPC	0,0074	ST3GAL5	0,0514	0,0455	-0,0059	1_TssA	0,0415

ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
GSTP1	0,1276	0,1042	-0,0234	2_TssAFlnk	0,0074	NUDCD3	0,0394	0,0335	-0,0059	1_TssA	0,0150
UBB	0,1184	0,0951	-0,0233	1_TssA	0,0183	CYBASC3	0,0456	0,0397	-0,0059	1_TssA	0,0246
SACM1L	0,1413	0,1182	-0,0231	1_TssA	0,0265	AKR1B1	0,0294	0,0236	-0,0059	1_TssA	0,0455
DCDC1	0,1131	0,0905	-0,0226	1_TssA	0,0097	MEN1	0,0439	0,0380	-0,0058	1_TssA	0,0241
LOC388428	0,5842	0,5618	-0,0224	13_ReprPC	0,0490	ARL8A	0,0431	0,0373	-0,0058	2_TssAFlnk	0,0287
UFD1L	0,0927	0,0705	-0,0223	1_TssA	0,0018	ZNF276	0,0350	0,0292	-0,0058	1_TssA	0,0091
PIGB	0,0713	0,0493	-0,0220	1_TssA	0,0270	AHCY	0,0312	0,0254	-0,0058	1_TssA	0,0364
C9	0,9011	0,8796	-0,0214	15_Quies	0,0340	FBXL3	0,0275	0,0217	-0,0058	1_TssA	0,0383
TUBA1A	0,2185	0,1972	-0,0213	1_TssA	0,0330	STAM2	0,0363	0,0305	-0,0058	1_TssA	0,0314
ACRBP	0,9080	0,8869	-0,0211	4_Tx	0,0027	FBXW7	0,0443	0,0385	-0,0057	1_TssA	0,0273
C2orf44	0,0884	0,0674	-0,0210	1_TssA	0,0203	TWSG1	0,0225	0,0168	-0,0057	1_TssA	0,0076
ESPL1	0,0959	0,0750	-0,0209	1_TssA	0,0145	ETHE1	0,0338	0,0281	-0,0057	1_TssA	0,0314

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
SPTBN2	0,8994	0,8789	-0,0205	14_ReprPC Wk	0,0367	STOM	0,0292	0,0235	-0,0057	1_TssA	0,0010
WHSC2	0,1358	0,1154	-0,0203	2_TssAFlnk	0,0267	BAT5	0,0406	0,0349	-0,0057	1_TssA	0,0291
TWSG1	0,0775	0,0577	-0,0197	2_TssAFlnk	0,0148	MCL1	0,0405	0,0349	-0,0056	1_TssA	0,0166
ACSBG2	0,8754	0,8558	-0,0196	15_Quies	0,0373	STK10	0,0340	0,0284	-0,0056	1_TssA	0,0483
TCEB1	0,0977	0,0785	-0,0192	1_TssA	0,0483	FAR1	0,0433	0,0377	-0,0056	1_TssA	0,0294
MOCS1	0,9092	0,8910	-0,0182	5_TxWk	0,0377	RRBP1	0,0286	0,0230	-0,0056	1_TssA	0,0340
NOL12	0,0826	0,0645	-0,0181	2_TssAFlnk	0,0042	PLK2	0,0349	0,0293	-0,0056	1_TssA	0,0448
RHBDD3	0,0925	0,0751	-0,0174	2_TssAFlnk	0,0070	ERBB3	0,0473	0,0418	-0,0055	2_TssAFlnk	0,0229
C16orf70	0,0540	0,0366	-0,0174	1_TssA	0,0316	RAB11FIP5	0,0401	0,0346	-0,0055	2_TssAFlnk	0,0033
C6orf108	0,0736	0,0563	-0,0173	2_TssAFlnk	0,0035	NAALAD2	0,0442	0,0387	-0,0055	1_TssA	0,0119
TAF5	0,0638	0,0466	-0,0172	1_TssA	0,0123	TP53INP2	0,0246	0,0192	-0,0055	1_TssA	0,0126

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
BM11	0,0596	0,0425	-0,0171	1_TsSA	0,0398	PMS2L3	0,0346	0,0291	-0,0054	1_TsSA	0,0107
HOXA9	0,0757	0,0588	-0,0169	1_TsSA	0,0289	ADAMTS1	0,0503	0,0449	-0,0054	1_TsSA	0,0490
C1orf61	0,0958	0,0789	-0,0169	13_ReprPC	0,0410	GLYR1	0,0296	0,0241	-0,0054	1_TsSA	0,0471
FDFT1	0,0543	0,0375	-0,0169	1_TsSA	0,0475	CCAR1	0,0380	0,0326	-0,0054	1_TsSA	0,0024
SCGB2A2	0,8409	0,8247	-0,0162	14_ReprPC WK	0,0303	CANT1	0,0350	0,0296	-0,0054	2_TsSAFlnk	0,0427
IDH3A	0,0765	0,0604	-0,0161	1_TsSA	0,0061	GABRA2	0,0311	0,0257	-0,0054	13_ReprPC	0,0370
SPAG8	0,0595	0,0436	-0,0159	1_TsSA	0,0146	TTC12	0,0231	0,0177	-0,0054	1_TsSA	0,0130
TRIM52	0,0747	0,0590	-0,0157	1_TsSA	0,0379	ZBTB7A	0,0421	0,0368	-0,0053	1_TsSA	0,0205
CTTNBP2NL	0,0634	0,0478	-0,0157	2_TsSAFlnk	0,0210	SGTB	0,0394	0,0341	-0,0053	1_TsSA	0,0008
FEN1	0,0607	0,0457	-0,0150	1_TsSA	0,0132	LITAF	0,0520	0,0467	-0,0053	1_TsSA	0,0465
ARAP1	0,0687	0,0538	-0,0149	2_TsSAFlnk	0,0312	C7orf25	0,0380	0,0327	-0,0053	1_TsSA	0,0270
P2RY2	0,0613	0,0470	-0,0143	2_TsSAFlnk	0,0219	SICO4A1	0,0381	0,0328	-0,0053	13_ReprPC	0,0176

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
LYST	0,0644	0,0501	-0,0143	2_TssAFlnk	0,0384	TMF1	0,0278	0,0226	-0,0052	1_TssA	0,0067
CREG1	0,0709	0,0567	-0,0142	2_TssAFlnk	0,0109	MAP4K5	0,0299	0,0247	-0,0052	2_TssAFlnk	0,0288
TRNAU1AP	0,0840	0,0699	-0,0141	1_TssA	0,0345	EMP2	0,0273	0,0222	-0,0052	1_TssA	0,0062
TCEB1P	0,8866	0,8727	-0,0139	5_TxWk	0,0103	ZBTB5	0,0484	0,0432	-0,0052	1_TssA	0,0339
CENPO	0,0698	0,0559	-0,0139	2_TssAFlnk	0,0204	CDS1	0,0324	0,0273	-0,0051	11_BivFlnk	0,0081
MRP514	0,0878	0,0740	-0,0138	1_TssA	0,0090	FPGS	0,0298	0,0247	-0,0051	2_TssAFlnk	0,0023
ZNF684	0,0676	0,0538	-0,0137	1_TssA	0,0150	SERF2	0,0234	0,0183	-0,0051	1_TssA	0,0081
SIRT5	0,0743	0,0608	-0,0136	1_TssA	0,0263	VPS45	0,0359	0,0308	-0,0051	1_TssA	0,0164
GRM2	0,8049	0,7914	-0,0135	14_ReprPC Wk	0,0244	TARBP1	0,0252	0,0202	-0,0051	1_TssA	0,0435
CIRH1A	0,0453	0,0318	-0,0135	1_TssA	0,0380	MC1R	0,0336	0,0286	-0,0050	2_TssAFlnk	0,0232
EIF3K	0,0750	0,0615	-0,0135	1_TssA	0,0252	NEIL3	0,0312	0,0262	-0,0050	1_TssA	0,0189
C17orf80	0,0715	0,0582	-0,0134	1_TssA	0,0199	EPST11	0,0295	0,0245	-0,0050	2_TssAFlnk	0,0070

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferenc ia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferen cia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
ZNF426	0,0544	0,0411	-0,0133	1_TssA	0,0456	RDX	0,0426	0,0376	-0,0050	1_TssA	0,0238
TNKS	0,0853	0,0721	-0,0131	2_TssAFlnk	0,0114	SPATA13	0,0310	0,0261	-0,0049	1_TssA	0,0372
IGFBP3	0,0677	0,0546	-0,0131	2_TssAFlnk	0,0053	RFC1	0,0479	0,0430	-0,0049	2_TssAFlnk	0,0485
NAT8L	0,0906	0,0779	-0,0127	14_ReprPC Wk	0,0409	GPR89B	0,0322	0,0273	-0,0049	1_TssA	0,0214
FAM73B	0,0605	0,0479	-0,0126	1_TssA	0,0354	FECH	0,0321	0,0272	-0,0049	1_TssA	0,0097
WDR17	0,0520	0,0396	-0,0124	11_BivFlnk	0,0178	CDC26	0,0424	0,0375	-0,0049	1_TssA	0,0372
PTER	0,0577	0,0453	-0,0124	1_TssA	0,0210	CUX1	0,0391	0,0342	-0,0049	2_TssAFlnk	0,0141
MORN4	0,1152	0,1029	-0,0124	1_TssA	0,0214	MFN1	0,0292	0,0243	-0,0049	1_TssA	0,0167
PIAS1	0,0487	0,0365	-0,0123	1_TssA	0,0036	ZNF671	0,0447	0,0399	-0,0048	1_TssA	0,0140
CCDC12	0,0806	0,0685	-0,0122	1_TssA	0,0051	TRNT1	0,0331	0,0283	-0,0048	1_TssA	0,0332
TOMM20L	0,1094	0,0972	-0,0122	2_TssAFlnk	0,0265	CBL	0,0287	0,0239	-0,0048	1_TssA	0,0028
CDK12	0,0681	0,0560	-0,0122	1_TssA	0,0464	FAM179 B	0,0284	0,0236	-0,0048	1_TssA	0,0344

ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
AVEN	0,0610	0,0489	-0,0121	1_TsSA	0,0102	NTN4	0,0285	0,0237	-0,0048	1_TsSA	0,0333
IGFBP3	0,1148	0,1027	-0,0121	2_TsSAFlnk	0,0132	LASP1	0,0275	0,0227	-0,0048	1_TsSA	0,0359
ACPAT1	0,0467	0,0347	-0,0120	1_TsSA	0,0136	MAD2L2	0,0297	0,0250	-0,0048	2_TsSAFlnk	0,0092
USE1	0,0414	0,0294	-0,0120	1_TsSA	0,0113	PPP1R14C	0,0319	0,0272	-0,0047	1_TsSA	0,0112
ITSN2	0,0528	0,0409	-0,0119	1_TsSA	0,0007	H6PD	0,0269	0,0221	-0,0047	2_TsSAFlnk	0,0437
C11orf24	0,0768	0,0650	-0,0118	2_TsSAFlnk	0,0114	DSTN	0,0298	0,0251	-0,0047	1_TsSA	0,0018
MRRP12	0,0440	0,0326	-0,0114	1_TsSA	0,0012	PPME1	0,0352	0,0305	-0,0047	1_TsSA	0,0348
BET1	0,0714	0,0601	-0,0113	1_TsSA	0,0379	MAN1B1	0,0211	0,0165	-0,0046	1_TsSA	0,0044
MTFR1	0,0508	0,0396	-0,0112	2_TsSAFlnk	0,0067	CENPM	0,0289	0,0243	-0,0046	1_TsSA	0,0238
CCNO	0,0534	0,0422	-0,0112	2_TsSAFlnk	0,0106	NFYB	0,0285	0,0239	-0,0046	1_TsSA	0,0367
RAMP2	0,0696	0,0584	-0,0112	10_TsBiv	0,0205	RAB20	0,0436	0,0390	-0,0046	1_TsSA	0,0129
RGS4	0,0584	0,0474	-0,0111	1_TsSA	0,0229	CAPNS1	0,0228	0,0182	-0,0046	1_TsSA	0,0347

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
UCDH	0,0530	0,0422	-0,0108	1_TsSA	0,0174	USP5	0,0379	0,0333	-0,0045	1_TsSA	0,0090
SIRPA	0,0544	0,0438	-0,0106	2_TsSAFlnk	0,0491	LEO1	0,0274	0,0229	-0,0045	1_TsSA	0,0189
SMEK1	0,0505	0,0400	-0,0105	2_TsSAFlnk	0,0238	CCNYL1	0,0303	0,0258	-0,0045	1_TsSA	0,0226
PKIG	0,0533	0,0428	-0,0105	1_TsSA	0,0293	NQO2	0,0330	0,0285	-0,0045	2_TsSAFlnk	0,0255
ARHGAP11A	0,0443	0,0339	-0,0105	1_TsSA	0,0144	ERCC2	0,0483	0,0438	-0,0044	1_TsSA	0,0414
PCYOX1L	0,0619	0,0514	-0,0104	2_TsSAFlnk	0,0103	HINFP	0,0282	0,0238	-0,0044	1_TsSA	0,0080
FKBP7	0,0596	0,0493	-0,0103	1_TsSA	0,0358	FOS	0,0335	0,0291	-0,0044	1_TsSA	0,0210
ITPR2	0,0438	0,0335	-0,0103	1_TsSA	0,0005	RBM19	0,0311	0,0267	-0,0044	1_TsSA	0,0143
RASGRP2	0,0526	0,0424	-0,0102	11_BivFlnk	0,0223	C18orf54	0,0248	0,0205	-0,0043	1_TsSA	0,0040
ICA1	0,0761	0,0659	-0,0102	10_TsSBiv	0,0353	DCAF4	0,0364	0,0321	-0,0043	1_TsSA	0,0301
C19orf22	0,0374	0,0272	-0,0101	1_TsSA	0,0024	TRAF7	0,0401	0,0358	-0,0043	1_TsSA	0,0484
EXOC7	0,0514	0,0414	-0,0100	2_TsSAFlnk	0,0338	LRRC59	0,0306	0,0263	-0,0043	1_TsSA	0,0405
PROS1	0,0419	0,0319	-0,0100	2_TsSAFlnk	0,0010	PRRG4	0,0336	0,0293	-0,0043	2_TsSAFlnk	0,0420

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
KDEIC1	0,0341	0,0242	-0,0098	1_TsSA	0,0221	ENTPD6	0,0227	0,0184	-0,0043	1_TsSA	0,0388
C6orf208	0,0604	0,0507	-0,0097	2_TsSAFlnk	0,0048	ZSCAN2	0,0210	0,0168	-0,0042	1_TsSA	0,0156
ATXN7	0,0475	0,0379	-0,0096	2_TsSAFlnk	0,0494	SNAI1	0,0306	0,0264	-0,0042	1_TsSA	0,0229
AP3D1	0,0482	0,0385	-0,0096	1_TsSA	0,0052	TMEM159	0,0359	0,0317	-0,0042	2_TsSAFlnk	0,0139
C17orf79	0,0438	0,0343	-0,0094	2_TsSAFlnk	0,0450	PTGR2	0,0314	0,0272	-0,0041	1_TsSA	0,0300
THAP7	0,0361	0,0266	-0,0094	1_TsSA	0,0009	TMEM38B	0,0337	0,0296	-0,0041	1_TsSA	0,0376
DUSP11	0,0565	0,0471	-0,0094	1_TsSA	0,0405	NIPSNAP3B	0,0280	0,0239	-0,0041	1_TsSA	0,0123
ARMC4	0,0561	0,0467	-0,0094	1_TsSA	0,0101	DIABLO	0,0251	0,0209	-0,0041	1_TsSA	0,0440
ARHGEF10L	0,0418	0,0325	-0,0094	1_TsSA	0,0013	AQP6	0,0296	0,0255	-0,0041	2_TsSAFlnk	0,0363
STK17A	0,0421	0,0328	-0,0093	1_TsSA	0,0037	USP13	0,0259	0,0217	-0,0041	1_TsSA	0,0090

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
STRBP	0,0339	0,0247	-0,0092	10_TssBiv	0,0010	SSSCA1	0,0284	0,0243	-0,0041	1_TssA	0,0107
C17orf71	0,0451	0,0360	-0,0092	1_TssA	0,0162	SMPD1	0,0217	0,0177	-0,0041	2_TssAFlnk	0,0119
KRIT1	0,0467	0,0378	-0,0089	1_TssA	0,0069	EPHB3	0,0312	0,0271	-0,0041	2_TssAFlnk	0,0092
LPPR2	0,0315	0,0226	-0,0089	1_TssA	0,0011	BMPR1A	0,0281	0,0240	-0,0040	1_TssA	0,0152
SGK3	0,0543	0,0454	-0,0089	2_TssAFlnk	0,0436	POLE	0,0266	0,0226	-0,0040	1_TssA	0,0489
SMARCA11	0,9483	0,9394	-0,0088	5_TxWk	0,0139	TSSK3	0,0261	0,0221	-0,0040	2_TssAFlnk	0,0275
H3F3B	0,0346	0,0258	-0,0088	1_TssA	0,0131	CABC1	0,0232	0,0192	-0,0039	1_TssA	0,0295
VAX2	0,0542	0,0455	-0,0088	10_TssBiv	0,0149	RAC1	0,0290	0,0250	-0,0039	1_TssA	0,0492
NPAS1	0,0671	0,0583	-0,0087	1_TssA	0,0400	GNPTAB	0,0248	0,0209	-0,0039	1_TssA	0,0433
SOX2	0,0408	0,0321	-0,0087	10_TssBiv	0,0178	BRI3	0,0232	0,0193	-0,0039	1_TssA	0,0130
VWDC2	0,0693	0,0606	-0,0087	13_ReprPC	0,0169	SLC35E2	0,0334	0,0295	-0,0038	1_TssA	0,0455
NFKB2	0,0566	0,0479	-0,0087	1_TssA	0,0031	CYP26A1	0,0338	0,0300	-0,0038	11_BivFlnk	0,0376
GMNIN	0,0588	0,0501	-0,0087	2_TssAFlnk	0,0474	TMEM117	0,0307	0,0269	-0,0038	1_TssA	0,0259

ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor- β en haplogru po J	Media del valor- β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
RPS3	0,0393	0,0306	-0,0087	1_TssA	0,0196	CCNT1	0,0306	0,0269	-0,0037	1_TssA	0,0261
LASS1	0,0670	0,0583	-0,0086	1_TssA	0,0360	KDM5B	0,0214	0,0178	-0,0037	1_TssA	0,0274
GTF2B	0,0459	0,0373	-0,0086	1_TssA	0,0191	ROCK1	0,0199	0,0162	-0,0036	1_TssA	0,0426
TUSC4	0,0587	0,0502	-0,0085	1_TssA	0,0263	B3GAT1	0,0211	0,0175	-0,0036	14_ReprPC Wk	0,0304
UBQLN1	0,0322	0,0237	-0,0085	1_TssA	0,0192	MEIS1	0,0249	0,0213	-0,0036	1_TssA	0,0489
IL2RB	0,9479	0,9393	-0,0085	14_ReprPC Wk	0,0359	ETF1	0,0236	0,0200	-0,0036	1_TssA	0,0201
GALNT10	0,0541	0,0456	-0,0085	1_TssA	0,0484	NTNG1	0,0285	0,0249	-0,0036	11_BivFlnk	0,0182
STK3	0,0605	0,0520	-0,0084	1_TssA	0,0055	RHPN2	0,0272	0,0236	-0,0036	10_TssBiv	0,0231
USP32	0,0632	0,0548	-0,0084	1_TssA	0,0236	ZNF14	0,0260	0,0224	-0,0036	1_TssA	0,0437
TRAF3	0,0459	0,0375	-0,0083	1_TssA	0,0260	SNX5	0,0277	0,0242	-0,0035	1_TssA	0,0303
SERTAD1	0,0350	0,0267	-0,0083	1_TssA	0,0428	B3GALN T1	0,0294	0,0259	-0,0035	1_TssA	0,0316

ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
BCCIP	0,0405	0,0322	-0,0083	1_TsSA	0,0467	NSUN4	0,0223	0,0188	-0,0035	1_TsSA	0,0204
FCF1	0,0554	0,0471	-0,0083	1_TsSA	0,0119	GNL1	0,0208	0,0173	-0,0035	1_TsSA	0,0469
DHRS7	0,0412	0,0329	-0,0083	1_TsSA	0,0080	NSUN5	0,0357	0,0323	-0,0034	1_TsSA	0,0368
PLEKHA1	0,0478	0,0395	-0,0083	2_TsSAFlnk	0,0006	ZNF295	0,0270	0,0235	-0,0034	1_TsSA	0,0135
IL6ST	0,0477	0,0395	-0,0083	1_TsSA	0,0454	HIC2	0,0196	0,0162	-0,0034	15_Quies	0,0379
KLF16	0,0516	0,0434	-0,0083	1_TsSA	0,0023	PDIA2	0,0271	0,0237	-0,0034	14_ReprPC Wk	0,0469
MLLT1	0,0521	0,0438	-0,0083	1_TsSA	0,0390	ASCC3	0,0189	0,0155	-0,0034	1_TsSA	0,0477
ARL6IP1	0,0467	0,0385	-0,0082	2_TsSAFlnk	0,0456	ADARB1	0,0280	0,0246	-0,0034	1_TsSA	0,0326
KRAS	0,0363	0,0282	-0,0081	1_TsSA	0,0099	MED8	0,0213	0,0180	-0,0033	1_TsSA	0,0351
DEDD2	0,0455	0,0374	-0,0081	1_TsSA	0,0141	TM9SF1	0,0244	0,0212	-0,0032	1_TsSA	0,0408
HOXB7	0,0456	0,0376	-0,0080	2_TsSAFlnk	0,0107	PRPF38B	0,0185	0,0153	-0,0032	1_TsSA	0,0055
USP49	0,0541	0,0461	-0,0080	1_TsSA	0,0058	CA11	0,0260	0,0228	-0,0032	2_TsSAFlnk	0,0451

ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
TERF2	0,0344	0,0264	-0,0080	1_TssA	0,0147	LRRC61	0,0330	0,0298	-0,0032	2_TssAFlnk	0,0457
VP513A	0,0316	0,0237	-0,0079	1_TssA	0,0066	CDKN1C	0,0254	0,0222	-0,0032	1_TssA	0,0268
KCNT2	0,0491	0,0411	-0,0079	1_TssA	0,0155	STAM	0,0268	0,0236	-0,0031	1_TssA	0,0387
GCAT	0,0625	0,0545	-0,0079	2_TssAFlnk	0,0362	GSC	0,0251	0,0220	-0,0031	13_ReprPC	0,0133
NUP35	0,0601	0,0522	-0,0079	1_TssA	0,0254	CEBPA	0,0193	0,0161	-0,0031	1_TssA	0,0222
AGL	0,0505	0,0426	-0,0078	1_TssA	0,0203	PGM2	0,0261	0,0231	-0,0030	1_TssA	0,0412
SMAD7	0,0297	0,0219	-0,0078	1_TssA	0,0005	DSP	0,0206	0,0176	-0,0030	1_TssA	0,0268
HIST1H2AH	0,0461	0,0383	-0,0078	1_TssA	0,0081	DMRTA1	0,0198	0,0168	-0,0030	1_TssA	0,0408
ITSN1	0,0442	0,0364	-0,0077	1_TssA	0,0238	PDIA6	0,0225	0,0195	-0,0030	1_TssA	0,0348
ALKBH6	0,0466	0,0388	-0,0077	1_TssA	0,0178	COPB2	0,0275	0,0245	-0,0029	1_TssA	0,0418
APIAR	0,0365	0,0288	-0,0077	1_TssA	0,0033	CENPJ	0,0195	0,0167	-0,0029	1_TssA	0,0098
CCBL1	0,0391	0,0314	-0,0077	1_TssA	0,0375	SETD7	0,0299	0,0271	-0,0028	1_TssA	0,0338
CDK5RAP2	0,0353	0,0277	-0,0076	2_TssAFlnk	0,0299	ZBTB48	0,0210	0,0182	-0,0028	1_TssA	0,0392

ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado	ID Gen	Media del valor-β en haplogru po J	Media del valor-β en haplogru po H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	p-valor ajustado
CUL3	0,0657	0,0581	-0,0076	2_TssAFlnk	0,0439	POLR212	0,0215	0,0187	-0,0028	1_TssA	0,0492
ZNF643	0,0465	0,0389	-0,0076	1_TssA	0,0416	TBL3	0,0268	0,0240	-0,0028	1_TssA	0,0416
INTS4	0,0406	0,0331	-0,0075	1_TssA	0,0041	ARRDC2	0,0146	0,0119	-0,0027	1_TssA	0,0238
PAK4	0,0421	0,0346	-0,0075	1_TssA	0,0406	ADAMTS9	0,0308	0,0282	-0,0027	2_TssAFlnk	0,0439
CDC42EP4	0,0304	0,0230	-0,0075	1_TssA	0,0232	SLC2A13	0,0246	0,0219	-0,0027	1_TssA	0,0255
SMU1	0,0486	0,0411	-0,0074	1_TssA	0,0473	ABCC5	0,0261	0,0236	-0,0026	1_TssA	0,0443
U2AF1	0,0391	0,0317	-0,0074	2_TssAFlnk	0,0138	C2orf42	0,0259	0,0234	-0,0025	1_TssA	0,0312
CHPT1	0,0704	0,0630	-0,0074	2_TssAFlnk	0,0393	EPHB6	0,0247	0,0222	-0,0025	2_TssAFlnk	0,0447
TFG	0,0461	0,0387	-0,0074	1_TssA	0,0160	TRPA1	0,0316	0,0292	-0,0024	10_TssBiv	0,0411
KIF17	0,0231	0,0158	-0,0073	1_TssA	0,0096	ACSF2	0,0212	0,0190	-0,0022	1_TssA	0,0427
CDK2AP1	0,0241	0,0224	-0,0017	1_TssA	0,0497	B9D2	0,0422	0,0403	-0,0019	2_TssAFlnk	0,0315

p-valor ajustado calculado por el método de *Benjamini & Hochberg's*; Media del valor- β (intensidad de metilación); ID Gen: véase listado de abreviaturas; Región genómica: TSSA: sitio activo de inicio de la transcripción; TSSAFlnk: regiones flanqueantes a la Tss activas; TxFlnk: indica el estado del gen transcrito en el extremo 5' y 3' ; Tx: Transcripción fuerte; TxWk: Transcripción débil; EnhG: *enhancer* génico; Enh: *enhancer*; ZNF/RpIs: genes ZNF (codifica para las proteínas con dedos de zinc) y repeticiones; Het: heterocromatina; TssBiv: región TSS bivalente/equilibrado; BivFlnk: indica las regiones flanqueantes a TSS/Enh; EnhBiv: *enhancer* bivalente; ReprPC: referido a la repetición del grupo de proteínas *polycomb*; ReprPCWk: repetición débil de *polycomb*, Quies: región quiescente.

ANEXO III

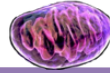
Tabla con las regiones DMs hipometiladas en el haplogrupo J en relación al H, ordenadas de forma decreciente por sus diferencias en el valor- β .

ID Gen	p-valor ajustado	Media del valor-β en haplogrupo J	Media del valor-β en haplogrupo H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	ID Gen	p-valor ajustado	Media del valor-β en haplogrupo J	Media del valor-β en haplogrupo H	Diferencia media (H-J)	Región genómica
HOXD3	0,0097	0,5985	0,7021	0,1036	13_ReprPC	MORN2	0,0406	0,0469	0,0617	0,0148	1_TssA
C18orf22	0,0122	0,4475	0,5400	0,0925	2_TssAFlnk	STK17B	0,0226	0,0270	0,0416	0,0146	1_TssA
RNASE8	0,0171	0,4711	0,5636	0,0925	7_Fnh	CPT1B	0,0165	0,0394	0,0531	0,0136	2_TssAFlnk
PXT1	0,0198	0,4805	0,5605	0,0800	15_Quies	LOC38842	0,0081	0,0378	0,0511	0,0133	13_ReprPC
TMEM85	0,0217	0,2631	0,3416	0,0785	2_TssAFlnk	MSX2	0,0128	0,0303	0,0423	0,0119	10_TssBiv
CUEDC1	0,0060	0,7561	0,8278	0,0717	5_TxWk	ZBED5	0,0492	0,0454	0,0572	0,0118	1_TssA
INSL6	0,0369	0,6709	0,7424	0,0715	14_ReprPCWk	GDNF	0,0476	0,0427	0,0544	0,0117	2_TssAFlnk
PARK2	0,0228	0,5629	0,6264	0,0634	14_ReprPCWk	KRCC1	0,0420	0,0475	0,0586	0,0111	1_TssA
TCP11	0,0003	0,7304	0,7868	0,0564	5_TxWk	CHID1	0,0048	0,0316	0,0422	0,0106	2_TssAFlnk
KCNN4	0,0387	0,6269	0,6820	0,0551	5_TxWk	GNB2L1	0,0138	0,0507	0,0606	0,0099	1_TssA
OTOA	0,0025	0,6315	0,6831	0,0516	14_ReprPCWk	BBS10	0,0404	0,0262	0,0359	0,0097	1_TssA
BTN3A2	0,0499	0,6376	0,6891	0,0515	2_TssAFlnk	DCST1	0,0346	0,9458	0,9553	0,0095	14_ReprPCWk
RGSL1	0,0467	0,7305	0,7811	0,0506	14_ReprPCWk	EIFA43	0,0204	0,0385	0,0479	0,0094	1_TssA
FHIT	0,0477	0,1371	0,1850	0,0479	1_TssA	SPOCK1	0,0270	0,0363	0,0454	0,0091	1_TssA

ID Gen	p-valor ajustado	Media del valor-β en haplogrupo J	Media del valor-β en haplogrupo H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	ID Gen	p-valor ajustado	Media del valor-β en haplogrupo J	Media del valor-β en haplogrupo H	Diferencia media (H-J)	Región genómica
OR51B4	0,0240	0,6232	0,6720	0,0487	15_Quies	GCOM1	0,0454	0,0354	0,0446	0,0092	1_TsSA
HMGCL	0,0025	0,8538	0,8964	0,0426	1_TsSA	NFKB1	0,0118	0,0508	0,0599	0,0091	1_TsSA
NLRP7	0,0414	0,7423	0,7847	0,0424	15_Quies	UBAP2	0,0420	0,0378	0,0456	0,0079	1_TsSA
GY1	0,0198	0,0267	0,0684	0,0417	1_TsSA	RPL18A	0,0407	0,0487	0,0566	0,0079	1_TsSA
GP2	0,0334	0,7766	0,8177	0,0411	15_Quies	FAT1	0,0182	0,0358	0,0431	0,0073	1_TsSA
RMND5B	0,0464	0,4719	0,5117	0,0398	2_TsSAFlnk	TNPO1	0,0001	0,0277	0,0349	0,0072	2_TsSAFlnk
C9orf64	0,0179	0,1000	0,1397	0,0397	2_TsSAFlnk	NMD3	0,0165	0,0325	0,0395	0,0070	1_TsSA
SLC3A1	0,0018	0,7690	0,8081	0,0390	5_TxWk	ATP5F1	0,0312	0,5749	0,5819	0,0069	2_TsSAFlnk
LRTOMT	0,0226	0,5642	0,6022	0,0379	2_TsSAFlnk	MIPEP	0,0413	0,0515	0,0584	0,0069	1_TsSA
ZNF45	0,0313	0,7877	0,8254	0,0377	4_Tx	KCNIP4	0,0305	0,0638	0,0701	0,0063	15_Quies
PRAMEF1	0,0153	0,7067	0,7428	0,0362	15_Quies	IHH	0,0361	0,0338	0,0400	0,0062	10_TsBiv
HIVEP3	0,0256	0,0785	0,1140	0,0356	2_TsSAFlnk	SEMA3C	0,0473	0,0350	0,0410	0,0059	1_TsSA
PLA2G2D	0,0285	0,8323	0,8675	0,0352	13_ReprPC	TRABD	0,0144	0,0312	0,0371	0,0059	1_TsSA
VAV1	0,0331	0,3100	0,3442	0,0342	14_ReprPCWk	PSD2	0,0058	0,0265	0,0323	0,0059	11_BivFlnk
C20orf186	0,0340	0,6882	0,7218	0,0336	14_ReprPCWk	IFT81	0,0415	0,0438	0,0494	0,0056	2_TsSAFlnk
ATAD2	0,0191	0,0473	0,0774	0,0301	1_TsSA	INPP1	0,0060	0,0308	0,0363	0,0055	2_TsSAFlnk

ID Gen	p-valor ajustado	Media del valor-β en haplogrupo J	Media del valor-β en haplogrupo H	Diferencia media (H-J)	Región genómica	ID Gen	p-valor ajustado	Media del valor-β en haplogrupo J	Media del valor-β en haplogrupo H	Diferencia media (H-J)	Región genómica
MACROD2	0,0387	0,0463	0,0796	0,0333	1_TssA	LGALS3	0,0437	0,0159	0,0215	0,0056	1_TssA
KRTAP19-6	0,0479	0,8513	0,8764	0,0252	15_Quies	CDKN2D	0,0355	0,0464	0,0518	0,0055	2_TssAFlnk
SMPDL3A	0,0110	0,1162	0,1401	0,0239	1_TssA	DFNB31	0,0183	0,0249	0,0303	0,0054	1_TssA
ZBTB8A	0,0387	0,1008	0,1241	0,0234	11_BivFlnk	RAB13	0,0321	0,0275	0,0327	0,0052	2_TssAFlnk
CCDC57	0,0220	0,0386	0,0617	0,0232	1_TssA	C16orf70	0,0163	0,0210	0,0262	0,0052	2_TssAFlnk
MMP8	0,0257	0,7834	0,8061	0,0227	14_ReprPCWk	E2F7	0,0433	0,0274	0,0326	0,0051	1_TssA
PBK	0,0397	0,0358	0,0576	0,0218	2_TssAFlnk	EMX1	0,0486	0,0283	0,0330	0,0047	13_ReprPC
AADAC	0,0236	0,8806	0,9018	0,0213	15_Quies	ADCY4	0,0482	0,0250	0,0294	0,0044	2_TssAFlnk
CHRNA1	0,0181	0,9062	0,9265	0,0204	15_Quies	NFX1	0,0179	0,0247	0,0289	0,0043	1_TssA
ARL11	0,0346	0,8705	0,8889	0,0184	15_Quies	GSK3A	0,0345	0,0193	0,0234	0,0041	1_TssA
C1orf183	0,0389	0,0775	0,0935	0,0159	2_TssAFlnk	ACE	0,0355	0,0199	0,0236	0,0036	1_TssA
AMY2B	0,0436	0,9089	0,9245	0,0156	4_Tx	DNAJA3	0,0355	0,0240	0,0276	0,0036	1_TssA
WT1	0,0411	0,0508	0,0659	0,0151	13_ReprPC	TECR	0,0100	0,0204	0,0235	0,0031	1_TssA

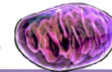
p-valor ajustado calculado por el método de *Benjamini & Hochberg's*; Media del valor-β (intensidad de metilación); ID Gen: véase listado de abreviaturas; Región genómica: TssA: sitio activo de inicio de la transcripción; TssAFlnk: regiones flanqueantes a la Tss activas; TxFlnk: indica el estado del gen transcrito en el extremo 5' y 3'; Tx: Transcripción fuerte; TxWk: Transcripción débil; EnhG: *enhancer* génico; Enh: *enhancer*; ZNF/Rpts: genes ZNF (codifica para las proteínas con dedos de zinc) y repeticiones; Het: heterocromatina; TssBiv: región TSS bivalente/equilibrado; BivFlnk: indica las regiones flanqueantes a TSS/Enh; EnhBiv: *enhancer* bivalente; ReprPC: referido a la represión del grupo de proteínas *polycomb*; ReprPCWk: represión débil de *polycomb*, Quies: región quiescente.



ANEXO IV

Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients

Juan Fernández-Tajes, Ángel Soto-Hermida, María E Vázquez-Mosquera,
Estefanía Cortés-Pereira, Alejandro Mosquera, Mercedes Fernández-Moreno,
Natividad Oreiro, Carlos Fernández-López, José Luis Fernández,
Ignacio Rego-Pérez, Francisco J Blanco



EXTENDED REPORT

Genome-wide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients

Juan Fernández-Tajes,¹ Angel Soto-Hermida,¹ María E Vázquez-Mosquera,¹ Estefania Cortés-Pereira,¹ Alejandro Mosquera,² Mercedes Fernández-Moreno,¹ Natividad Oreiro,¹ Carlos Fernández-López,¹ Jose Luis Fernández,² Ignacio Rego-Pérez,¹ Francisco J Blanco^{1,3,4}

Handling editor Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202783>).

¹Rheumatology Division, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Coruña, Spain

²Genetics Unit, INIBIC-Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Coruña, Spain

³Proteo-Red/ISCIII, Madrid, Spain

⁴CIBER-BBN-ISCIII, Madrid, Spain

Correspondence to

Dr Francisco J Blanco and Dr Ignacio Rego-Pérez
Rheumatology Division,
Hospital Universitario A
Coruña, Coruña 15006-A,
Spain;
fblagar@sergas.es

Accepted 16 February 2013

To cite: Fernández-Tajes J, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, et al. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2012-202783

ABSTRACT

Objective Alterations in DNA methylation patterns have been found to correlate with several diseases including osteoarthritis (OA). The aim of this study was to identify, for the first time, the genome-wide DNA methylation profiles of human articular chondrocytes from OA cartilage and healthy control cartilage samples.

Methods DNA methylation profiling was performed using Illumina Infinium HumanMethylation27 in 25 patients with OA and 20 healthy controls. Subsequent validation was performed by genome-wide expression analysis using the Affymetrix Human Gene 1.1 ST array in an independent cohort of 24 patients with OA.

Finally, the most consistent genes in both assays were amplified by quantitative reverse transcriptase PCR in a validation cohort of 48 patients using microfluidic real-time quantitative PCR. Appropriate bioinformatics analyses were carried out using R bioconductor software packages and qBase plus software from Biogazelle.

Results We found 91 differentially methylated (DM) probes, which permitted us to separate patients with OA from healthy controls. Among the patients with OA, we detected 1357 DM probes that identified a tight cluster of seven patients who were different from the rest. This cluster was also identified by genome-wide expression in which 450 genes were differentially expressed. Further validation of the most consistent genes in an independent cohort of patients with OA permitted us to identify this cluster, which was characterised by increased inflammatory processes.

Conclusions We were able to identify a tight subgroup of patients with OA, characterised by an increased inflammatory response that could be regulated by epigenetics. The identification and isolation of this subgroup may be critical for the development of effective treatment and disease prevention.

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is a chronic musculoskeletal disease related to aging that is characterised by the progressive destruction of the extracellular matrix of articular cartilage, as well as bone remodelling and synovial inflammation, which leads to pain and severe impairment of mobility. It is the main cause of work incapacity and one of the most common reasons for visiting a primary care physician; its prevalence reaches 40% of people over the age

of 70,¹ and there is no basic treatment. Age, obesity, body mass index, behavioural influences and both nuclear and mitochondrial genetics are all risk factors²⁻⁴; however, in the last few years, the role played by epigenetics in the pathogenesis of the disease has been investigated in more detail.⁵⁻⁸

Epigenetics is defined as heritable changes in genome function without changes in the DNA sequence. While the genetic code is the same for every somatic cell, epigenetic changes are usually confined to specific cells or tissues, or even to specific cells within a tissue. Epigenetics mechanisms must be considered in order to understand the gene-environment interactions that lead to complex diseases,⁹ and OA is no exception. DNA methylation is the best characterised epigenetic mechanism, and its major goal is gene silencing.¹⁰ It consists of the addition of a methyl group (CH₃) to cytosine that is 5' to guanine to form methylated cytosine (M^cC). These sites are usually located in promoter regions and are called CpG sites.

DNA methylation is an essential mechanism for (i) imprinting of specific genes, (ii) X chromosome inactivation in women, and (iii), important in the present context, cell-type-specific gene expression. In this regard, since it has been suggested that osteoarthritic chondrocytes possess a modulated phenotype^{11 12} by which several genes are up- or down-regulated compared with normal chondrocytes,¹³ and the regulatory mechanisms responsible for these alterations have not yet been clarified, it has been suggested that epigenetic changes in the methylation status of the promoter region of the genomic DNA contribute to the pathology of OA.^{5 12}

To date, epigenetic gene regulation has been widely studied in cancer,¹⁴⁻¹⁶ but very few studies on OA have been performed. One of the first investigations of OA showed that overexpression of cartilage-degrading enzymes by late-stage OA chondrocytes, mainly matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), MMP-9, MMP-13 and ADAMTS-4, may have resulted from epigenetic changes in the methylation status of CpG sites in the promoter regions of these enzymes^{12 17}; in addition, epigenetic changes in the promoter region of the leptin gene result in modulated expression of MMP-13.¹³ It has also been postulated that a DNA

Clinical and epidemiological research

demethylation process takes place at specific CpG sites in the interleukin-1 β promoter in response to inflammatory cytokines in human chondrocytes,¹⁸ and even the DNA methylation pattern in the promoter region of this gene is also altered after treatment with glucosamine and a nuclear factor-kappa β inhibitor.¹⁹ It has furthermore been demonstrated that the genetic effect of the rs143383 single-nucleotide polymorphism on expression of growth differentiation factor 5 (GDF5) in OA disease is regulated epigenetically by DNA methylation.²⁰ Other genes related to the oxidative stress process, such as manganese superoxide dismutase, which is repressed in OA chondrocytes,²¹ has been shown to be regulated by epigenetics.²² In contrast, a total DNA methylation assay performed by Sesselmann and colleagues²³ showed no differences between healthy control and OA cartilage by chromatographic approaches. Another recent study, consisting of a genome-wide methylation approach, revealed differentially methylated (DM) regions in osteoporotic and OA bones.²⁴

Taking all this into account, we examined for the first time the genome-wide DNA methylation profile of human articular chondrocytes from OA and healthy control cartilage samples to identify profiles of DNA methylation in OA disease. By examining the gene pathways involved, as well as the genomic context of the loci with OA-associated methylation, we provide insight into potentially altered biological processes related to these profiles.

MATERIALS AND METHODS

The scheme we followed to carry out the present work is described in online supplementary figure S1.

Samples

Three groups of samples from Hospital Universitario A Coruña were analysed (see online supplementary table S1). All patients included in this study had knee OA K/L grade IV and underwent knee prosthesis surgery; normal human cartilages were obtained at autopsy from cadavers with no macroscopic signs of OA. All cartilage samples were collected from the central area of the tibial plateau of the knee and represent a mixture of superficial, intermediate and deep layers of articular cartilage. Informed consent was obtained from all participants, and the study was approved by the clinical ethics committee of Galicia (see online supplementary materials and methods).

Nucleic acid (DNA and RNA) isolation and reverse transcription

DNA was isolated following a home-made Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) and chloroform-based method after breaking up the cartilage. For RNA isolation, cartilage samples were disrupted using a mortar, after freezing in liquid nitrogen before using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany). After isolation, the RNA was reverse transcribed to cDNA (see online supplementary materials and methods).

DNA methylation profiling

DNA methylation profiling was performed using the Infinium HumanMethylation27 beadchip (Illumina, San Diego, California, USA), which allows interrogation of 27 578 highly informative CpG sites located within the proximal promoter regions of 14 495 genes and 110 microRNAs (see online supplementary materials and methods). The methylation data have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the GEO accession number GSE43269.

Data filtering, normalisation and analysis of methylation data

As a result of data filtering, four samples (two patients with OA and two healthy controls) showed a detection p value >0.05 in more than 25% of all probes; consequently, these samples were removed from further analyses, resulting in 23 patients with OA and 18 healthy controls. After normalisation, M-values followed a bimodal distribution (see online supplementary figure S2). The statistical procedures used to analyse the DM sites are described in online supplementary materials and methods.

Unsupervised clustering of methylation data

A resampling-based unsupervised consensus clustering of the DNA methylation dataset, using the 23 837 selected probes that followed the initially established criteria, was performed to distinguish different groups²⁵ (see online supplementary materials and methods).

Gene expression profiling and data analysis from gene expression

The platform used for this purpose was the Affymetrix Human Gene 1.1 ST array plate (Affymetrix, Santa Clara, California, USA). A principal component analysis (PCA) using the 7742 probes selected after initial non-specific filtering was carried out in order to visualise possible clusters within samples. The normalisation processes as well as the procedure to analyse the differentially expressed probes are described in online supplementary materials and methods. The expression data have been deposited in the NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the GEO accession number GSE43191.

Gene ontology analyses

Functional characteristics consisted of an over-representation analysis of the gene ontology (GO) categories which appeared enriched in the selected lists of the DM/expressed genes examined using the DAVID (Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery) bioinformatics database functional tool.²⁶

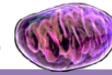
Validation of genes

The expression levels of those genes in which an inverse relationship between methylation and expression was detected were subsequently analysed in an independent cohort of 48 patients with OA using microfluidic real-time quantitative PCR. The data analyses were carried out with qBase plus software (Biogazelle, Ghent University, Belgium) and R Bioconductor software, and included qualitative, quantitative and hierarchical approaches to validate and identify clusters of patients. The genes hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1 (HPRT1) and ribosomal protein L13A (RPL13A) were used as constitutive genes. Four of the 48 samples (RNAs) did not meet the quality criteria and were therefore removed from further analyses.

RESULTS

DNA methylation pattern in patients with OA and healthy controls

A total of 91 DM probes in patients with OA and healthy controls were detected (table 1), permitting us to distinguish the two groups of samples (see online supplementary figure S3a). Of these, 37 were less methylated in OA samples and 54 were more methylated in OA samples compared with healthy controls. The runt-related transcription factor-1 (RUNX1) gene was the least methylated gene and the msh homeobox-1 (MSX1)

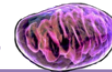


Clinical and epidemiological research

Table 1 Differentially methylated probes in osteoarthritic cartilage samples and healthy cartilage samples sorted by decreased mean difference in β values on each of the main categories

Increased methylation in OA				Decreased methylation in OA					
Gene symbol	B	Adjusted p value	Mean β value in healthy cartilage	Mean β value in OA cartilage	Mean difference (healthy-OA)	Adjusted p value	Mean β value in healthy cartilage	Mean β value in OA cartilage	Mean difference (healthy-OA)
Regulation of phosphorylation and protein Kinase cascade									
CDKN2B	4.3094	0.0110	0.2979	0.4773	-0.1793	0.0663	0.6556	0.5450	0.1205
SOCS1	4.8987	0.0099	0.1082	0.2489	-0.1407	3.0698	0.0155	0.5701	0.0986
CDKN2B	1.8826	0.0275	0.3545	0.4902	-0.1357	1.1575	0.0351	0.7078	0.0836
PTPN6	1.0225	0.0351	0.0821	0.2027	-0.1205	3.7792	0.0140	0.6690	0.0835
CDKN2B	1.2742	0.0333	0.3807	0.4942	-0.1135	2.8136	0.0180	0.5217	0.0706
GRB10	1.5904	0.0304	0.3708	0.4759	-0.1051	1.2667	0.0333	0.2807	0.0670
HCRT	1.0565	0.0351	0.3741	0.4616	-0.0875	1.6784	0.0300	0.8027	0.0648
TRH	1.3573	0.0323	0.6049	0.6829	-0.0780	3.4044	0.0142	0.8648	0.0601
INSR	1.6358	0.0300	0.0615	0.1244	-0.0628	2.4676	0.0202	0.8766	0.0456
CDK20	2.6537	0.0199	0.0606	0.1081	-0.0475	1.9630	0.0275	0.0739	0.0240
GRIA2	3.3251	0.0146	0.0920	0.1328	-0.0409	5.5466	0.0064	0.4489	0.2794
HIST1H4H	1.3440	0.0323	0.1224	0.1619	-0.0395	3.1543	0.0155	0.6779	0.0839
FGD4	1.8371	0.0283	0.1093	0.1475	-0.0382	1.3821	0.0323	0.7295	0.0782
MTTH	1.0460	0.0351	0.0532	0.0806	-0.0274	1.2295	0.0341	0.7221	0.0369
NAGS	3.4612	0.0142	0.0551	0.0817	-0.0266	1.4984	0.0318	0.0914	0.0205
MAPK8IP1	1.1392	0.0351	0.0888	0.0519	-0.0131				
Morphogenesis/Development									
MSX1	1.4404	0.0318	0.2801	0.5006	-0.2205	3.5448	0.0142	0.8274	0.1529
SALL4	2.5070	0.0202	0.1734	0.3424	-0.1690	3.4699	0.0142	0.8678	0.0925
TBX4	4.4522	0.0110	0.0578	0.1985	-0.1408				
MSX1	1.1438	0.0351	0.2810	0.4130	-0.1320	1.4726	0.0318	0.7967	0.1470
MSX1	2.0345	0.0269	0.2453	0.3712	-0.1259	2.1543	0.0242	0.5992	0.1127
TBX4	6.1014	0.0064	0.0723	0.1875	-0.1151	1.9186	0.0275	0.4805	0.1051
KRT5	2.7673	0.0182	0.6131	0.7049	-0.0918	3.8221	0.0140	0.4613	0.0967
SPINT1	1.6514	0.0300	0.1835	0.2379	-0.0544	1.5031	0.0318	0.7905	0.0955
Negative regulation of transcription									
RORC	1.0271	0.0351	0.0829	0.2016	-0.1187	2.4192	0.0202	0.2619	0.0919
HDAC11	1.0106	0.0351	0.4613	0.5403	-0.0891	2.2445	0.0225	0.8362	0.0533
ESRP2	1.0565	0.0351	0.0653	0.1182	-0.0529	1.3184	0.0323	0.8895	0.0512
ZNF574	1.5394	0.0316	0.0697	0.0956	-0.0260	2.5339	0.0202	0.0680	0.0179
FERD3L	1.7409	0.0297	0.0238	0.0345	-0.0107				
Ion homeostasis									
SUSD1	1.8844	0.0275	0.1292	0.2238	-0.0946	1.3281	0.0323	0.3957	0.0876
PKO2L1	2.9414	0.0163	0.1742	0.2603	-0.0861	1.1472	0.0351	0.9272	0.0202
KCNK17	5.6817	0.0064	0.0657	0.1240	-0.0683	2.3287	0.0210	0.0344	0.0071
CCRB9	1.1190	0.0351	0.8027	0.8656	-0.0630	3.0694	0.0155	0.8296	0.1747
Cell junction/communication/motility/transport									
IGF2AS	3.7873	0.0140	0.1629	0.3093	-0.1464	1.8032	0.0287	0.8347	0.1173
TNSI	3.0290	0.0155	0.3916	0.5053	-0.1137	4.4099	0.0110	0.2978	0.1148
						1.1066	0.0351	0.7190	0.0823

Continued



Clinical and epidemiological research

gene was the most methylated gene in patients with OA compared with healthy controls.

The biological process associated with the less methylated genes in patients with OA were those related to the inflammatory/defence response ($p=0.019$), as well as those related to the positive regulation of transcription activity ($p=0.011$); on the other hand, the altered processes related to genes with increased methylation levels in patients with OA were those involved in the regulation of phosphorylation ($p=0.006$) and mitogen-activated protein kinase activity ($p=0.004$).

The unsupervised clustering resulting from the 23 837 selected probes showed three different clusters of samples (see online supplementary figure S3b): cluster 1 consisted of 14 patients with OA and six healthy controls, cluster 2 consisted of two patients with OA and 11 healthy controls, and cluster 3 was formed by seven patients with OA and one healthy control. This technique showed cluster 3 to be a particularly tight cluster of patients with a characteristic DNA methylation profile.

We again performed unsupervised clustering with the selected probes including only the 23 patients with OA. The results showed the same cluster of patients as cluster 3 above, which could be distinguished from the rest of the patients (see online supplementary figure S3c). We therefore based our subsequent analyses on cluster membership from the above clustering method that identified a different subgroup of OA.

Identification and characterisation of OA subgroups

When we compared the DM probes of patients in cluster 3 with the rest of the patients, we identified a total of 1357 significant probes (see online supplementary table S2) that separated the two subgroups of patients (figure 1A). Of these, 306 were less methylated in samples from cluster 3, and 1051 appeared more methylated in this group of samples. Of the less methylated genes in cluster 3, RUNX1, RUNX2 and genes related to

inflammatory response were notable, whereas some genes related to the synthesis of collagens, such as collagen XV α -1 (COL15A1), collagen XVI α -1 (COL16A1), collagen III α -1 (COL3A1), collagen IX α -1 (COL9A1), collagen VI α -3 (COL6A3), procollagen C-endopeptidase enhancer (PCOLCE), collagen XVIII α -3 (COL18A1), collagen XI α -1 (COL11A1) and collagen XXI α -1 (COL21A1), and other cartilage and extracellular matrix-related genes, such as cartilage intermediate layer protein, GDF5, extracellular matrix-2 (ECM2) and chondroitin sulfate proteoglycan-4 (CSPG4), showed significantly increased methylation in this subgroup of patients.

Most of the methylated genes in patients in cluster 3 corresponded to the extracellular region ($p<0.0001$), including the extracellular matrix ($p<0.0001$); the altered molecular functions were those related to extracellular matrix structural constituent ($p=0.05$), polysaccharide binding ($p=0.008$), glycosaminoglycan binding ($p=0.009$) and heparin binding ($p=0.011$) (figure 1B). With regard to the less methylated genes (figure 1C), the altered molecular functions were those related to chemokine activity ($p=0.005$) and cytokine activity ($p=0.018$), and the biological processes were those related to the regulation of cytokine production ($p=0.002$), regulation of inflammatory response ($p=0.014$), leucocyte activation ($p<0.0001$), inflammatory response ($p<0.0001$) and defence response ($p<0.0001$).

Identification of the subgroups of OA by genome-wide expression analysis

To identify the subgroup of patients with OA revealed by the genome-wide DNA methylation approach, we performed a genome-wide expression assay in an independent cohort of 24 OA samples. In the first step, we analysed the microarray data obtained (23 OA samples and 7742 probes retained after array normalisation and non-specific filtering) using PCA as the

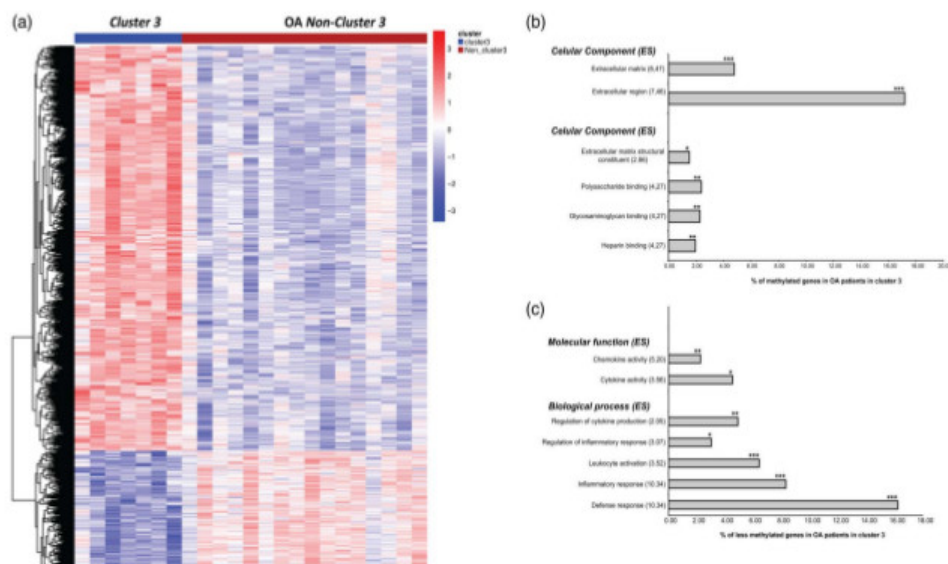


Figure 1 Hierarchical analysis and potentially altered biological process gene ontology (GO) of the differentially methylated probes in patients with osteoarthritis (OA) in cluster 3 and non-cluster 3 patients. (A) Heatmap showing the 1357 differentially methylated probes in patients with OA in cluster 3 and non-cluster 3 patients; (B) GO analysis comparing the methylated genes in patients with OA in cluster 3 and non-cluster 3 patients; (C) GO analysis comparing the less methylated genes in patients with OA in cluster 3 and non-cluster 3 patients. ES, enrichment score. *** $p<0.0001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ with false discovery rate correction for multiple testing.

Clinical and epidemiological research

unsupervised clustering method. This approach separated the OA population into two subgroups: a highly homogeneous group (named cluster A) and a heterogeneous group of six patients (named cluster B) (figure 2).

Analysis of differentially expressed genes in the two subgroups of patients with OA

We created two groups of OA samples according to the clusters identified by the PCA method. When patients were grouped according to this distribution (cluster A versus cluster B), a total of 450 probes were found to be differentially expressed between the two groups (see online supplementary table S3). Of these, 262 were upregulated in patients in cluster B, and 188 were downregulated in this cluster. Heatmap representation showed the differentiation between the two groups of patients (figure 3A).

Most of the upregulated genes in patients in cluster B belonged to the plasma membrane ($p < 0.0001$), and the biological processes related to the less methylated genes in the patients in cluster 3, such as defence response ($p < 0.0001$), inflammatory response ($p < 0.0001$), leucocyte activation ($p < 0.0001$), regulation of cytokine production ($p = 0.0045$) and chemokine activity ($p = 0.0028$), were significantly over-represented in this group of patients also. In addition, increased representation of superoxide anion generation ($p = 0.0206$) and increased synthesis of unsaturated fatty acids ($p = 0.0349$) were detected (figure 3B).

Comparative analysis and validation of the results by quantitative reverse transcriptase (qRT)-PCR

The expression pattern detected in patients in cluster B seems to indicate that this group of patients is closely related to those identified according to the methylation pattern in patients in cluster 3, showing this subgroup of patients to be a tight group characterised by an increased inflammatory response which could be modulated epigenetically leading to reduced synthesis of extracellular matrix constituents (figures 1 and 3).

With regard to the above, we identified 47 significantly altered genes that showed an inverse relationship between the

two approaches (table 2). Of these, 15 were methylated in patients in cluster 3 and also downregulated in patients in cluster B; meanwhile, 32 were less methylated in patients in cluster 3 and also upregulated in patients in cluster B, representing 10.4% (47/450) correlated genes.

We selected for validation, in an independent cohort of 48 patients, a total of eight (less methylated and upregulated) genes concentrating on their increased B-statistic value in both assays: lysosomal protein transmembrane-5 (LAPTM5), T-cell specific surface glycoprotein CD28 (CD28), Fc fragment of IgG low affinity IIb receptor CD32 (FCGR2B), integrin alpha M (ITGAM), pleckstrin (PLEK), lymphocyte cytosolic protein 2 (LCP2), guanine nucleotide-binding protein (G protein) $\alpha 15$ (GNA15) and kynureninase (KYNU). We also included lymphocyte antigen 96 (LY96) for analysis because of its high expression and low methylation levels in some patients in cluster B and cluster 3, respectively.

As expected, not all the samples amplified all the selected genes, with only six of the 44 samples showing amplification for all genes (see online supplementary table S4). On the basis of the expression of these genes in the 44 samples, the hierarchical clustering performed revealed the existence of a cluster of 15 patients, who were different from the remaining 29 (figure 4A), as observed in both methylation (cluster 3) and expression (cluster B) assays. The six samples that amplified the nine selected genes were also included in this cluster. A comparison of the expression levels of the selected genes in these 15 patients and the remaining 29 showed significant differences between the two subgroups, with most of the genes being upregulated in the first subgroup (figure 4B). The most significant differences in gene expression between the two groups corresponded to LAPTM5, ITGAM and PLEK genes, but LY96 and KYNU also showed significantly increased expression.

DISCUSSION

We analysed, for the first time in articular cartilage, the genome-wide DNA methylation profiles of a cohort of 25 patients with OA and 20 healthy controls. Furthermore, because of the subgroup of patients detected by this assay, we tried to identify this cluster of patients by a genome-wide expression approach in a population of 24 patients with OA. Finally, we validated the most consistent common genes resulting from the above assays by qRT-PCR in an independent cohort of 48 patients with OA.

The comparison of the methylation patterns of patients with OA and healthy controls showed 91 DM probes, with RUNX1 being the most DM and least methylated gene in OA. The RUNX1 gene is a critical transcription factor during embryogenesis which is thought to be involved in the development of normal haematopoiesis, neoplastic disease²⁷ and chondrogenesis²⁸ and has also been related to cell death,²⁹ which is also a characteristic of OA.^{28 30-32} Contradictory results with regard to the expression of this gene in OA have been described.^{33 34} In contrast, MSX1 was the most methylated gene in OA; this gene is a member of the MSX family, is associated with bone formation, and has been found to be increased in patients with OA compared with healthy controls in a genome-wide expression study.³³ As none of these genes have previously been shown to be epigenetically modulated in OA, they can be considered to be novel DM loci in this pathology.

In summary, the biological processes associated with the whole set of 91 DM probes in patients with OA and healthy controls are mainly related to the inflammatory/defence response (demethylated), indicating not only that inflammation is a key process in OA,³⁵ but also that it may be regulated by epigenetics.

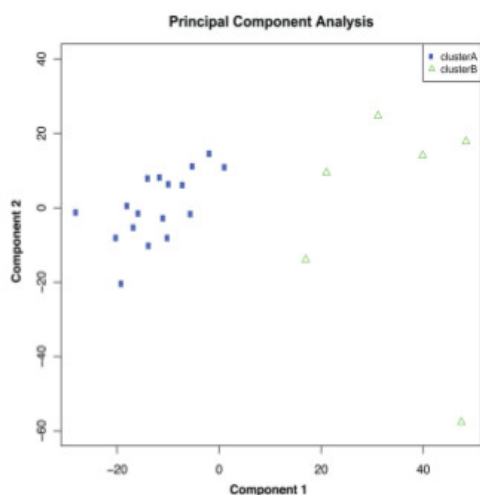
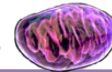
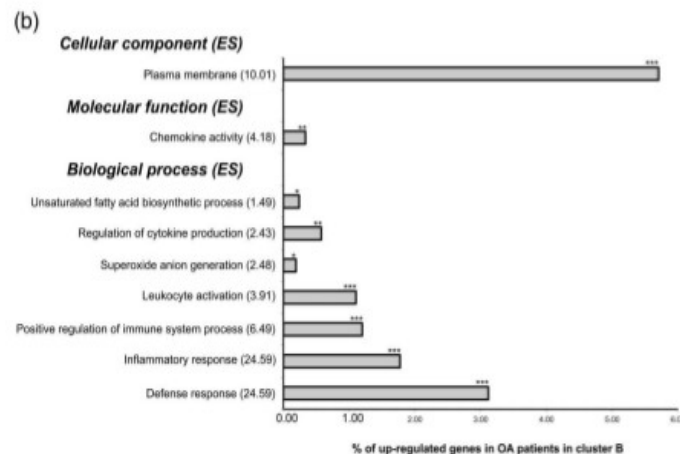
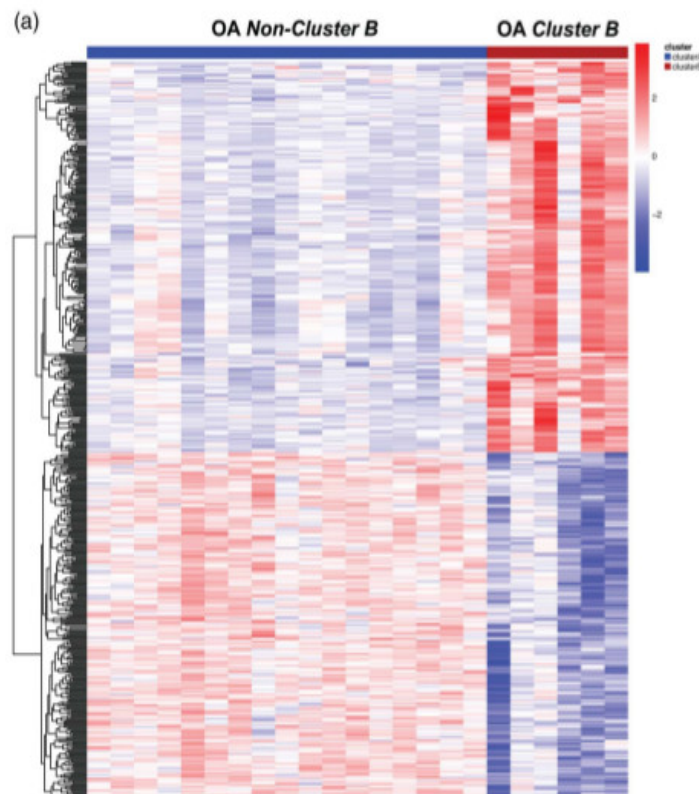


Figure 2 Principal component analysis (PCA) of osteoarthritis (OA) samples using the 7742 probes selected from expression data after initial non-specific filtering. The PCA clearly shows the distribution of the two OA subgroups (cluster A and cluster B).



Clinical and epidemiological research

Figure 3 Hierarchical analysis and potentially altered biological process gene ontology (GO) of the differentially expressed probes in patients with osteoarthritis (OA) in cluster B and non-cluster B patients. (A) Heatmap showing the 450 differentially expressed probes in patients in cluster B and non-cluster B patients; (B) GO analysis comparing the upregulated genes in patients in cluster B with non-cluster B patients. ES, enrichment score. *** $p \leq 0.0001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ with false discovery rate correction for multiple testing.



An important finding of this work is the existence of two OA subgroups (clusters) as a result of the unsupervised clustering carried out in the whole samples. This approach is usually used in methylation/expression studies when it is suspected that different subsets of clinical samples might occur.³⁶⁻³⁸ On this basis, samples belonging to cluster 3 are characterised by decreased synthesis of extracellular matrix constituents and increased inflammatory response. Interestingly, in addition to a wide range of types of collagens and extracellular matrix-related genes, in this group of patients we found a greater degree of methylation in the GDF5 gene, as described previously,²⁰ as well as a marked decrease in methylation of the RUNX2 gene.

The RUNX2 gene is a transcription factor involved in osteoblastic differentiation and skeletal morphogenesis, and increased expression has been found in OA cartilage.^{35 39}

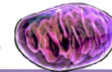
Previous studies have shown epigenetic (demethylation) regulation of some of the cartilage-degrading enzymes, such as MMP-3, MMP-9, MMP-13 and ADAMTS-4.^{12 17} However, in the present work we did not find any significant difference between patients with OA and healthy controls, and only a small increase in methylation was detected for both MMP-3 and ADAMTS-14 in patients in cluster 3 compared with non-cluster 3 patients. In order to explain this, it should be stated that: (i) the overall methylation levels of a particular gene may be important

Clinical and epidemiological research

Table 2 List of the 47 significantly altered genes that showed an inverse relationship between methylation and expression in both methylation and expression cohorts

Increased methylation in OA cluster 3 and downregulated in OA cluster B				Decreased methylation in OA cluster 3 and upregulated in OA cluster B			
Gene symbol	Mean β value difference (cluster 3–non-cluster 3)	Adjusted p value for methylation	Log Fc (cluster B vs non-cluster B)	Adjusted p value for expression	Mean β value difference (cluster 3–non-cluster 3)	Adjusted p value for methylation	Log Fc (cluster B vs non-cluster B)
Inflammatory/immune/defense response							
CCL28	0.1447	9.88×10^{-6}	-0.6227	0.00130	-0.2863	6.97×10^{-6}	0.7635
IL16	0.1474	7.32×10^{-7}	-0.7627	0.00111	-0.1698	1.69×10^{-5}	1.9550
Cellular adhesion and migration							
DOR2	0.0980	6.48×10^{-5}	-0.8865	0.00188	-0.1612	3.82×10^{-5}	1.5853
DCC	0.0122	0.00147	-1.9390	0.00145	-0.1489	5.68×10^{-5}	2.6111
Cell surface receptor-linked signal transduction							
GPR75	0.2761	0.00045	-0.8995	0.00049	-0.1431	0.00012	1.3398
Carboxylic acid catabolic process							
AMT	0.1696	6.19×10^{-6}	-0.7351	0.00021	-0.1218	0.00021	1.3058
DDAH1	0.0652	6.28×10^{-6}	-0.7000	0.00142	-0.1054	0.00034	2.4059
Other categories							
SLC44A2	0.2959	0.00016	-0.6322	0.00149	-0.0966	0.00206	2.4697
PLSCR4	0.1241	7.09×10^{-5}	-0.7997	0.00012	-0.0810	0.00169	3.4118
CHRM1	0.1206	6.70×10^{-6}	-0.7080	0.00113	-0.0784	0.00105	1.2456
CYGB	0.0803	0.00043	-0.8646	0.00040	-0.0764	0.00012	1.8094
RHOJ	0.0439	0.00017	-0.8414	0.00142	-0.0758	0.00053	1.0675
ABCAS	0.0375	0.00012	-1.0671	0.00122	-0.2917	4.07×10^{-5}	2.147
PLAZR1	0.0195	0.00097	-0.8952	3.48×10^{-5}	-0.1268	0.00143	2.687
ZNF134	0.0188	0.00203	-0.7573	0.00027	-0.1212	8.65×10^{-6}	1.185
Cell surface receptor-linked signal transduction							
GNAT5					-0.1200	0.00021	2.332
MARCO					-0.1124	0.00026	0.618
Other categories							
LAPTM5					-0.1087	0.00087	1.756
CY1P					-0.1086	2.55×10^{-5}	2.257
KONMB1					-0.0959	0.00097	2.246
MSR1					-0.0834	0.00046	1.549
CTS2					-0.2186	8.91×10^{-5}	1.977
NCKAP1L					-0.1419	0.00117	2.430
Adjusted p values calculated by Benjamini & Hochberg's method for false discovery rate control. Log Fc, log fold change.							

Adjusted p values calculated by Benjamini & Hochberg's method for false discovery rate control. Log Fc, log fold change. AMT, aminomethyltransferase; ABCAS, ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 5; DD4H1, dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1; DOR2, discoidin domain receptor tyrosine kinase 2; CCL28, chemokine C-C motif ligand 28; CD86, CD86 molecule; CD84, CD84 molecule; CD28, CD28 molecule; CD33, CD33 molecule; CR1M1, cytosine-rich transmembrane B1P regulator 1; CTSS, cathepsin Z; CYGB, cytoglobin; CY1P, cytohesin 1 interacting protein; DCC, deleted in colorectal carcinoma; FGFR1A, Fc fragment of IgG high-affinity α 1b receptor CD64; FcGR2B, Fc fragment of IgG low-affinity α 1b receptor CD32; FERMT3, ferritin family member 3; GNAT5, guanine nucleotide-binding protein (G protein) $\alpha 5$; GPR75, G protein-coupled receptor 75; HLA-DPB1, major histocompatibility complex, class II, DP $\beta 1$; IL16, interleukin 16; GSS6, immunoglobulin superfamily member 6; ITGAX, integrin αX ; ITGAM, integrin αM ; KONMB1, potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, β member 1; KYNLU, kynureninase; LAPTM5, lysosomal protein transmembrane 5; LCP2, lymphocyte cytosolic protein 2; LLR85, leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily 8 (with TM and ITM domains), member 5; LCP1, lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin); LST1, leukocyte-specific transcript 1; MARCO, macrophage receptor with collagenous structure; MSR1, macrophage scavenger receptor 1; MA2, myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse); NCF2, neutrophil cytosolic factor 2; NCF4, neutrophil cytosolic factor 4; NCKAP1L, NCK-associated protein 1-like; OA, osteoarthritis; PECAM1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; PLA2R1, phospholipase A2, receptor 1; PLEK, pleckstrin; PLSCR4, phospholipid scramblase 4; RHOJ, ras homologue family member 4; SLC44A2, solute carrier family 44, member 2; SLC6E10, sialic acid binding Ig-like lectin 10; SELPLG, selectin P ligand; TREM1, triggered receptor expressed on myeloid cells 1; ZNF134, zinc finger protein 134.



Clinical and epidemiological research

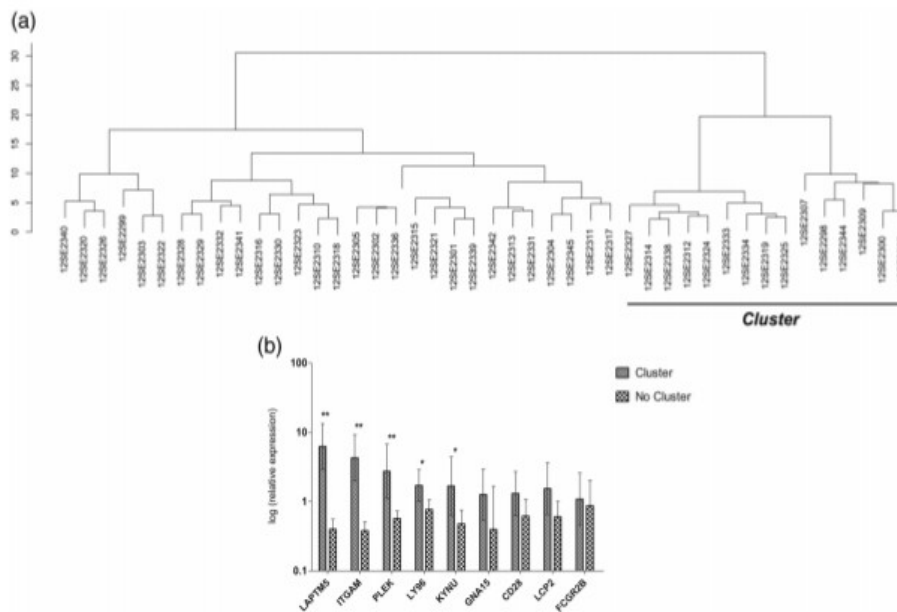


Figure 4 Hierarchical clustering and mean expression levels in the validation cohort of osteoarthritis (OA) samples. (A) Cluster of patients obtained by concentrating on the expression levels of the nine selected genes. (B) Mean expression levels of the nine selected genes in both clusters. Vertical bars indicate 95% CI. ** $p \leq 0.0001$, * $p \leq 0.05$ after Mann–Whitney non-parametric test.

in regulating this gene rather than the methylation status of specific CpG dinucleotides,²⁰ whereby it is possible that the CpG loci analysed by the above authors are not included in the Infinium HumanMethylation27 beadchip; (ii) these cartilage-degrading enzymes are mainly (modestly) expressed by chondrocytes in the superficial zones of the OA cartilage,^{40–41} and, as we extracted the DNA from the whole (normal and OA) cartilage, this discrepancy would not be unexpected; (iii) the data related to mRNA expression for MMP-3 found in the literature are very contradictory¹²; and (iv) despite global DNA methylation levels decreasing with age,^{42–44} a reduction in DNA methylation is technically more difficult to detect.¹⁶

To identify this tight cluster of patients and validate the results of the methylation assay, we performed a genome-wide expression analysis in an independent cohort of patients, which also revealed the existence of a tight cluster of patients (cluster B). Moreover, a large coincidence was detected between the most significant biological processes related to the less methylated genes in the patients in cluster 3 and the most significant biological processes related to the upregulated genes in cluster B. Therefore, an increased number of genes related to cytokine production and inflammatory/defence response were significantly altered in this subgroup of patients. With regard to this, this subgroup of patients was also characterised by an increased inflammatory response. As the group of patients that comprise cluster B are characterised by increased body mass index (personal data), this may be related to systemic factors induced by obesity (eg, adipokines, increased synthesis of fatty acids) and/or the increased oxidative stress detected in this subgroup of patients (see figure 3B), as previously proposed.^{45–46}

Despite the use of three independent groups of samples for each of the approaches performed in this work, a marked and common finding is the identification of a tight subgroup of patients with all of the assays performed. We can therefore rule

out the possibility that this cluster is based on features other than the pathogenesis of the disease itself, such as age or gender. All the models were adjusted for age, and the mean age for the samples that comprise the different clusters is very similar; moreover, despite the higher frequency of women in all groups, no difference in gender distribution was detected between clusters (see online supplementary table S1).

In addition, an inverse relationship between methylation and expression was detected for 47 genes (10.4%), and the validation by qRT-PCR of some of the genes showing the most consistent relationship was able to identify this tight cluster of patients, indicating not only significant differences between the two groups, but also candidate genes that could be used as new therapeutic markers for OA such as PLEK, LAPTMS, ITGAM, Y96 and KYNU.

In summary, as OA can be considered the final common pathway of joint destruction for multiple different pathophysiological aetiologies which define the existence of different phenotypes of OA,⁴⁷ the identification and isolation of these phenotypes (or subgroups) may be critical for the development of effective treatment and disease prevention.⁴⁷ In this regard, this work shows not only that patients and healthy controls have different methylation patterns, but also the existence of a tight cluster of patients, corroborated by a genome-wide expression assay. Both approaches reveal a higher-than-usual inflammatory response significantly represented in this subgroup of patients; this condition may be caused by increased oxidative stress and fatty acid synthesis, leading to decreased synthesis of extracellular matrix constituents. By using some of the genes with a consistent correlation between methylation and expression, we were able to identify novel genes in a subgroup of patients that may emerge as new therapeutic candidate markers of OA disease. However, as methylation is a dynamic process prone to changes in the environment (disease) and as the

Clinical and epidemiological research

age-related loss of normal epigenetic patterns is a possible mechanism for the late onset of common human diseases (such as OA), further studies of, for example, dimethyltransferases need to be performed to ascertain if changes in DNA methylation patterns play a major role in OA pathogenesis or, on the contrary, these changes are a result of altered OA chondrocytes or even a combination of both scenarios.

Acknowledgements We would like to express our appreciation of Lourdes Sanjurjo and Maria Dolores Velaand of the Department of Orthopaedic Surgery of CHU A Coruna. This study was supported by grants from Fundacion Espanola de Reumatologia (programa GEN-SER) and from Fondo Investigacion Sanitaria (CIBERCB06/01/0040)-Spain, Fondo Investigacion Sanitaria-PI 08/2028, Ministerio Ciencia e Innovacion PLE2009-0144, with a contribution of funds from FEDER (European Community). IR-P was supported by Contrato de Apoyo a la Investigacion-Fondo Investigacion Sanitaria (CA10/01564). MEV-M was supported by a grant from Programa Rio Hortega (Fondo de Investigacion Sanitaria). Methylation assay services were provided by the Spanish 'Centro Nacional de Genotipado (CEGEN-ISCIII)' (<http://www.cegen.org>).

Contributors JF-T performed data filtering, normalisation and analysis of methylation data. He also participated in gene expression profiling and gene expression data analysis, as well as the gene ontology analyses. He helped to draft the manuscript and has given final approval of the version to be published. EC-P and MF-M were involved in nucleic acid (DNA and RNA) isolation and reverse transcription. JLF and AM carried out DNA methylation profiling. AS-H and MEV-M carried out gene validation. NO and CF-L collected the samples and checked clinical histories for the inclusion and exclusion criteria. Both collected and analysed the radiographic information of the samples. IR-P was involved in the conception and design of the study; he helped to draft the manuscript and has given final approval of the version to be published. He was also involved in the bioinformatics analysis of the results. FJB conceived the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval Clinical ethics committee of Galicia-Spain.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Dieppe PA, Lohmander LS. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 2005;365:965–73.
- Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998;41:1343–55.
- Valdes AM, Doherty S, Muir KR, et al. Genetic contribution to radiographic severity in osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1537–40.
- Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:161–9.
- Roach HI, Aigner T. DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:128–37.
- Barter MJ, Bui C, Young DA. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:339–49.
- Goldring MB, Marcu KB. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2012;18:109–18.
- Reynard LN, Loughlin J. Genetics and epigenetics of osteoarthritis. *Maturitas* 2012;71:200–4.
- Liu L, Li Y, Tollefsbol TO. Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Curr Issues Mol Biol* 2008;10:25–36.
- Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:490–5.
- Fosyth CB, Cole A, Murphy G, et al. Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60:1118–24.
- Roach HI, Yamada N, Cheung KS, et al. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum* 2005;52:3110–24.
- Iliopoulos D, Malizos KN, Tsezou A. Epigenetic regulation of leptin affects MMP-13 expression in osteoarthritic chondrocytes: possible molecular target for osteoarthritis therapeutic intervention. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1616–21.
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010;70:27–56.
- Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011;17:330–9.
- Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012;13:679–92.
- Cheung KS, Hashimoto K, Yamada N, et al. Expression of ADAMTS-4 by chondrocytes in the surface zone of human osteoarthritic cartilage is regulated by epigenetic DNA de-methylation. *Rheumatol Int* 2009;29:525–34.
- Hashimoto K, Oeffo RO, Gibson MB, et al. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2009;60:3303–13.
- Imagawa K, de Andrés MC, Hashimoto K, et al. The epigenetic effect of glucosamine and a nuclear factor-kappa B (NF-kB) inhibitor on primary human chondrocytes—implications for osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405:362–7.
- Reynard LN, Bui C, Carty-Laird EG, et al. Expression of the osteoarthritis-associated gene GDF5 is modulated epigenetically by DNA methylation. *Hum Mol Genet* 2011;20:3450–60.
- Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:172–89.
- Scott JL, Gabriellides C, Davidson RK, et al. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1502–10.
- Sesselmann S, Söder S, Voigt R, et al. DNA methylation is not responsible for p21WAF1/CIP1 down-regulation in osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:507–12.
- Delgado-Calle J, Fernández AF, Sainz J, et al. Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2013;65:197–205.
- Monti S, Tamayo P, Mesirov J, et al. Consensus clustering: a resampling-based method for class discovery and visualization of gene expression microarray data. In: Kluwer Academic Publishers ed. The Netherlands: Machine Learning, 2003:91–118.
- Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57.
- Boyapati A, Ren B, Zhang DE. SERPINB13 is a novel RUNX1 target gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;411:115–20.
- Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science* 2012;336:717–21.
- Inoue K, Ito Y. Neuroblastoma cell proliferation is sensitive to changes in levels of RUNX1 and RUNX3 protein. *Gene* 2011;487:151–5.
- Blanco FJ, Guitián R, Vázquez-Martín E, et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998;41:284–9.
- Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets* 2007;8:333–45.
- Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:791–801.
- Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, et al. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:581–92.
- Yano F, Hojo H, Ohba S, et al. A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. *Ann Rheum Dis* 2012. Published Online First 5 Oct 2012.
- Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:471–8.
- Van der Auwera I, Yu W, Sui L, et al. Array-based DNA methylation profiling for breast cancer subtype discrimination. *PLoS One* 2010;5: e12616.
- Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CP, et al. Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res* 2012;22:271–82.
- Masit CJ, Koestler DC, Christensen BC, et al. DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1133–9.
- Wang X, Manner PA, Horner A, et al. Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:963–73.
- Bau B, Gebhard PM, Haag J, et al. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 2002;46:2648–57.
- Aigner T, Zien A, Hanisch D, et al. Gene expression in chondrocytes assessed with use of microarrays. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(Suppl 2):117–23.
- Wilson VL, Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 1983;220:1055–7.
- Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet* 2004;68(Pt 3):196–204.
- Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, et al. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA* 2008;299:2877–83.
- Gierman LM, van der Ham F, Koudijs A, et al. Metabolic stress-induced inflammation plays a major role in the development of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2012;64:1172–81.
- Zhuo Q, Yang W, Chen J, et al. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:729–37.
- Felson DT. Identifying different osteoarthritis phenotypes through epidemiology. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:601–4.

