

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE GENÓMICA Y
PROTEÓMICA A LA BÚSQUEDA DE
ALTERACIONES MOLECULARES EN CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES Y CONDROCITOS DE
PACIENTES CON ARTROSIS DE RODILLA**

TESIS DOCTORAL

LUIS EMILIO CAMAFEITA FERNÁNDEZ
Madrid, 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE GENÓMICA Y
PROTEÓMICA A LA BÚSQUEDA DE
ALTERACIONES MOLECULARES EN CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES Y CONDROCITOS DE
PACIENTES CON ARTROSIS DE RODILLA**

Memoria presentada por Luis Emilio Camafeita Fernández,
Licenciado en Ciencias Químicas, para optar al título de
Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis:

Dr. Juan Antonio López del Olmo

Dr. Benjamín Fernández Gutiérrez

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares

Juan Antonio López del Olmo, Jefe de la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares,

CERTIFICA que: D. Luis Emilio Camafeita Fernández, licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

“Aplicación de técnicas de genómica y proteómica a la búsqueda de alteraciones moleculares en células madre mesenquimales y condrocitos de pacientes con artrosis de rodilla”

y considera que éste reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y la calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firma el presente certificado en Madrid, a 15 de noviembre de 2010.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a horizontal line at the bottom, positioned to the right of the text.

Fdo.: Dr. Juan Antonio López del Olmo

Benjamín Fernández Gutiérrez, Facultativo Especialista en Reumatología del Hospital Clínico San Carlos y Profesor Asociado de Medicina en la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA que: D. Luis Emilio Camafeita Fernández, licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado:

“Aplicación de técnicas de genómica y proteómica a la búsqueda de alteraciones moleculares en células madre mesenquimales y condrocitos de pacientes con artrosis de rodilla”

y considera que éste reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y la calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firma el presente certificado en Madrid, a 15 de noviembre de 2010.



Fdo.: Dr. Benjamín Fernández Gutiérrez

Este trabajo ha podido llevarse a cabo gracias a la financiación de la Fundación Mutua Madrileña y del Fondo de Investigaciones Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (proyecto 04/1698). El CNIC está financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Fundación ProCNIC.

A Natalia

Un buen escritor expresa grandes cosas con pequeñas palabras; a la inversa del mal escritor, que dice cosas insignificantes con palabras grandiosas.

Ernesto Sabato

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a Juan Antonio López y Benjamín Fernández por su paciencia y dedicación en la dirección de esta Tesis Doctoral. Nada de lo que se describe en esta memoria hubiera sido posible sin el excelente trabajo de muchas personas, entre las que quiero destacar, a sabiendas de que no van a estar todos los que son, a los cirujanos ortopédicos del Hospital Clínico San Carlos por la obtención de las muestras de médula ósea y cartílago articular; a Raquel Rollín, Pilar Tornero y Esther Villafuertes, del Servicio de Reumatología del citado hospital, por el cultivo de células madre mesenquimales y condrocitos; a Sergio Callejas y Rebeca Álvarez, de la Unidad de Genómica del CNIC, por el procesamiento de los microarrays; a Fátima Sánchez, de la Unidad de Genómica, y Pedro Romero, del Departamento de Epidemiología Cardiovascular y Genética de Poblaciones del CNIC, por su inestimable ayuda en el tratamiento estadístico de los datos de transcriptómica comparativa; a Enrique Calvo, de la Unidad de Proteómica del CNIC, por su dedicación en los ensayos de monitorización selectiva de reacciones; y a Ana Dopazo y Alberto Benguría, de la Unidad de Genómica del CNIC, y José Ramón Lamas, del Servicio de Reumatología del Hospital Clínico San Carlos, por sus sabios consejos. A todos ellos, muchas gracias.

Resumen / Summary

La artrosis, una enfermedad crónica y degenerativa de etiología multifactorial, constituye la causa más habitual de dolor y discapacidad en adultos mayores, así como la primera causa de cirugías de sustitución articular. La degradación del cartílago articular asociada a la artrosis conlleva alteraciones en la composición de la matriz extracelular y en la expresión proteica de los condrocitos, los únicos componentes celulares del cartílago, junto con cambios bien definidos en el hueso subcondral y periarticular, incluyendo esclerosis y formación de quistes y osteofitos. La funcionalidad de la articulación artrósica sólo es recuperable mediante la implantación de prótesis ortopédicas, con resultados poco satisfactorios a largo plazo, por lo que las terapias basadas en el empleo de células con potencial regenerador como las células madre mesenquimales, células progenitoras con capacidad de diferenciarse a diversos tejidos conectivos incluido el cartílago, constituyen una estrategia de curación prometedora. Por ello, con el fin de mejorar nuestro conocimiento sobre el papel de distintos tipos celulares en la patogénesis de la artrosis, en este trabajo se han buscado genes y proteínas alterados en células madre mesenquimales de médula ósea y en condrocitos provenientes de pacientes de artrosis mediante ensayos comparativos tanto de genómica como de proteómica basados, respectivamente, en microarrays de ADN y electroforesis bidimensional diferencial. Los resultados son compatibles con la preactivación de las células madre mesenquimales en artrosis en respuesta a señales quimiotácticas enviadas por el hueso subcondral, así como con la existencia de defectos en la diferenciación condrogénica y en la formación de la matriz extracelular en artrosis, y ponen de manifiesto la alteración de funciones esenciales para el correcto desempeño de la tarea regeneradora de las células madre mesenquimales en el estado patológico.

Osteoarthritis is a chronic, degenerative disease with multifactorial etiology which constitutes the most common cause of pain and disability in older adults, as well as the leading cause of joint replacement surgery. The degradation of articular cartilage in osteoarthritis is related to changes in the composition of the extracellular matrix and the alteration of protein expression by chondrocytes, the only cell component of cartilage, along with well-defined changes in the subchondral and periarticular bone, including sclerosis and cyst and osteophyte formation. The functionality of an osteoarthritic joint can only be recovered by implanting orthopaedic prostheses, with unsatisfactory results in the long term. For this reason, the application of therapies based on cells with regenerative potential like mesenchymal stem cells, progenitor cells with the capacity to differentiate into distinct connective tissues including cartilage, represent a promising treatment strategy. To gain insight into the role of diverse cell types in the pathogenesis of osteoarthritis we have searched in this work for altered genes and proteins in bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes obtained from osteoarthritis patients using both genomic and proteomic comparative assays based on DNA microarrays and differential two-dimensional electrophoresis, respectively. Results are compatible with a preactivation of osteoarthritis mesenchymal stem cells in response to signals sent by the subchondral bone, as well as with the occurrence of defects in chondrogenic differentiation and extracellular matrix formation in osteoarthritis, and point out that diseased mesenchymal stem cells have altered functions which prevent them from developing their regenerative task properly.

Índice general

Resumen / Summary	1
Abreviaturas	11
1. Introducción	15
1.1. Artrosis.....	15
1.1.1. Definición.....	15
1.1.2. Clasificación y criterios diagnósticos.....	15
1.1.3. Prevalencia y factores de riesgo.....	16
1.1.4. Etiopatogénesis.....	16
1.1.4.1. Estructura y organización del cartílago articular.....	16
1.1.4.2. Modulación bioquímica de la actividad condrocitaria.....	17
1.1.4.3. Modulación fenotípica de la actividad condrocitaria.....	18
1.1.4.4. Sinovitis e inflamación.....	18
1.1.4.5. Catabolismo, anabolismo y remodelación del hueso subcondral.....	19
1.2. Células madre mesenquimales.....	19
1.2.1. Comportamiento <i>in vitro</i>	20
1.2.2. Reparación de tejidos y terapia génica.....	21
1.3. Análisis diferencial de la expresión génica.....	22
1.3.1. Tipos de sondas.....	23
1.3.2. Análisis de datos de microarrays.....	24
1.4. Análisis diferencial de la expresión proteica.....	25
1.4.1. Electroforesis diferencial en geles bidimensionales.....	25
1.4.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.....	26
1.4.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	27
1.4.4. Identificación de proteínas mediante búsqueda en bases de datos.....	28
1.4.5. Monitorización selectiva de reacciones.....	29
1.5. Antecedentes.....	29
1.5.1. Estudios genómicos en artrosis.....	29
1.5.1.1. Estudios de genes candidatos.....	30
1.5.1.2. Estudios de ligamiento y asociación de genoma completo.....	30
1.5.1.3. Estudios de la expresión génica.....	32
1.5.2. Estudios proteómicos en artrosis.....	33
1.5.2.1. Estudios del cartílago articular.....	33
1.5.2.2. Estudios de condrocitos en cultivo.....	35
1.5.2.3. Estudios en líquido sinovial, suero y orina.....	36

2. Objetivos	39
3. Métodos	43
3.1. Selección de pacientes y obtención de especímenes.....	43
3.2. Aislamiento, cultivo y caracterización celular.....	43
3.2.1. Células madre mesenquimales.....	43
3.2.2. Condrocitos.....	45
3.3. Análisis diferencial de la expresión génica.....	45
3.3.1. Preparación de extractos de ARN.....	45
3.3.2. Amplificación, marcaje y purificación de ARN.....	46
3.3.3. Hibridación en microarrays.....	46
3.3.4. Adquisición y cuantificación de imágenes.....	46
3.3.5. Análisis estadístico.....	48
3.3.5.1. Preprocesamiento de datos.....	48
3.3.5.2. Determinación de genes diferencialmente expresados.....	50
3.3.5.3. Análisis de enriquecimiento de términos GO.....	50
3.3.5.4. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes.....	50
3.3.5.5. Análisis de interacciones proteicas.....	51
3.4. Análisis diferencial de la expresión proteica.....	51
3.4.1. Preparación de extractos proteicos.....	53
3.4.1.1. Preparación de extractos proteicos para el análisis 2D-DIGE.....	53
3.4.1.2. Preparación de extractos proteicos para el análisis SRM.....	53
3.4.2. Marcaje de proteínas.....	53
3.4.3. Electroforesis bidimensional.....	54
3.4.4. Adquisición y análisis de imágenes.....	54
3.4.5. Tinción con nitrato de plata.....	55
3.4.6. Digestión trípica de proteínas en gel.....	55
3.4.6.1. Optimización del protocolo de digestión automática en gel.....	56
3.4.6.2. Digestión trípica de proteínas diferenciales en gel.....	57
3.4.7. Digestión trípica de extractos proteicos en geles SDS-PAGE.....	57
3.4.8. Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.....	58
3.4.9. Identificación de proteínas mediante búsqueda en bases de datos.....	58
3.4.10. Archivado de datos de identificación de proteínas.....	59
3.4.11. Obtención de la función biológica de proteínas.....	60
3.4.12. Análisis de interacciones proteicas.....	60
3.4.13. Validación de los estudios de expresión proteica mediante SRM.....	60
3.5. Ensayos quimiotácticos.....	61

4. Resultados	65
4.1. Expresión génica diferencial en células madre mesenquimales de pacientes con artrosis.....	65
4.1.1. Perfil de expresión génica diferencial.....	66
4.1.2. Análisis estadístico de términos GO.....	68
4.1.3. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes.....	70
4.1.4. Análisis de interacciones proteicas.....	72
4.2. Expresión proteica diferencial en células madre mesenquimales y condrocitos de pacientes con artrosis.....	73
4.2.1. Análisis de células madre de pacientes con artrosis.....	75
4.2.1.1. Electroforesis diferencial en geles bidimensionales.....	75
4.2.1.2. Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas.....	76
4.2.1.3. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas.....	79
4.2.1.4. Interacciones entre las proteínas diferencialmente expresadas.....	81
4.2.2. Análisis de condrocitos de pacientes con artrosis.....	82
4.2.2.1. Electroforesis diferencial en geles bidimensionales.....	82
4.2.2.2. Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas.....	83
4.2.2.3. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas.....	86
4.2.2.4. Interacciones entre las proteínas diferencialmente expresadas.....	86
4.2.3. Validación de los estudios de expresión proteica mediante SRM.....	87
4.3. Ensayos quimiotácticos.....	89
5. Discusión	93
5.1. Expresión génica diferencial en células madre mesenquimales de pacientes con artrosis.....	93
5.1.1. Alteración de procesos de transducción de señal, desarrollo y diferenciación.....	94
5.1.2. Alteración de interacciones quimiocina-receptor.....	95
5.1.2.1. Regulación de quimiocinas y sus receptores.....	96
5.1.2.2. Regulación de las interacciones quimiocina-receptor.....	97
5.1.3. Regulación de genes de colágeno.....	98
5.2. Expresión proteica diferencial en células madre mesenquimales de pacientes con artrosis.....	99
5.2.1. Alteración de proteínas relacionadas con citoesqueleto/motilidad.....	99
5.2.2. Alteración de enzimas metabólicas.....	102
5.3. Intensificación de la respuesta migratoria a rhPDGF-BB de las células madre mesenquimales de pacientes con artrosis.....	103

5.4. Expresión proteica diferencial en condrocitos de pacientes con artrosis.....	103
5.5. Consideraciones globales.....	106
5.5.1. Correlación entre la expresión diferencial de genes y proteínas en las células madre mesenquimales de pacientes con artrosis.....	106
5.5.2. Limitaciones del estudio.....	107
5.5.2.1. Limitaciones de las tecnologías empleadas	107
5.5.2.2. Limitaciones derivadas del tipo de muestras y la patología.....	108
6. Conclusiones.....	111
Bibliografía.....	113
Anexo: Publicaciones.....	127
Anexo: Material Complementario.....	129

Índice de figuras

- Fig. 1.1.** Representación de una articulación normal y una artrósica mostrando algunas de las manifestaciones de la enfermedad.
- Fig. 1.2.** Cambios experimentados por el cartílago articular artrósico relacionados con los condrocitos y la matriz extracelular.
- Fig. 1.3.** El proceso mesengénico.
- Fig. 1.4.** Diferenciación de células madre mesenquimales *in vitro*.
- Fig. 1.5.** Representación esquemática de las distintas etapas del análisis diferencial de la expresión génica basado en microarrays de ADN.
- Fig. 1.6.** Determinación cuantitativa de la expresión diferencial proteica mediante 2D-DIGE.
- Fig. 1.7.** Representación esquemática de un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF.
- Fig. 1.8.** Ionización mediante electronebulización del líquido que fluye a través de un capilar estrecho.
- Fig. 1.9.** Experimento de SRM en un espectrómetro de masas híbrido con analizador de triple cuadrupolo y trampa iónica lineal.
- Fig. 3.1.** Caracterización fenotípica y del potencial diferenciador de las MSCs de médula ósea.
- Fig. 3.2.** Representación esquemática de la metodología empleada para el análisis de la expresión génica diferencial en MSCs de pacientes con artrosis en comparación con individuos control mediante microarrays de genoma humano completo.
- Fig. 3.3.** Representación esquemática del flujo de trabajo observado en el análisis estadístico de la expresión diferencial génica en MSCs de pacientes con artrosis en comparación con individuos control mediante microarrays de genoma humano completo.
- Fig. 3.4.** Representación esquemática de la metodología empleada para el análisis de la expresión diferencial proteica en MSCs y condrocitos de pacientes con artrosis en comparación con individuos control mediante 2D-DIGE.
- Fig. 3.5.** Diagrama de flujo de la aplicación desarrollada para el archivado de la información fundamental relativa a los datos finales de identificación de proteínas.
- Fig. 3.6.** Representación esquemática de la cámara de cultivo celular tipo Transwell empleada para los ensayos quimiotácticos.
- Fig. 4.1.** Representación esquemática de los procedimientos empleados para el análisis de la expresión diferencial en muestras de pacientes con artrosis y controles.
- Fig. 4.2.** Expresión génica diferencial en MSCs de pacientes con artrosis en comparación con individuos control.
- Fig. 4.3.** Distribución de los genes regulados de MSCs en sus distintas categorías funcionales.
- Fig. 4.4.** Frecuencia de los términos GO más significativos de cada una de las tres categorías funcionales en los genes regulados al alza y a la baja en las MSCs de fenotipo artrósico.

- Fig. 4.5.** Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes en MSCs de pacientes con artrosis.
- Fig. 4.6.** Red de interacciones entre las proteínas codificadas por los genes sobreexpresados e infraexpresados en las MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis en microarrays.
- Fig. 4.7.** Influencia del lavado de iones Ag^+ , la concentración de tripsina, el tiempo de incubación con tripsina y la extracción con acetonitrilo en el número promedio de péptidos medidos en los correspondientes espectros MALDI-MS y en su s/n promedio.
- Fig. 4.8.** Imagen representativa de la tinción diferencial de extractos proteicos de MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis, individuos control y de la mezcla equimolecular de ambos empleada como estándar interno.
- Fig. 4.9.** Análisis de componentes principales de los patrones de manchas proteicas de MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis y controles.
- Fig. 4.10.** Estudio de la expresión diferencial de proteínas en MSCs de pacientes con artrosis.
- Fig. 4.11.** Distribución de las proteínas alteradas de MSCs en sus distintas categorías funcionales.
- Fig. 4.12.** Red de interacciones entre las proteínas reguladas diferencialmente en las MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis basado en 2D-DIGE y MALDI-MS.
- Fig. 4.13.** Imagen representativa de la tinción diferencial de extractos proteicos de condrocitos de pacientes con artrosis, individuos control y de la mezcla equimolecular de ambos empleada como estándar interno.
- Fig. 4.14.** Análisis de componentes principales de los patrones de manchas proteicas de condrocitos de pacientes con artrosis y controles.
- Fig. 4.15.** Estudio de la expresión diferencial de proteínas en condrocitos de pacientes con artrosis.
- Fig. 4.16.** Distribución de las proteínas alteradas de condrocitos en sus distintas categorías funcionales.
- Fig. 4.17.** Red de interacciones entre las proteínas reguladas diferencialmente en los condrocitos de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis basado en 2D-DIGE y MALDI-MS.
- Fig. 4.18.** Análisis SRM de proteínas encontradas reguladas en MSCs de pacientes con artrosis mediante 2D-DIGE y MALDI-MS.
- Fig. 4.19.** Respuesta quimiotáctica de MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis en comparación con individuos control a 1 ng/ml de rhPDGF-BB.
- Fig. 4.20.** Tinción con violeta cristal de la membrana microporosa de la cámara de cultivo celular empleada en el ensayo quimiotáctico con MSCs.
- Fig. 5.1.** La vía de señalización Wnt/ β -catenina.
- Fig. 5.2.** Remodelación del citoesqueleto de actina.
- Fig. 5.3.** Correlación entre la expresión diferencial de genes y proteínas en las MSCs de pacientes con artrosis.

Índice de tablas

- Tabla 1.1.** Algunos motores de búsqueda de acceso público.
- Tabla 1.2.** Genes con posible asociación con artrosis.
- Tabla 1.3.** Estudios proteómicos en artrosis.
- Tabla 4.1.** Los 38 genes con mayor nivel de expresión diferencial en MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis mediante microarrays.
- Tabla 4.2.** Conjuntos de genes enriquecidos en el fenotipo control de MSCs de médula ósea.
- Tabla 4.3.** Proteínas diferencialmente expresadas en MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis mediante 2D-DIGE y MALDI-MS.
- Tabla 4.4.** Clasificación funcional de los dos grupos principales de proteínas diferencialmente expresadas en MSCs de pacientes con artrosis.
- Tabla 4.5.** Proteínas diferencialmente expresadas en condrocitos de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis mediante 2D-DIGE y MALDI-MS.
- Tabla 5.1.** Quimiocinas y receptores de quimiocinas regulados en las MSCs de pacientes con artrosis.
- Tabla 5.2.** Subconjunto de genes de colágeno con mayor contribución a la infraexpresión del conjunto en las MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes.

Abreviaturas

2D	Bidimensional
2D-DIGE	Electroforesis diferencial en geles bidimensionales (<i>2-dimensional differential in-gel electrophoresis</i>)
2-DE	Electroforesis bidimensional en gel (<i>2-dimensional gel electrophoresis</i>)
ACP	Análisis de componentes principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosin difosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
AP	Activador del plasminógeno
APC	Poliposis adenomatosa coli (<i>adenomatous polyposis coli</i>)
ARNc	Ácido ribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
β -TrCP	Proteína con repeticiones β -transducina (<i>β-transducin repeat-containing protein</i>)
BMP	Proteína morfogénica del hueso (<i>bone morphogenic protein</i>)
BVA	Análisis de la variación biológica (<i>biological variation analysis</i>)
CID	Fragmentación inducida por colisión (<i>collision-induced dissociation</i>)
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
COMP	Proteína oligomérica de la matriz del cartilago (<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>)
CTP	Citosina trifosfato
DE	Desviación estándar
DEXA	Absorciometría de rayos X de doble energía (<i>dual-energy X-ray absorptiometry</i>)
DIA	Análisis diferencial en gel (<i>differential in-gel analysis</i>)
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's modified Eagles's medium</i>)
DSH	Proteína <i>dishevelled</i>
DTT	Ditiotreitol
EDA	Análisis de datos ampliado (<i>extended data analysis</i>)
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ESI	Ionización mediante electronebulización (<i>electrospray ionization</i>)
ExPASy	<i>Expert protein analysis system</i>
FDA	Factor de despolimerización de actina
FDR	Proporción de falsos positivos (<i>false discovery rate</i>)
GO	<i>Gene ontology</i>
GSK-3	Glicógeno sintasa quinasa 3 (<i>glycogen synthase kinase 3</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
IC	Intervalo de confianza
IEF	Isoelectroenfoque
IgG	Inmunoglobulina de clase G
iHOP	<i>Information hyperlinked over proteins</i>
IL	Interleuquina
iNOS	Isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IPG	Gradiente de pH inmovilizado (<i>immobilized pH gradient</i>)
IQ	Índice quimiotáctico
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>low-density lipoprotein</i>)

Abreviaturas

LOD	Logaritmo de probabilidad (<i>logarithm of the odds</i>)
m/z	Relación masa-carga
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (<i>major histocompatibility complex</i>)
MM	Masa molecular
MMLV-RT	Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney
MMP	Metaloproteasa de matriz (<i>matrix metalloprotease</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i>mass spectrometry</i>)
MS ²	Espectrometría de masas en tándem
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MSC	Célula madre mesenquimal (<i>mesenchymal stem cell</i>)
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NL	No lineal
NTP	Nucleósido-trifosfato
OMIM	<i>Online mendelian inheritance in man</i>
OR	Cociente de probabilidad (<i>odds ratio</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Factor de crecimiento plaquetario (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PFF	Huella dactilar de fragmentación peptídica (<i>peptide fragmentation fingerprint</i>)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pI	Punto isoeléctrico
PMF	Huella dactilar de masa peptídica (<i>peptide mass fingerprint</i>)
PTM	Modificación postraducciona (<i>post-translational modification</i>)
RCSB	<i>Research collaboratory for structural bioinformatics</i>
rhPDGF	Factor de crecimiento plaquetario humano recombinante (<i>recombinant human PDGF</i>)
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SFB	Suero fetal bovino
SFRP	Proteínas secretadas relacionadas con frizzled (<i>secreted frizzled-related proteins</i>)
SGD	<i>Saccharomyces genome database</i>
SLRP	Proteoglicanos pequeños ricos en leucina (<i>small leucine-rich proteoglycans</i>)
s/n	Relación señal/ruido
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SRM	Monitorización selectiva de reacciones (<i>selected reaction monitoring</i>)
TCF	Factor de transcripción de células T (<i>T-cell transcription factor</i>)
TEF	Tasa de error por familia
TGF	Factor de crecimiento transformante (<i>transforming growth factor</i>)
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TOF	Tiempo de vuelo (<i>time of flight</i>)
TOF/TOF	Tiempo de vuelo en tándem
Tris-HCl	Hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visble
XIC	Cromatograma de iones extraídos (<i>extracted ion chromatogram</i>)
XML	Lenguaje de marcado extensible (<i>extensible markup language</i>)

1. Introducción



Figura 1.1. Representación de una articulación normal (arriba) y una artrósica (abajo) mostrando algunas de las manifestaciones de la enfermedad.

1.1. ARTROSIS

La artrosis es una enfermedad crónica y degenerativa de etiología multifactorial que constituye uno de los trastornos reumáticos más comunes, así como la causa más habitual de dolor y discapacidad en adultos mayores (Haq *et al.*, 2003) y la primera causa de cirugías de sustitución articular (Learmonth *et al.*, 2007). Los tratamientos disponibles para la artrosis producen mejoras sintomáticas, pero no detienen el avance de una enfermedad que sólo en EE.UU. se presenta con manifestaciones clínicas en 27 millones de personas (Lawrence *et al.*, 2008).

1.1.1. Definición

Tradicionalmente la artrosis se ha considerado una alteración del cartílago derivada de la degradación local del cartílago articular (Fig. 1.1). De acuerdo con la actual definición de consenso (Kuettner y Goldberg, 1995), la enfermedad se origina cuando por causas mecánicas o biológicas se altera el estado de equilibrio que en condiciones normales existe entre los procesos de síntesis y degradación de los condrocitos y la matriz extracelular (MEC) del cartílago articular, así como del hueso subcondral. La artrosis constituye una insuficiencia articular global en la que los cambios morfológicos, bioquímicos y biomecánicos que afectan al conjunto de los tejidos y estructuras de la articulación diartrodial se traducen en fibrilación, ulceración, pérdida de cartílago articular, esclerosis y eburnación del hueso subcondral, desarrollo de osteofitos y formación de quistes subcondrales (Burr, 1998; Lane y Nevitt, 2002; Oettmeier y Abendroth, 1989). Sus manifestaciones clínicas comprenden dolor, molestias y rigidez en las articulaciones, limitación de movimientos e inflamación intraarticular moderada.

1.1.2. Clasificación y criterios diagnósticos

La artrosis suele clasificarse como primaria (idiopática) o secundaria a alteraciones inflamatorias, metabólicas o mecánicas. Su diagnóstico se establece fundamentalmente por criterios clínicos y radiológicos, siendo las manos, las rodillas y las caderas las articulaciones más afectadas. Los criterios definidos por el *American College of Rheumatology* (Altman *et al.*, 1990; Hochberg *et al.*, 1995a; Hochberg *et al.*, 1995b) son los más ampliamente utilizados para la clasificación de la artrosis.

1.1.3. Prevalencia y factores de riesgo

La estimación de la prevalencia de la artrosis es difícil, dado que los cambios estructurales que acompañan a esta enfermedad, que en la mayoría de los pacientes ocurren a medida que envejecen, pueden tener lugar de forma asintomática. Se estima que alrededor del 30% de los mayores de 26 años muestran signos radiológicos (presencia de osteofitos) de artrosis de mano, porcentaje que alcanza el 40% de los mayores de 60 años en el caso de la artrosis de rodilla (Felson *et al.*, 1987; Jordan *et al.*, 2009; Lawrence *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2002). Los principales factores de riesgo sistémicos que se han descrito para la artrosis son la edad, el sexo, la raza, la densidad mineral ósea, factores genéticos y factores metabólico-endocrinos; respecto a los factores de riesgo locales, se han señalado fundamentalmente el peso corporal, la actividad laboral, la actividad deportiva, los tratamientos de sustitución hormonal, traumatismos, debilidad muscular y alteraciones óseas congénitas (Cooper *et al.*, 2000; Felson *et al.*, 2000).

1.1.4. Etiopatogénesis

El daño infligido a una articulación ya sea como consecuencia de un traumatismo, una herida, la sobrecarga o el desgaste, o bien asociado a un proceso de envejecimiento, puede producir cambios en la composición, la estructura y las propiedades de los tejidos implicados. Dichas alteraciones pueden comprometer el correcto funcionamiento del cartílago articular en el agresivo entorno mecánico en el que las articulaciones desarrollan normalmente su función.

1.1.4.1. Estructura y organización del cartílago articular

El cartílago articular normal está formado por una vasta MEC que alberga una reducida población celular de condrocitos (cuyo volumen es inferior al 5% del total) encargada de su síntesis y mantenimiento (Aydelotte y Kuettner, 1988) (Fig. 1.2). La MEC está compuesta principalmente por agua (*ca.* 70%), colágeno (fundamentalmente de tipo II) y proteoglicanos, especialmente agregano, una proteína de 230 kDa a la

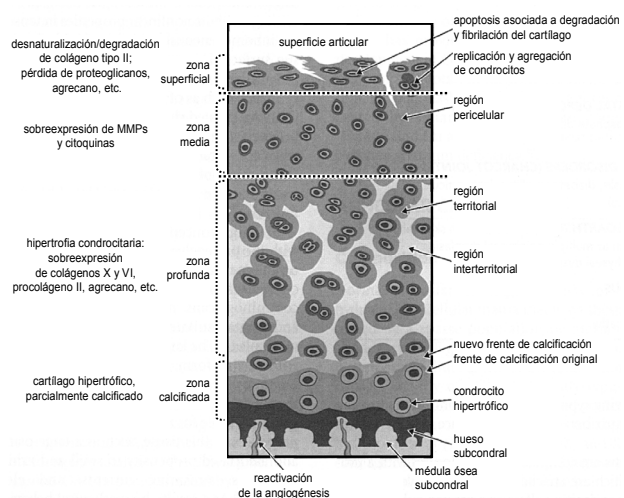


Figura 1.2. Cambios experimentados por el cartílago articular artrósico relacionados con los condrocitos y la matriz extracelular. MMP, metaloproteasa de matriz.

que se unen numerosas cadenas de glicosaminoglicanos (Kuettner, 1992). Las moléculas de colágeno de tipos II, IX y XI conforman una compleja red fibrilar heterogénea y anisotrópica que, rodeada de moléculas de agregano, constituye el almacén del cartílago.

Las cadenas de glicosaminoglicano, principalmente condroitín sulfato y queratano sulfato, pueden almacenar grandes cantidades de agua, de modo que cuando se ejerce una presión sobre el cartílago éste se deforma de manera gradual a medida que las moléculas de agua abandonan el interior de los proteoglicanos en dirección a la superficie articular (Maroudas y Schneiderman, 1987). Al cesar la presión, las moléculas de agua regresan a su ubicación inicial atraídas por la carga negativa de los proteoglicanos, recuperando así el cartílago su estructura. El intenso efecto amortiguador ejercido por los proteoglicanos ralentiza y disipa el flujo de fuerzas que han de atravesar el entramado de colágeno, elemento que en última instancia mantiene la integridad estructural del cartílago en virtud de su enorme resistencia a la tensión (Kuettner, 1992).

1.1.4.2. Modulación bioquímica de la actividad condrocitaria

El desequilibrio mecánico originado por la pérdida de elasticidad que conlleva la degradación y desaparición de colágenos y proteoglicanos asociadas al proceso artrósico produce un incremento de la tensión repercutida sobre el tejido (Flahiff *et al.*, 2004), especialmente a nivel celular (Alexopoulos *et al.*, 2005).

En condiciones fisiológicas normales, el recambio de los componentes de la MEC tiene lugar de manera lenta en un estado de equilibrio homeostático entre procesos anabólicos y catabólicos que depende fundamentalmente de la actividad condrocitaria, la cual está regulada por factores genéticos y ambientales como la acción de mediadores solubles (*e.g.* factores de crecimiento y citocinas), la composición de la MEC y el estrés mecánico. Así, numerosos trabajos han puesto de manifiesto la posible capacidad reguladora del estrés mecánico sobre la actividad condrocitaria *in vivo* (*e.g.* Smith *et al.*, 2004; Wilkins *et al.*, 2000), aceptándose que la compresión estática inhibe la biosíntesis de la MEC, mientras que las presiones cíclicas e intermitentes estimulan el metabolismo condrocitario (Chen *et al.*, 2001; Loening *et al.*, 2000).

Los cambios en el cartílago de la articulación dañada arrancan con una reacción hipertrófica originada por un aumento de la síntesis de la MEC que incrementa el contenido en agregano (McDevitt *et al.*, 1977). A continuación tiene lugar una fase de aceleración del recambio de la MEC en la que aumentan la síntesis y secreción de metaloproteasas de matriz (MMPs) como colagenasas, gelatinasas y agreganasas, así como de otras enzimas degradantes como cisteín, tiol y serín proteasas. Este proceso se traduce en una pérdida

neta de los principales componentes de la MEC que se evidencia en daños y pérdidas en la red de colágeno (Adams y Brandt, 1991; Brandt *et al.*, 1991; Guilak *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 2006; Setton *et al.*, 1994). Los propios productos de degradación de los componentes de la MEC podrían retroalimentar el proceso a través de la activación de receptores de condrocitos y células sinoviales (Homandberg *et al.*, 1992; Yasuda y Poole, 2002).

1.1.4.3. Modulación fenotípica de la actividad condrocitaria

Los condrocitos, responsables en última instancia de la integridad estructural y funcional del cartílago, poseen una baja capacidad de regeneración. En el individuo adulto, los condrocitos constituyen células completamente diferenciadas que tras la síntesis de la MEC juegan un papel principal en la patogénesis de la enfermedad, ya que en respuesta a estímulos adversos del medio promueven la degradación de la MEC e inhiben procesos esenciales para la reparación del cartílago.

El incremento de la actividad sintética observado en la artrosis temprana se interpreta como un intento de regenerar la MEC con determinados componentes del cartílago, incluyendo colágenos de tipos II, IX y XI, agregano y colágeno pericelular de tipo IV (Poole *et al.*, 2007). El comportamiento anormal de los condrocitos se traduce en la aparición de fibrilaciones, la depleción de la MEC y la formación de agregados celulares, así como en cambios en la cantidad, distribución o composición de proteínas de la MEC (Pritzker *et al.*, 2006). La presencia de colágenos normalmente ausentes en el cartílago articular adulto, como colágeno de tipo X (marcador de hipertrofia condrocitaria) y otros genes de diferenciación condrocitaria, evidencian la modulación fenotípica y sugieren la reprogramación del desarrollo condrocitario (Tchetina *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2003).

1.1.4.4. Sinovitis e inflamación

Si bien existe controversia en torno al papel fundamental que la inflamación sinovial juega en la artrosis, es probable que tanto la sinovitis, con infiltración de células B y linfocitos T activados, como la sobreexpresión de moléculas proinflamatorias contribuyan a la alteración de la función condrocitaria, favoreciendo el desequilibrio entre catabolismo y anabolismo en la remodelación de la MEC (Benito *et al.*, 2005).

Los condrocitos del tejido artrósico sobreexpresan receptores de interleuquina-1 (IL-1) (Martel-Pelletier *et al.*, 1992) y del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Webb *et al.*, 1997), así como la propia IL-1 (Melchiorri *et al.*, 1998). IL-1 y TNF- α constituyen potentes activadores de la degradación del cartílago *in vitro* (Poole, 2005), habiéndose observado que su inhibición mediante antagonistas biológicos detiene la resorción de la MEC en cultivos de

cartílago articular (Kobayashi, 2005). La isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) se encuentra asimismo sobreexpresada en el tejido artrósico (Amin *et al.*, 1995), de manera que en éste la producción de NO es mayor en comparación con el tejido sano. Sin embargo, Clements *et al.* (2003) demostraron que la delección de los genes que codifican IL-1 β , la enzima convertidora de IL-1 β , estromelina-1 o iNOS aceleraba el desarrollo de artrosis de rodilla en ratones con artrosis inducida quirúrgicamente, poniendo de manifiesto que la alteración del control homeostático que regula el equilibrio entre anabolismo y catabolismo favorece la destrucción del cartílago.

1.1.4.5. Catabolismo, anabolismo y remodelación del hueso subcondral

La sobrecarga de la articulación y la inflamación sinovial podrían coadyuvar a la alteración de la función condrocitaria, contribuyendo al desajuste entre el catabolismo y el anabolismo de los condrocitos en la remodelación de la MEC; así, la sobreexpresión de MMPs y otras enzimas degradantes se ha asociado a la destrucción del cartílago articular (Nelson *et al.*, 2006; Setton *et al.*, 1994). Inicialmente tiene lugar una pérdida local de proteoglicanos y colágeno de tipo II en la superficie articular (Fig. 1.2), lo cual resulta en un aumento del contenido de agua y, consecuentemente, en una merma progresiva de la capacidad amortiguadora de la MEC a medida que la lesión progresa. Existen evidencias, sin embargo, de un aumento compensatorio de la síntesis de colágeno de tipo II en zonas más profundas del cartílago (Poole *et al.*, 2007); así, la sobreexpresión de colágeno de tipo II (*COL2A1*) ha sido demostrada en estudios de expresión global tanto de tipo genómico (Aigner *et al.*, 2006) como proteómico (Hermansson *et al.*, 2004).

La posible modificación de la actividad biológica del hueso subcondral artrósico se apoya en estudios en los que se han identificado polimorfismos en *ASPN*, el gen que codifica asporina, la cual inhibe el anabolismo del cartílago mediante la unión a TGF- β (Kizawa *et al.*, 2005), y en *FRZB* (Loughlin *et al.*, 2004), que codifica la proteína secretada sFRP3, un antagonista de la señalización de ligandos Wnt (véase el apartado 1.5).

1.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre o progenitoras se caracterizan por su capacidad de mantenerse en un estado indiferenciado durante largo tiempo, autorenovándose mediante división mitótica, hasta que determinados estímulos desencadenan su diferenciación en una amplia gama de células especializadas (Becker *et al.*, 1963). Las células madre del embrión en desarrollo son totipotenciales, *i.e.*, poseen la capacidad de generar cualquier tipo de tejido embrionario especializado, mientras que en el organismo adulto las células madre sustituyen células

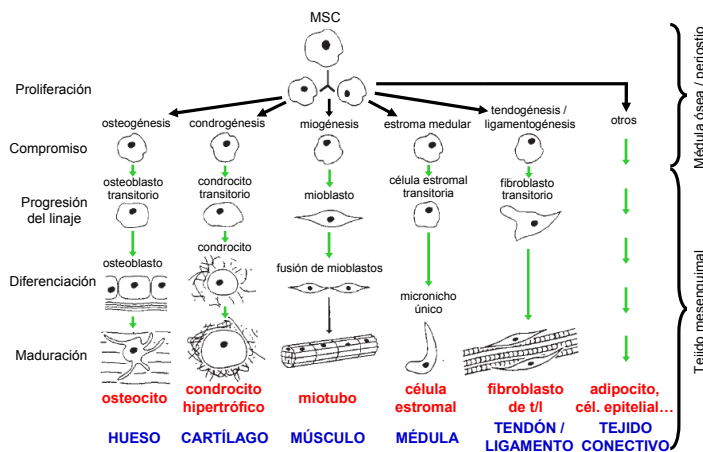


Figura 1.3. El proceso mesengénico. cél., célula; MSC, célula madre mesenquimal; t/l, tendón/ligamento.

especializadas que han resultado dañadas. Frente a las células madre embrionarias las adultas poseen menor capacidad de autorenovación y suelen considerarse multipotenciales, *i.e.*, que sólo pueden diferenciarse en células especializadas del tejido u órgano en el que residen (Gojo *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2001; Orlic *et al.*, 2001; Ratajczak *et al.*, 2007).

La médula ósea contiene al menos dos tipos de células madre: células madre hematopoyéticas, capaces de generar cualquier tipo de célula sanguínea, y células madre estromales o mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSCs), descritas por primera vez por Friedenstein *et al.* (1974), una población celular mixta con capacidad de diferenciación multipotente que puede generar tejidos mesenquimales como hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón y tejido adiposo (Caplan, 2005; Chamberlain *et al.*, 2007) (Fig. 1.3). La médula ósea constituye el principal depósito de MSCs, si bien la presencia de este tipo de células se ha confirmado en muchos otros tejidos como el graso, la membrana sinovial y el cartílago (Caplan, 2005).

1.2.1. Comportamiento *in vitro*

Aunque no son inmortales, las MSCs pueden expandirse en cultivo numerosas veces conservando su potencial de crecimiento y diferenciación en diversos linajes. Desde el punto de vista fenotípico, las MSCs son heterogéneas y se caracterizan por la expresión de varias moléculas, incluyendo CD105 (SH2) y CD73 (SH3/4), mientras que son negativas para los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y CD14 (Chamberlain *et al.*, 2007).

La incubación de MSCs en medios de cultivo específicos permite su diferenciación en diversos tejidos mesenquimales (Fig 1.4). Así, la incubación *in vitro* con ácido ascórbico, β -glicerofosfato y dexametasona genera nódulos de osteoblastos, mientras que la presencia en el medio de cultivo de dexametasona, insulina, isobutil metil xantina e indometacina estimula la diferenciación adipogénica (Pittenger *et al.*, 1999) y el tratamiento con 5-azacitidina y anfotericina B promueve la diferenciación en mioblastos (Wakitani *et al.*, 1995). La diferenciación condrogénica se consigue en presencia de TGF- β (Mackay *et al.*, 1998). La

capacidad de diferenciación y conservación del fenotipo de las MSCs ha sido estudiada por métodos tanto genómicos como proteómicos (Chiellini *et al.*, 2008; Djouad *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2005; Kubota *et al.*, 2003).

1.2.2. Reparación de tejidos y terapia génica

La posibilidad de diferenciar MSCs en varios tipos celulares *in vitro*, junto con su relativa facilidad de expansión en cultivo y sus características inmunológicas, convierten a este tipo de células en una prometedora fuente de células madre para la reparación de tejidos y la terapia génica (Grove *et al.*, 2004). No obstante, el conocimiento del comportamiento *in vivo* de las MSCs es pobre en comparación con su caracterización *in vitro*.

La administración local de MSCs ha mostrado la capacidad reparadora de estas células en enfermedades como el infarto de miocardio (Orlic *et al.*, 2001) y lesiones medulares (Hofstetter *et al.*, 2002), mientras que en miocardio adulto sano se ha descrito neoangiogénesis local en torno al lugar donde se habían inyectado MSCs de origen murino (Gojo *et al.*, 2003). Otros trabajos han mostrado que en fetos y animales neonatos las MSCs trasplantadas se insertan y diferencian en múltiples tejidos (Kopen *et al.*, 1999; Liechty *et al.*, 2000), comportamiento que podría venir en buena medida determinado por su exposición a tejidos y órganos en fase de intenso desarrollo.

La administración sistémica de MSCs ha sido empleada por algunos autores. Este abordaje permitió a Barbash *et al.* (2003) deducir que el tejido dañado podría expresar determinados receptores o ligandos que facilitarían el tráfico de MSCs hacia el lugar del daño, así como su adhesión e infiltración, mientras que Chen *et al.* (2001) y Mahmood *et al.* (2003) demostraron la migración de MSCs humanas y murinas hacia zonas dañadas por isquemia cerebral al ser trasplantadas por vía intravenosa en ratas. Intentando tratar el rechazo al trasplante cardiaco en ratas mediante la administración de MSCs de rata por vía intravenosa, Wu *et al.* (2003) encontraron que éstas migraban masivamente hacia los sitios de rechazo. En el ámbito de las terapias génicas se ha logrado el trasplante de MSCs

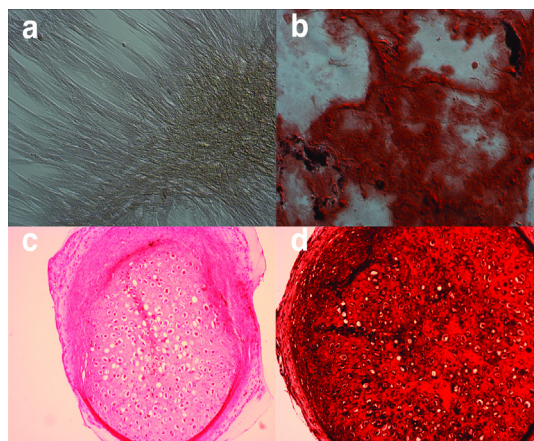


Figura 1.4. Diferenciación de células madre mesenquimales *in vitro*. (a) Control con tinción negativa al rojo de alizarina S. (b) Osteogénesis inducida con notables cambios morfológicos y marcada acumulación de calcio extracelular revelada con rojo de alizarina S. (c) Condrogénesis revelada con hematoxilina y eosina mostrando morfología típica de cartílago hialino y lagunas de condrocitos rodeadas de MEC. (d) Tinción con safranina O de los glicosaminoglicanos de la MEC. Magnificación: $\times 100$. MEC, matriz extracelular.

transfectadas con el factor de crecimiento endotelial vascular para la mejora de la función cardíaca tras el infarto de miocardio en ratas (Yang *et al.*, 2007), así como la utilización de MSCs para el suministro de interferón- β a tumores en ratones (Studený *et al.*, 2002) y la estimulación de la formación de hueso mediante MSCs que expresan proteínas morfogénicas del hueso (*bone morphogenic proteins*, BMPs) (Hasharoni *et al.*, 2005).

El empleo de MSCs en terapia celular en el contexto de la artrosis ha sido investigado en algunos trabajos. En un modelo animal de artrosis inducida por traumatismo, Murphy *et al.* (2003) observaron una significativa regeneración tras la inyección intraarticular de MSCs autólogas. No se localizaron MSCs marcadas en el cartílago articular, pero sí en el neomenisco, si bien en una pequeña cantidad que no justificaba la extensión del tejido neoformado, lo cual sugiere que en este caso los efectos beneficiosos de las MSCs podrían deberse a un efecto inductor sobre células progenitoras endógenas. Pereira *et al.* (1995) realizaron un trasplante sistémico de MSCs de medula ósea por vía intravenosa en ratones irradiados. La progenie de estas células, localizadas posteriormente en médula, bazo, hueso, cartílago y pulmón, constituía sólo el 2,5% de los condrocitos aislados de cartílago xifoide y articular. Las células trasplantadas tampoco fueron detectadas en el cartílago articular de un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno (Augello *et al.*, 2007).

A fin de que las MSCs atraviesen el endotelio para confluir en un tejido dañado y se adhieran e infiltren es probable que éste exprese determinados receptores o ligandos, como ocurre con la concentración de leucocitos en el sitio de inflamación (Sánchez-Madrid y del Pozo, 1999), mientras que diversos estudios señalan que las MSCs humanas podrían expresar funcionalmente diversos receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión (Honczarenko *et al.*, 2006; Ponte *et al.*, 2007; Ringe *et al.*, 2007). Por ello, la modulación de las interacciones quimiocina-receptor de las MSCs permitiría incrementar su capacidad de corregir alteraciones heredadas de los tejidos mesenquimales y facilitaría la reparación de tejidos *in vivo*.

1.3. ANÁLISIS DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Frente a los métodos clásicos de análisis de ADN, que permiten identificar un reducido número de secuencias, los *chips* o *microarrays* de ADN (Schena *et al.*, 1995) posibilitan el análisis simultáneo de miles de genes gracias a la disposición de un gran número de estas moléculas sobre un sustrato sólido apropiado. Impulsada por los proyectos de secuenciación, gracias a los cuales se dispone de sondas para la totalidad de los genes de un número cada vez mayor de organismos, la tecnología de microarrays constituye en la actualidad una herramienta fundamental en biomedicina, con aplicaciones en numerosos ámbitos como la

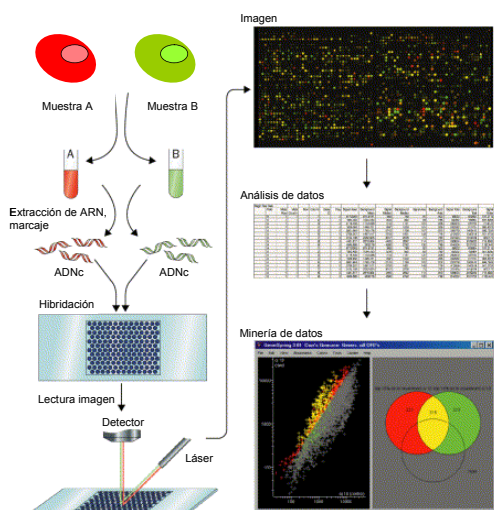


Figura 1.5. Representación esquemática de las distintas etapas del análisis diferencial de la expresión génica basado en microarrays de ADN. ADNc, ácido desoxirribonucleico complementario; ARN, ácido ribonucleico.

determinación de perfiles de expresión génica, la selección de biomarcadores, la farmacogenómica y la identificación de genes marcadores del pronóstico de enfermedades (véanse, por ejemplo, Al-Shibli *et al.*, 2008; Coe *et al.*, 2008; Roses, 2008).

El material genético inmovilizado sobre el soporte, denominado sonda, puede estar constituido por secuencias cortas (oligonucleótidos) o de mayor tamaño como ADNc (sintetizado a partir de ARNm), o por productos obtenidos por replicación *in vitro* de secuencias de ADN mediante PCR. El procedimiento de hibridación sobre microarrays de doble canal se esquematiza en

la Figura 1.5: a partir del ARNm extraído de dos muestras a comparar se sintetiza el correspondiente ADNc (de una sola cadena). El ADNc de cada muestra se marca con un fluoróforo distinto y se incuba sobre el microarray para permitir la hibridación de secuencias complementarias y, mediante la excitación de la fluorescencia de las marcas incorporadas, la identificación y cuantificación del ADN presente en la muestra, lo cual permite determinar qué genes se han expresado de forma diferencial. En caso de emplear matrices de un solo canal se emplea un paso adicional de transcripción inversa para generar ADNc de doble cadena a partir del ARNm extraído, tras lo cual se lleva a cabo una transcripción *in vitro* marcando el ARNc con biotina. Tras la fragmentación del ARNc marcado, cada muestra es hibridada en un microarray distinto y marcada con un único fluoróforo unido a un anticuerpo antibiotina. Finalmente, se mide la fluorescencia emitida por cada una de las muestras por separado.

1.3.1. Tipos de sondas

Las sondas comúnmente empleadas en los microarrays de ADN consisten en oligonucleótidos de cadena sencilla de ADN, ya sea sintetizados *in situ* o inmovilizados sobre un soporte apropiado (Campàs y Katakis, 2004; Lockhart *et al.*, 1996; Ramakrishnan *et al.*, 2002). Estas sondas suelen ser lineales y su longitud oscila entre 11 y 50 nucleótidos, si bien las horquillas de nucleótidos van popularizándose en razón de su mayor estabilidad, afinidad e

índice de hibridación, factores que redundan en una mejor relación señal/ruido (s/n) de la lectura del microarray.

Por la gran estabilidad térmica de los híbridos que generan, también se emplean las sondas de ácidos nucleicos peptídicos, cuyas bases nucleicas se asientan sobre un esqueleto de naturaleza peptídica en lugar de hacerlo sobre el esqueleto de fosforribosas convencional. Además, los híbridos que se obtienen a partir de estas sondas son menos sensibles a la fuerza iónica debido a la ausencia de carga del ácido nucleico peptídico. Por otra parte, el hecho de que los dúplex que presentan desapareamientos de una sola base sean menos estables que los correspondientes híbridos ADN-ADN confiere a estas sondas una especial aplicabilidad en la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) (Campàs y Katakis, 2004). Finalmente, puede emplearse asimismo ARNm de genes concretos como sonda de hibridación, si bien, dada su baja estabilidad, su utilización requiere llevar a cabo una transcripción inversa para obtener un ADNc de mayor estabilidad (Campàs y Katakis, 2004).

1.3.2. Análisis de datos de microarrays

La ingente cantidad de información obtenida en los ensayos basados en microarrays hace que los métodos tradicionales de comparación de niveles de expresión de genes individuales no resulten útiles. Los abordajes que se han propuesto para extraer información acerca de los genes diferencialmente expresados en este tipo de experimentos se basan en aproximaciones estadísticas para el cálculo de la expresión diferencial, el agrupamiento jerárquico de genes y el análisis de la abundancia relativa de anotaciones en bases de datos como *Gene Ontology* (GO) (The Gene Ontology Consortium, 2000) y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Kahehisa y Goto, 2000).

Existen diversas plataformas comerciales dirigidas al análisis de datos de microarrays, pero suelen ser costosas y difícilmente adaptables; como alternativa, existen herramientas basadas en proyectos de software libre como Tm4 (Saeed *et al.*, 2003), Gepas (Herrero *et al.*, 2003) y Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004). Este último es un conjunto de paquetes de software orientados al análisis de datos de microarrays que operan bajo la plataforma de análisis estadístico R (Chambers, 2008). Dado que R es, además, un lenguaje de programación, el empleo de esta plataforma facilita en gran medida la adaptación a las peculiaridades de cada experimento. Bioconductor ofrece, entre otros, métodos para la lectura y procesamiento de datos de microarrays de uno o dos canales, paquetes de anotaciones actualizadas y métodos de análisis estadístico.

1.4. ANÁLISIS DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

El término proteoma (el complemento *proteico* del *genoma*) fue acuñado en los años 90 por analogía con la genómica (Wasinger *et al.*, 1995). La proteómica es el estudio sistemático y a gran escala de las proteínas, especialmente de sus niveles de expresión, interacciones, modificaciones, funciones y de su localización. Sus antecedentes se encuentran en las técnicas que la química de proteínas había venido empleando desde los años 70: electroforesis bidimensional (*two-dimensional electrophoresis*, 2-DE) para la separación de proteínas (O'Farrell, 1975); secuenciación de Edman, que proporciona información limitada acerca de la secuencia de las proteínas de interés (Edman y Begg, 1967); y *Western blot*, que permite la inmunodetección de proteínas concretas (Burnette, 1981). Actualmente las herramientas proteómicas posibilitan el análisis diferencial de la expresión proteica a través de dos abordajes básicos (Doerr, 2007; Domon y Aebersold, 2006): la electroforesis diferencial en geles bidimensionales (*two-dimensional differential in-gel electrophoresis*, 2D-DIGE) en combinación con espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) (Minden *et al.*, 2009) y la cromatografía líquida acoplada a MS (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) (Yates *et al.*, 2009).

1.4.1. Electroforesis diferencial en geles bidimensionales

La aplicación sucesiva de dos tipos de electroforesis a una mezcla compleja de proteínas constituye el fundamento de la 2-DE (Gorg *et al.*, 2000; Gygi *et al.*, 2000). En la primera dimensión se utiliza el isoelectroenfoco (IEF) para separar las proteínas en función de su punto isoelectro (pI) en un gradiente continuo de pH; a continuación, se efectúa una separación en dirección ortogonal a la primera mediante electroforesis en geles de

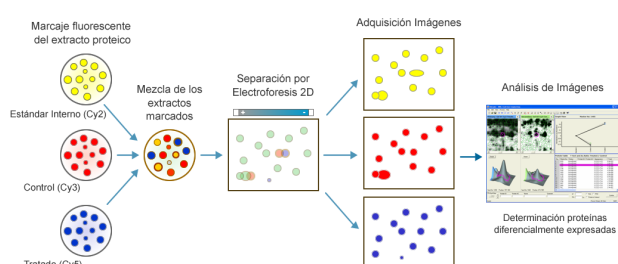


Figura 1.6. Determinación cuantitativa de la expresión diferencial proteica mediante 2D-DIGE. Cada uno de los extractos proteicos a comparar, junto con el estándar interno, compuesto por la mezcla de todos ellos, es marcado con un fluoróforo de distintas propiedades espectrales. Los extractos se mezclan y analizan en el mismo gel 2D, cuya lectura en un escáner de fluorescencia variable genera las imágenes que revelan diferencias entre niveles de expresión proteica.

poliacrilamida en presencia de SDS (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) mediante la cual las proteínas son separadas según su masa molecular (MM), obteniéndose así un mapa bidimensional de especies proteicas (O'Farrell, 1975) que pueden ser reveladas empleando un agente de tinción apropiado (*e.g.* AgNO_3). El análisis comparativo de los mapas de proteínas correspondientes a distintos

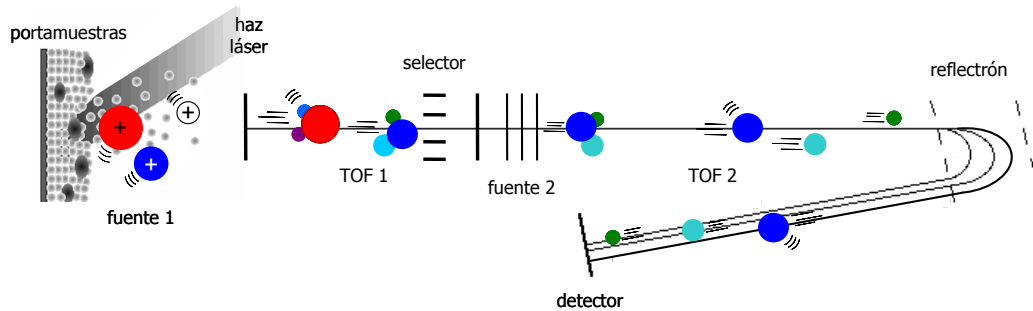


Figura 1.7. Representación esquemática de un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF. En la fuente 1, los analitos son desorbidos e ionizados por la acción indirecta del láser. Los iones recorren a continuación un analizador de tiempo de vuelo (TOF 1 + TOF 2) con reflectrón para obtener el correspondiente espectro de masas. Mediante un selector de iones pueden aislarse secuencialmente iones precursores concretos, junto con sus fragmentos originados por descomposición metaestable, los cuales experimentan una segunda aceleración en la fuente 2 y son separados en el reflectrón para obtener su espectro de fragmentación. MALDI, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; TOF, tiempo de vuelo; TOF/TOF, tiempo de vuelo en tándem.

estados de un sistema pone de manifiesto cambios en los niveles de expresión proteica, así como la presencia de isoformas y modificaciones postraduccionales (*post-translational modifications*, PTMs). Sin embargo, el reducido intervalo dinámico de trabajo y la escasa reproducibilidad de las que adolece la 2-DE clásica en combinación con la tinción con AgNO_3 aun cuando se empleen gradientes de pH inmovilizados (*immobilized pH gradients*, IPGs) (Bjellqvist *et al.*, 1982), hacen del análisis comparativo de imágenes un proceso lento y laborioso, dificultando enormemente su adaptación al trabajo cuantitativo. Recientemente, la tecnología de electroforesis diferencial 2D-DIGE (Unlü *et al.*, 1997) ha logrado subsanar en gran medida estas dificultades recurriendo al marcaje con sondas fluorescentes de los extractos proteicos y a su análisis multiplexado en un único gel a partir del cual pueden inferirse diferencias entre niveles de expresión proteica con una determinada significación estadística (Karp *et al.*, 2004) (Fig. 1.6). El marcaje con agentes fluorescentes posee una linealidad analítica de 5 órdenes de magnitud y su límite de detección se sitúa por debajo del nanogramo de proteína (Minden *et al.*, 2009).

1.4.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

El desarrollo en los años 80 de técnicas de ionización suaves como la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI) (Karas y Hillenkamp, 1988) y la ionización mediante electronebulización (*electrospray ionization*, ESI) (Fenn *et al.*, 1989) extendió el campo de aplicación de la MS a moléculas termodinámicamente inestables y difícilmente volatilizables como proteínas y péptidos. En la ionización MALDI una sustancia matriz capaz de absorber radiación ultravioleta (UV) se deja cocrystalizar con la muestra (*e.g.* una mezcla de péptidos); al irradiar la mezcla con un láser

UV a alto vacío, la matriz sublima y arrastra a la fase gaseosa a los analitos intactos, los cuales se transforman en moléculas cargadas (iones) por intercambio de protones con la matriz (generalmente un ácido débil). Dichos iones son a continuación acelerados por un campo eléctrico antes de recorrer la región de deriva de un analizador de tiempo de vuelo (*time of flight*, TOF), en la que son separados en función de su masa, dado que los más livianos viajan hacia el detector a mayor velocidad que los de mayor masa. Tras la región de deriva, un reflectrón (espejo electrostático) permite compensar las pequeñas dispersiones de energía cinética asociadas a una determinada población de iones (Fig. 1.7). Mediante la adecuada calibración (Cotter, 1992), los tiempos de vuelo de los iones son transformados en valores de relación masa-carga (m/z), a partir de los cuales pueden calcularse las masas moleculares de los analitos con gran precisión, bajo límite de sensibilidad (al nivel del fmol) y elevada capacidad de proceso. Además, la utilización de dos analizadores TOF dispuestos en tándem (TOF/TOF) permite obtener los patrones de fragmentación generados por descomposición inducida por láser de los iones moleculares metaestables producidos en la fuente de ionización (Medzihradsky *et al.*, 2000; Suckau *et al.*, 2003). (Fig. 1.7).

1.4.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía líquida de alto rendimiento (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) posibilita la separación de proteínas y péptidos en función de su afinidad por una fase estacionaria contenida en una conducción capilar cuando se fuerza el paso de una fase móvil a través del sistema. Para la separación de péptidos o proteínas mediante HPLC se emplean diversas fases estacionarias (*e.g.* inversa, de intercambio iónico y de afinidad) que han mostrado una gran capacidad de separación de mezclas complejas de péptidos y proteínas (Josic y Clifton, 2007).

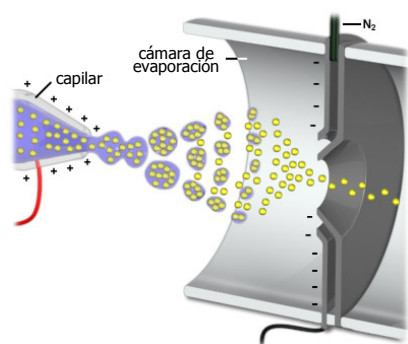


Figura 1.8. Ionización mediante electrospray (ESI) del líquido que fluye a través de un capilar estrecho.

Por su óptimo acoplamiento en línea a la separación mediante HPLC, ESI constituye el método de ionización más comúnmente empleado en los abordajes basados en LC-MS. ESI se basa en el hecho de que al aplicar un alto voltaje a un líquido que fluye a través de un capilar estrecho se produce un aerosol compuesto por pequeñas gotas cargadas de diámetro inferior a 10 μm (Fig. 1.8). Las microgotas se evaporan rápidamente hasta que su densidad superficial de carga alcanza el límite de Rayleigh, momento en el que explotan para formar

microgotas de menor tamaño. Este proceso se repite hasta que los analitos ionizables presentes en la disolución abandonan las microgotas. El proceso de desolvatación continúa en la interfase con el espectrómetro de masas (Whitehouse *et al.*, 1985), de modo que los analitos se convierten en iones múltiplemente cargados fáciles de fragmentar con energías de activación moderadas, generando espectros de fragmentación muy ricos (Fenn *et al.*, 1989). El acoplamiento de fuentes ESI miniaturizadas a micro o nanodispositivos de HPLC con columnas de < 100 µm de diámetro permite analizar con gran sensibilidad digeridos enzimáticos de mezclas complejas de proteínas (Yates *et al.*, 2009).

1.4.4. Identificación de proteínas mediante búsqueda en bases de datos

La utilización conjunta de 2D-DIGE y MALDI-MS constituye una robusta plataforma analítica para el estudio exhaustivo de patrones de expresión proteica y la identificación inequívoca de las proteínas implicadas. Las manchas de proteína de interés se visualizan mediante una tinción adecuada (*e.g.* AgNO₃), se tratan con agentes reductores y alquilantes para impedir la formación de puentes disulfuro entre cisteínas y se incuban *in situ* (en gel) con proteasas, siendo la tripsina una de las más comúnmente empleadas por su gran especificidad y eficiencia. Los péptidos proteolíticos resultantes son extraídos del gel y sus masas medidas mediante MALDI-MS para así obtener la denominada huella dactilar de masa peptídica (*peptide mass fingerprint*, PMF) (Henzel *et al.*, 1993; Pappin *et al.*, 1993); análogamente, la medida del espectro de fragmentación de dichos péptidos proporciona su huella dactilar de fragmentación peptídica (*peptide fragmentation fingerprint*, PFF). Distintos motores de búsqueda (Tabla 1.1) permiten confrontar las masas medidas experimentalmente con las masas teóricas provenientes de la digestión y fragmentación *in silico* de todas las secuencias aminoacídicas depositadas en las bases de datos de proteínas disponibles (Patterson, 1998). A continuación las proteínas de la bases de datos son ordenadas de acuerdo al número de masas de péptidos y fragmentos de los mismos que se ajustan a sus secuencias dentro de una determinada tolerancia en el error de masa y a otros criterios establecidos por el algoritmo de puntuación empleado (Grass *et al.*, 1999; Perkins *et al.*, 1999).

Tabla 1.1. Algunos motores de búsqueda de acceso público

Nombre	URL	Institución	Referencia
<i>Sequest</i>	http://www.thermo.com	Thermo Fischer Scientific	Eng <i>et al.</i> , 1994
<i>Mascot</i>	http://www.matrixscience.com	Matrix Science	Perkins <i>et al.</i> , 1999
<i>ProteinProspector</i>	http://prospector.ucsf.edu/	University of California	Clauser <i>et al.</i> , 1999
<i>ProFound</i>	http://prowl.rockefeller.edu/	The Rockefeller University	Zhang y Chait, 2000
<i>Phenyx</i>	http://www.phenyx-ms.com	GeneBio	Colinge <i>et al.</i> , 2003
<i>Aldente</i>	http://www.expasy.org/tools/aldente/	Swiss Institute of Bioinformatics	Tuloup <i>et al.</i> , 2003

1.4.5. Monitorización selectiva de reacciones

La monitorización selectiva de reacciones (*selected reaction monitoring*, SRM) constituye un novedoso método basado en MS que posibilita la cuantificación de péptidos de interés en mezclas complejas, permitiendo así la validación de resultados obtenidos en estudios de expresión proteica diferencial (Kitteringham *et al.*, 2009; Latterich *et al.*, 2008; Schiess *et al.*, 2009; Stahl-Zeng *et al.*, 2007). Se trata de una metodología de gran sensibilidad y selectividad, ya que el filtrado de los iones se lleva a cabo atendiendo a dos magnitudes independientes: la masa del ion precursor, al que se ha dado en denominar péptido proteotípico (Mallick *et al.*, 2007), y la masa de un determinado ion fragmento (denominado ion diagnóstico) proveniente de la fragmentación inducida de dicho ion precursor.

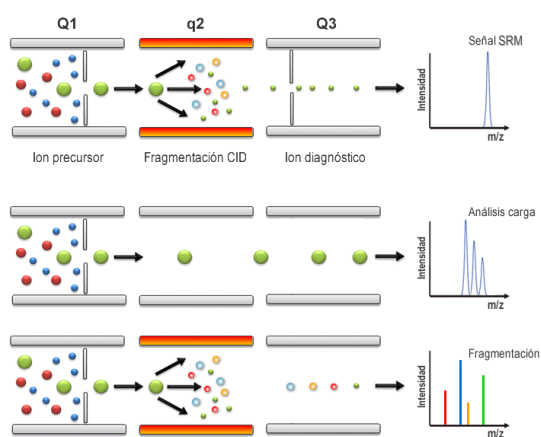


Figura 1.9. Experimento de SRM en un espectrómetro de masas híbrido con analizador de triple cuadrupolo y trampa iónica lineal. Panel superior: El cuadrupolo Q1 transmite sólo iones precursores (representados por círculos de distintos colores) con un determinado valor de m/z . A continuación se induce en q2 la fragmentación de los iones seleccionados en Q1, mientras que el cuadrupolo Q3 se sintoniza para la detección de un determinado ion fragmento (rectángulo rojo) proveniente del ion precursor de interés. Finalmente, los iones así seleccionados son analizados a alta resolución (panel medio) y fragmentados (panel inferior) en la trampa iónica lineal. CID, fragmentación inducida por colisión; m/z , relación masa-carga; SRM, monitorización selectiva de reacciones.

Los ensayos SRM suelen llevarse a cabo en espectrómetros de masas dotados de analizador de triple cuadrupolo, formado por tres cuadrupolos acoplados en tándem (Yost y Enke, 1978). En los equipos híbridos de última generación se sustituye el tercer cuadrupolo por una trampa iónica lineal, lo cual permite unir al filtrado específico de los iones de interés propio del ensayo SRM el análisis de masa a alta resolución y la eficiente fragmentación de dichos iones que posibilita la trampa iónica lineal. La Figura 1.9 muestra las etapas de las que consta un ensayo SRM aplicable a muestras biológicas, en el que el filtrado específico de iones se combina con un barrido a alta resolución, dirigido a medir la masa del ion filtrado con alta precisión y determinar su carga, seguido de la fragmentación inducida del ion para comprobar su secuencia aminoacídica.

1.5. ANTECEDENTES

1.5.1. Estudios genómicos en artrosis

Durante los últimos años diversos estudios epidemiológicos exhaustivos han puesto de manifiesto el importante componente genético de la artrosis (véase la revisión de Valdes y

Spector, 2010). En la búsqueda de los genes responsables de la susceptibilidad hacia la artrosis se han empleado tres tipos de abordajes: análisis de genes candidatos basados exclusivamente en el conocimiento biológico, rastreo sistemático de ligamiento y asociación a nivel de genoma completo y estudio de la expresión génica (Tabla 1.2).

1.5.1.1. Estudios de genes candidatos

Inicialmente estos estudios se centraron en genes que codifican proteínas estructurales de la MEC, incluyendo *COL2A1*, que codifica la cadena $\alpha 1$ del colágeno tipo II, los genes del colágeno tipo IX y XI, el gen de la proteína matricial oligomérica del cartílago y *AGC1*, que codifica agregano (Loughlin, 2001; Loughlin, 2002). De manera global, estos estudios no han logrado demostrar que las mutaciones comunes no sinónimas de genes que codifican proteínas estructurales de la MEC constituyan factores de riesgo para la artrosis primaria. Estudios posteriores encontraron asociaciones entre los genes *IL6*, que codifica la citocina inflamatoria IL-6 (Pola *et al.*, 2005) y *GDF5*, que codifica el factor 5 de crecimiento y diferenciación (Miyamoto *et al.*, 2007), y la artrosis de cadera, así como entre *IL10*, que codifica la citocina antiinflamatoria IL-10 (Fytili *et al.*, 2005) y la artrosis de rodilla.

1.5.1.2. Estudios de ligamiento y asociación de genoma completo

Se han realizado cinco estudios de ligamiento de genoma completo basados en pequeñas familias del Reino Unido (Chapman *et al.*, 2002; Forster *et al.*, 2004b; Loughlin *et al.*, 2002a, 2002b; Southam *et al.*, 2004), Finlandia (Leppävuori *et al.*, 1999), Islandia (Stefánsson *et al.*, 2003), EE.UU. (Demissie *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 2004) y Holanda (Meulenbelt *et al.*, 2007), los cuales han identificado algunos *loci* con cocientes de probabilidad (*odds ratio*, OR) de ligamiento relativamente altos. En el caso de los estudios islandés y estadounidense, la estratificación de la mano en sus distintas articulaciones proporciona evidencias más significativas de ligamiento, fenómeno que subraya el modo complejo y sutil en que actúa la susceptibilidad genética hacia la artrosis. Por otra parte, la estratificación por sexo contemplada en los estudios británico y estadounidense ha permitido la identificación de *loci* de especial relevancia en la aparición de artrosis en mujeres, corroborando los resultados de estudios epidemiológicos que sugerían un papel diferencial de los genes en artrosis en función del sexo (Loughlin, 2001, 2002). Posteriores análisis de asociación han revelado genes asociados que codifican proteínas como citocinas proinflamatorias y sus receptores, componentes de la MEC del cartílago y especies implicadas en la condrogénesis (Tabla 1.2).

Por su parte los estudios de asociación de genoma completo han puesto de manifiesto una interesante asociación con *ASPN*, que codifica asporina (Kizawa *et al.*, 2005),

Tabla 1.2. Genes con posible asociación con artrosis

Gen	Proteína	Función	Referencias
AACT	α_1 -antiquimotripsina	Inhibición de serín proteasa implicada en la degradación de proteoglicanos de la MEC	Valdes <i>et al.</i> , 2006
ADAM12	Metalopeptidasa ADAM dominio 12	Formación de osteoclastos y fusión celular	Valdes <i>et al.</i> , 2004; Valdes <i>et al.</i> , 2006
ASPN	Asporina	Inhibición del anabolismo del cartilago mediante la unión a TGF- β	Kizawa <i>et al.</i> , 2005
AQP1	Acuaporina 1	Canal molecular de agua	Geyer <i>et al.</i> , 2009
BMP2	Proteína morfogénica del hueso 2	Factor de crecimiento implicado en condrogénesis y osteogénesis	Valdes <i>et al.</i> , 2004; Valdes <i>et al.</i> , 2006
BMP5	Proteína morfogénica del hueso 5	Regulación del desarrollo de los condrocitos articulares	Southam <i>et al.</i> , 2004
BTG2	Miembro 2 familia BTG	Posible papel en la estabilización del fenotipo. Inhibición de la actividad proliferativa	Aigner <i>et al.</i> , 2006
CALM1	Calmodulina 1	Interacción con proteínas implicadas en transducción de señales	Mototani <i>et al.</i> , 2005
CDH11	Caderina 11	Regulación dependiente de calcio de la adhesión intercelular	Karlsson <i>et al.</i> , 2010
CHST11	Sulfotransferasa carbohidrato 11	Cataliza transferencia de sulfato a condroitín	Karlsson <i>et al.</i> , 2010
CILP	Proteína de la zona intermedia del cartilago	Inhibición de la inducción mediada por TGF- β 1 de genes de la MEC	Valdes <i>et al.</i> , 2004; Valdes <i>et al.</i> , 2006
CLEC3A	Familia 3 dominio lectina tipo C, miembro B	Estimula adhesión celular a ligandos de integrina en la MEC	Karlsson <i>et al.</i> , 2010
COL13A1	Colágeno, tipo XIII, alfa 1	Posible papel en tejido conectivo	Karlsson <i>et al.</i> , 2010
COL14A1	Colágeno, tipo XIV, alfa 1	Inducción de quiescencia y diferenciación en fibroblastos y preadipocitos	Karlsson <i>et al.</i> , 2010
COL15A1	Colágeno, tipo XV, alfa 1	Adherencia de la membrana basal al estroma subyacente	Karlsson <i>et al.</i> , 2010
COL2A1	Colágeno, tipo II, alfa 1	Principal componente estructural del cartilago	Valdes <i>et al.</i> , 2006
COL8A2	Colágeno, tipo VIII, alfa 2	Principal componente de la membrana basal del endotelio corneal	Karlsson <i>et al.</i> , 2010
COMP	Proteína oligomérica de la matriz del cartilago	Macromolécula de la matriz del cartilago	Valdes <i>et al.</i> , 2006
COX2	Ciclooxigenasa	Modulación de la degradación de proteoglicanos de la MEC	Valdes <i>et al.</i> , 2004; Valdes <i>et al.</i> , 2006
DIO2	Yodotironina desyodasa tipo II	Regulación de los niveles intracelulares de hormonas tiroideas activas	Meulenbelt <i>et al.</i> , 2008
DNER	Tipo delta/notch con dominio EGF	Regulación de la proliferación celular	Geyer <i>et al.</i> , 2009
ESR1	Receptor de estrógeno α	Modulación de la degradación de proteoglicanos y de la expresión de MMPs	Valdes <i>et al.</i> , 2004; Valdes <i>et al.</i> , 2006
FRZB	Proteína secretada sFRP3	Antagonismo de Wnt y modulación de la maduración condrocitaria	Loughlin <i>et al.</i> , 2004
GDF5	Factor 5 de crecimiento y diferenciación	Regulación de crecimiento y diferenciación	Miyamoto <i>et al.</i> , 2007
GNPMB	Glicoproteína (transmembrana) nmb	Posible papel en retraso del crecimiento y reducción del potencial metastático	Karlsson <i>et al.</i> , 2010
GPX3	Glutation peroxidasa 3	Defensa oxidativa celular	Aigner <i>et al.</i> , 2006
IL1	Familia interleuquina 1	Regulación de la expresión génica de MMPs in sinovio y condrocitos	Meulenbelt <i>et al.</i> , 2004
IL10	Interleuquina 10	Inhibición de la síntesis de IL-1	Fytii <i>et al.</i> , 2005
IL4R	Receptor α de interleuquina 4	Posible papel en la respuesta de condrocitos articulares a estímulos mecánicos	Forster <i>et al.</i> , 2004a
IL6	Interleuquina 6	Degradación del cartilago e inducción de ILRa	Pola <i>et al.</i> , 2005
LRCH1	Proteína 1 con dominio CH y LRC	Desconocida	Spector <i>et al.</i> , 2006
LRP5	Proteína relacionada con el receptor de LDL5	Implicación en las vías canónicas de señalización celular de Wnt	Smith <i>et al.</i> , 2005
MATN3	Matrilina 3	Macromolécula de la MEC	Stefánsson <i>et al.</i> , 2003
MSX1	Msh homeobox 1	Represión de la transcripción durante la embriogénesis	Karlsson <i>et al.</i> , 2010
OPG	Osteoprotegerina	Regulación de la osteoclastogénesis	Valdes <i>et al.</i> , 2004; Valdes <i>et al.</i> , 2006
RHOB	Miembro B familia genes homólogos de Ras	Supresión de tumores	Mahr <i>et al.</i> , 2006
SOD2	Superóxido dismutasa 2	Defensa oxidativa celular	Aigner <i>et al.</i> , 2006
TNA	Tetranectina	Mediación en la degradación de la MEC	Valdes <i>et al.</i> , 2004; Valdes <i>et al.</i> , 2006
TOB1	Transductor de ERBB2, 1	Posible papel en la estabilización del fenotipo. Inhibición de la actividad proliferativa	Aigner <i>et al.</i> , 2006
TXNDC3	Dominio de tiorredoxina 3	Participación en diversos procesos celulares mediante reacciones redox	Mahr <i>et al.</i> , 2007
VDR	Receptor de vitamina D	Mediación en los efectos de la vitamina D	Valdes <i>et al.</i> , 2006
WISP1	Proteína 1 de la ruta de señalización inducible por WNT 1	Represión de la actividad inhibitoria de decorina y biglicano en la proliferación tumoral	Geyer <i>et al.</i> , 2009

ARNm, ácido ribonucleico mensajero; IL, interleuquina; ILRa, antagonista del receptor de interleuquina; MEC, matriz extracelular; MMP, metaloproteasa de matriz; TGF, factor de crecimiento transformante.

y *CALM1*, que codifica calmodulina 1 (Mototani *et al.*, 2005). La asporina, perteneciente a la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (*small leucine-rich proteoglycans*, SLRP), posee la capacidad de unirse a otros componentes estructurales de la MEC como el colágeno y a factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (*transforming growth factor β* , TGF- β), mientras que la calmodulina es una proteína intracelular que se une reversiblemente a Ca^{2+} e interacciona con proteínas celulares. Los estudios funcionales (Kizawa *et al.*, 2005) demostraron que la asporina regula de forma indirecta la expresión de

agrecano y colágeno tipo II, los principales componentes estructurales de la MEC del cartílago, ya que inhibe la señalización de TGF- β , que induce la transcripción de los genes *AGC1* y *COLA2A1*, los cuales codifican dichos componentes; respecto a la calmodulina 1, se encontró que estimula la expresión de *AGC1* y *COLA2A1* (Mototani *et al.*, 2005). Otro estudio (Spector *et al.*, 2006) logró establecer una asociación entre una variante genética de *LRCH1*, un gen cuya función es desconocida, y la artrosis radiográfica de rodilla en individuos de raza caucásica.

1.5.1.3. Estudios de la expresión génica

La identificación de genes cuya expresión está alterada en el tejido enfermo en comparación con el normal propone genes implicados en el desarrollo o la progresión de la enfermedad que posteriormente pueden ser testados en ensayos de asociación (Tabla 1.2). Mediante este abordaje Valdes *et al.* (2004) encontraron 54 genes con distinto nivel de expresión en tejido artrósico. El posterior genotipado de 26 SNPs en una cohorte de 749 mujeres, de las cuales a 280 se les había diagnosticado artrosis de rodilla con criterios radiográficos, arrojó cuatro genes asociados con la prevalencia de artrosis y cuatro adicionales con la progresión, mientras que sólo *ADAM12*, que codifica una metaloproteasa, mostró asociación con prevalencia y progresión. Más tarde, Valdes *et al.* (2006), aplicando un abordaje semejante en una cohorte de pacientes a los que se les había diagnosticado artrosis de rodilla de acuerdo con criterios no sólo radiográficos sino también clínicos, demostraron que la mayoría de estos genes asociados subclínicamente mostraban asimismo asociación con el riesgo de artrosis clínica de rodilla.

Aigner *et al.* (2006) estudiaron la expresión génica diferencial en muestras de cartílago de pacientes con artrosis empleando un microarray de ADNc con *ca.* 4.000 genes. Estos autores encontraron sobreexpresión de diversos genes relacionados con procesos catabólicos y anabólicos de la MEC e, inesperadamente, dado el estrés oxidativo al que están sometidos los condrocitos del tejido artrósico, una notable regulación a la baja de importantes genes relacionados con la defensa oxidativa como *GPX3* y *SOD2*, que codifican glutatión peroxidasa 3 y superóxido dismutasa 2 respectivamente. Este resultado indica que el estrés oxidativo prolongado constituye uno de los principales mecanismos patogénicos de la artrosis. También se encontró disminuida la expresión de *TOB1* y *BTG2*, miembros de la familia *btg/tob*, posiblemente implicada en la estabilización del fenotipo celular y en la inhibición de la actividad proliferativa, procesos ambos invertidos en el condrocito artrósico.

Mahr *et al.* (2006) encontraron 26 genes diferencialmente expresados en pacientes con artrosis de rodilla en comparación con los individuos control. Los autores confirmaron la

asociación con artrosis de los genes *RHCB*, que juega un papel en la supresión de tumores, y *TXNDC3*, que participa en diversos procesos celulares mediante reacciones redox. Investigando la expresión génica zonal del cartílago artrósico, Fukui *et al.* (2008) descubrieron la inducción de genes relacionados con hueso tanto en la zona superficial como en zonas profundas, así como la sobreexpresión de genes codificadores de proteinasas sólo en la zona superficial.

Boeuf *et al.* (2008) emplearon un microarray con *ca.* 30.000 fragmentos de ADNc para estudiar la expresión génica diferencial entre MSCs y cartílago de pacientes con artrosis. El análisis de la expresión génica durante la diferenciación *in vitro* de las MSCs y durante la desdiferenciación de los condrocitos expandidos reveló *SERPINA1*, un miembro de la superfamilia de inhibidores de serín proteasas, como gen marcador de la diferenciación de células progenitoras en condrocitos funcionales. Geyer *et al.* (2009) compararon la expresión génica en áreas articulares dañadas e intactas provenientes de la misma articulación en pacientes con artrosis de rodilla. Los autores encontraron un conjunto de genes sobreexpresados en el cartílago afectado. Comparando biopsias de cartílago de pacientes con artrosis y donantes sanos Karlsson *et al.* (2010) encontraron expresión diferencial de genes relacionados con la formación de hueso y el colágeno.

1.5.2. Estudios proteómicos en artrosis

La dificultad a la hora de obtener muestras de tejido artrósico, junto con los problemas inherentes a muestras como el líquido sinovial y el suero (*i.e.* el enmascaramiento de las señales de proteínas minoritarias frente a las de un pequeño grupo de especies muy abundantes) han limitado el número de trabajos que utilizan herramientas proteómicas en el contexto de la artrosis. Los estudios se han centrado en tres tipos de muestras provenientes de individuos aquejados de artrosis: fragmentos de cartílago articular obtenidos en intervenciones quirúrgicas de sustitución articular, cultivos de condrocitos y fluidos biológicos como líquido sinovial y suero (Tabla 1.3).

1.5.2.1. Estudios del cartílago articular

Los primeros trabajos en este campo se centraron en la optimización de la preparación de la muestra a fin de describir el proteoma del cartílago artrósico mediante 2-DE y MS. Hermansson *et al.* (2004) encontraron que las proteínas secretadas en los explantes de cartílago se separaban mal en la primera dimensión (IEF) debido a la presencia de proteoglicanos, cargados negativamente, especialmente agregano. La precipitación selectiva de los proteoglicanos con cloruro de cetilpiridinio posibilitó la obtención de geles 2D de

Tabla 1.3. Estudios proteómicos en artrosis

Muestras	Técnicas	Principales hallazgos	Referencia
Cartilago articular	2-DE, LC-MS	Importante aumento de la síntesis de colágeno de tipo II	Hermansson <i>et al.</i> (2004)
Cartilago articular	2-DE, MS	Proteínas abundantes del líquido sinovial	Vincourt <i>et al.</i> (2006)
Cartilago articular	SDS-PAGE, LC-MS	Proteínas relacionadas con organización de MEC, transducción de señal y comunicación	Garcia <i>et al.</i> (2006)
Cartilago articular	LC-MS	Productos de degradación <i>in vitro</i> por metaloproteasas	Zhen <i>et al.</i> (2008)
Cartilago articular (ratón)	2D-DIGE, LC-MS, microarray de ADN	Marcadores de la degradación <i>in vitro</i> por IL-1 α y ácido retinoico todo-trans	Wilson <i>et al.</i> (2008)
Cartilago articular	2-DE, LC-MS	Proteínas relacionadas con glicólisis, señalización, procesos redox y MEC	Guo <i>et al.</i> (2008)
Cartilago articular, tumor cartilaginoso	2-DE, MS, Western blot, PCR	Sobreexpresión de matrilina-3 en cartilago artrósico podría contribuir a su degradación	Vincourt <i>et al.</i> (2008)
Condrocitos en cultivo	2-DE, MS	Descripción del proteoma de condrocitos articulares humanos normales	Ruiz-Romero <i>et al.</i> (2005)
Condrocitos en cultivo	2-DE, MS	Descripción del subproteoma mitocondrial de condrocitos articulares humanos normales	Ruiz-Romero <i>et al.</i> (2006)
Condrocitos en cultivo	2-DE, MS	Proteínas implicadas en metabolismo, estructura y transporte	Ruiz-Romero <i>et al.</i> (2008b)
Condrocitos en cultivo	2-DE, LC-MS, Western blot	Importante alteración del citoesqueleto de vimentina en condrocitos artrósicos	Lambrecht <i>et al.</i> (2007)
Condrocitos en cultivo	2D-DIGE, MS, Western blot, PCR	Manganeso superóxido dismutasa y desequilibrio redox en artrosis	Ruiz-Romero <i>et al.</i> (2008)
Condrocitos en cultivo	Western blot	Regulación diferencial del ciclo apoptótico de condrocitos humanos por TNF- α e IL-1 β	López-Armada <i>et al.</i> (2006)
Condrocitos en cultivo	Microarray de anticuerpos	Secreción de citocinas y quimocinas inducida por IL-1 y TNF	De Ceuninck <i>et al.</i> (2004)
Condrocitos en cultivo	2-DE, LC-MS	Secreción de proteínas tras la estimulación con IL-1 y oncostatina M	Catterall <i>et al.</i> (2006)
Líquido sinovial	2-DE	2-DE como método de despistaje	Yamagiwa <i>et al.</i> (2003)
Líquido sinovial	SDS-PAGE, LC-MS	Proteínas abundantes diferenciales	Gobezie <i>et al.</i> (2007)
Líquido sinovial	LC-MS	Péptidos provenientes del procesamiento de proteínas previamente asociadas a artrosis	Kamphorst <i>et al.</i> (2007)
Líquido sinovial	ELISA, LC-MS	Mieloperoxidasa y péptidos clorados como marcadores diagnósticos de artrosis temprana	Steinbeck <i>et al.</i> (2007)
Suero	SDS-PAGE, MS Western blot	Autoanticuerpo frente a triosfosfato isomerasa como potencial marcador diagnóstico	Xiang <i>et al.</i> (2004)
Suero	2-DE, MS, Western blot	Fibulina-4 como autoantígeno específico de artrosis	Xiang <i>et al.</i> (2006)
Orina	LC-MS	Cuantificación neoepitopo de colágeno II	Li <i>et al.</i> (2007)
Orina	LC-MS	Cuantificación neoepitopo de colágeno II	Nemirovskiy <i>et al.</i> (2007)

2D-DIGE, electroforesis diferencial en geles bidimensionales; 2-DE, electroforesis bidimensional en gel; ELISA, ensayo inmunoenzimático; IL: interleuquina; LC-MS, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas; MS, espectrometría de masas; MEC, matriz extracelular; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; SDS-PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS; TNF, factor de necrosis tumoral.

buena calidad cuyo análisis puso de manifiesto la sobreexpresión de colágeno de tipo II en el cartilago artrósico (Hermansson *et al.*, 2004). Empleando un abordaje análogo, Vincourt *et al.* (2006) encontraron fundamentalmente proteínas mayoritarias del líquido sinovial, albúmina y proteínas del complemento. Garcia *et al.* (2006) recurrieron al análisis mediante LC-MS de digeridos trípticos de extractos proteicos de cartilago artrósico separados mediante SDS-PAGE. De esta forma se identificó un elevado número de proteínas, la mayoría implicadas en eventos como la organización de la MEC (35%), la transducción de señales y comunicación celular (14%), la respuesta inmune (11%) o el metabolismo y la producción de energía (11%).

El efecto degradante de las MMPs en el cartilago articular ha sido estudiado *in vitro* mediante la digestión de muestras de cartilago articular con diversas MMPs cuya sobreexpresión en el cartilago artrósico ya había sido descrita (Zhen *et al.*, 2008). El análisis de los sobrenadantes resultantes mediante LC-MS reveló sitios de rotura de proteínas del cartilago cuyos productos de digestión podrían servir como marcadores de la degradación del tejido. El proceso de degradación del cartilago fue estudiado también *in vitro* por Wilson *et al.* (2008) en tejido de ratón. El análisis mediante 2D-DIGE, LC-MS y microarrays de ADN de los cambios de expresión en explantes del tejido tratados con IL-1 α y ácido retinoico todo-trans reveló posibles nuevos marcadores de la degradación del cartilago como la gelsolina.

Otros autores han optado por la comparación con perfiles proteicos de muestras de cartílago normal. Empleando 2-DE y LC-MS, Guo *et al.* (2008) encontraron 14 proteínas asociadas a artrosis relacionadas con glicólisis y producción de energía, señalización, procesos redox, y organización de la MEC. Por otra parte, el análisis comparativo de muestras de cartílago artrósico y tumor cartilaginoso mediante 2-DE y MS puso de manifiesto la fuerte sobreexpresión de matrilina-3, un componente de la MEC previamente asociado a artrosis (Stefánsson *et al.*, 2003), en ambos tejidos (Vincourt *et al.*, 2008). Los estudios funcionales demostraron que SOX9, un factor de transcripción que regula la condrogénesis, está modulado por matrilina-3, de manera que esta proteína podría estar implicada en el control del fenotipo condrocitario responsable de la regulación fina de la homeostasis en el cartílago.

1.5.2.2. Estudios de condrocitos en cultivo

Pueden obtenerse monocapas de condrocitos mediante digestión de fragmentos de cartílago con colagenasa o empleando un entorno tridimensional para evitar su desdiferenciación en sinoviocitos fibroblásticos. El análisis mediante 2-DE y MALDI-MS de este tipo de muestras permitió una primera descripción del proteoma de condrocitos articulares humanos normales (Ruiz-Romero *et al.*, 2005), así como del correspondiente subproteoma mitocondrial (Ruiz-Romero *et al.*, 2006). Aplicado al estudio de la expresión diferencial en cultivos de condrocitos provenientes de tejido artrósico, este abordaje puso de manifiesto que las proteínas asociadas a la enfermedad estaban implicadas fundamentalmente en el metabolismo celular (33%), la estructura (21%) y el transporte de proteínas (21%) (Ruiz-Romero *et al.*, 2008b). Empleando este tipo de muestras, Lambrecht *et al.* (2007) describieron mediante 2-DE y LC-MS importantes alteraciones en el citoesqueleto de vimentina de los condrocitos artrósicos. Además, el análisis comparativo mediante 2D-DIGE y MS de la fracción mitocondrial de condrocitos provenientes de cartílago artrósico reveló una importante disminución de manganeso superóxido dismutasa, la principal proteína antioxidante mitocondrial, en la capa superficial del cartílago artrósico (Ruiz-Romero *et al.*, 2008a), subrayando el papel del desequilibrio redox en la artrosis.

Los cultivos de condrocitos se han empleado también para investigar el papel de ciertas moléculas en la degradación del cartílago. Así, López-Armada *et al.* (2006) estudiaron la influencia de TNF- α e IL-1 β en la muerte celular condrocitaria, encontrando que dichas moléculas regulan de forma diferencial el ciclo apoptótico en condrocitos artrósicos. De Ceuninck *et al.* (2004) emplearon microarrays de anticuerpos para evaluar el efecto de la estimulación de condrocitos con las moléculas proinflamatorias IL-1 y TNF- α , hallando que

estas células disponen de un arsenal proinflamatorio de factores de crecimiento y angiogénesis, quimiocinas y citocinas que podría jugar un papel en la progresión de la artrosis hacia la inflamación. Por otra parte, el análisis mediante fraccionamiento por intercambio aniónico y 2-DE del sobrenadante de células estimuladas mediante IL-1 u oncostatina M mostró la secreción de fragmentos peptídicos provenientes del procesamiento de proteínas como MMP-1, MMP-3, YKL-40 y ciclofilina (Catterall *et al.*, 2006).

1.5.2.3. Estudios en líquido sinovial, suero y orina

El líquido sinovial está en contacto con los principales tejidos afectados por la artrosis, el cartílago y el sinovio, razón por la cual se han empleado tanto líquido sinovial como suero en estudios proteómicos dirigidos a la identificación de biomarcadores clínicos de progresión, respuesta terapéutica y pronóstico. Desde que Yamagiwa *et al.* (2003) propusieran tentativamente el empleo de la 2-DE como método de despistaje de la artrosis, algunos estudios han tenido por objeto identificar péptidos o proteínas marcadores de artrosis en líquido sinovial. Gobezie *et al.* (2007) identificaron proteínas mayoritarias diferenciales en líquido sinovial obtenido de pacientes de artrosis mediante SDS-PAGE y LC-MS. Kamphorst *et al.* (2007) describieron el perfil de péptidos endógenos del líquido sinovial de un paciente afectado de artrosis empleando LC-MS. Los péptidos identificados resultaron ser productos de rotura de proteínas cuya asociación con artrosis ya era conocida como colágeno II, tubulina y vimentina. En otro trabajo (Steinbeck *et al.*, 2007), el análisis de líquido sinovial mediante ensayo inmunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) y LC-MS reveló una asociación entre artrosis temprana, mieloperoxidasa y péptidos clorados generados por esta enzima, sugiriéndose que su inactivación podría tener beneficios terapéuticos.

Otros trabajos han investigado la autoinmunidad frente a artrosis en suero. Xiang *et al.* (2004) resolvieron mediante 2-DE sueros de pacientes afectados de artrosis y artritis reumatoide, detectaron las especies antigénicas mediante Western blot y las identificaron mediante MALDI-MS. De esta forma propusieron el anticuerpo frente a la enzima glicolítica triosafosfato isomerasa como marcador diagnóstico de artrosis. Un abordaje similar permitió más tarde (Xiang *et al.*, 2006) identificar una proteína de la MEC, fibulina-4, como autoantígeno específico de artrosis. Finalmente, dos trabajos (Li *et al.*, 2007; Nemirovskiy *et al.*, 2007) han recurrido a la orina, un fluido biológico fácil de obtener por procedimientos no invasivos, en busca de marcadores de artrosis mediante LC-MS. Los autores analizaron neoepítotos del sitio de corte de la colagenasa, marcadores establecidos de la degradación del cartílago.

2. Objetivos

Debido a la complejidad de la artrosis nuestro conocimiento de los genes y proteínas implicados en su patogénesis es todavía muy limitado. Estudios previos han puesto de manifiesto que los condrocitos, los únicos componentes celulares del cartílago articular, y en especial las MSCs, células progenitoras con capacidad de diferenciarse a diversos tejidos conectivos incluido el cartílago, podrían jugar un papel relevante en la fisiopatología de la artrosis y en las terapias celulares de regeneración de los tejidos dañados por la artrosis. Por ello, este trabajo de Tesis Doctoral se ha dirigido hacia la búsqueda de posibles alteraciones moleculares en estas células que pudieran tener relevancia en la fisiopatología de la artrosis, planteando este estudio desde un punto de vista genómico y proteómico con los objetivos que se enumeran a continuación:

1. Identificación de genes expresados diferencialmente en MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis en comparación con pacientes control no artrósicos con fractura de cadera mediante microarrays de ADN.
2. Identificación de proteínas con diferencias en su patrón de expresión en MSCs provenientes de médula ósea de pacientes control con artrosis en comparación con pacientes control no artrósicos con fractura de cadera mediante 2D-DIGE y MS.
3. Identificación de proteínas con diferencias en su patrón de expresión en condrocitos provenientes del cartílago articular de pacientes con artrosis en comparación con pacientes control no artrósicos con fractura de cadera mediante 2D-DIGE y MS.
4. Búsqueda de funciones y procesos biológicos alterados en MSCs y condrocitos de pacientes con artrosis.

3. Métodos

3.1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES

La selección de pacientes se llevó a cabo en el Servicio de Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Se informó a la totalidad de los pacientes antes de solicitar su consentimiento al estudio, el cual fue aprobado por el comité ético local.

Se incluyeron un total de 22 individuos afectados de artrosis de rodilla diagnosticados según los criterios del American College of Rheumatology (Hochberg *et al.*, 1995b) (edad media 76,7 años, intervalo 52-89) y 21 individuos control con fractura de cadera sin artrosis (edad media 73,3 años, intervalo 47-90). Los sujetos control se eligieron de acuerdo con los siguientes criterios: i) ausencia de signos radiográficos de artrosis; ii) ausencia de diagnóstico de osteoporosis en el historial clínico; iii) ausencia de tratamientos relacionados con la prevención o inducción de osteoporosis; y iv) fractura de cadera originada por un traumatismo lo suficientemente fuerte para provocar dicha fractura en una población de avanzada edad. Además, tras la cirugía se realizó una densitometría ósea mediante DEXA (*dual-energy X-ray absorptiometry*, absorciometría de rayos X de doble energía) en un densitómetro QDR-4500C (Hologic, Waltham, Madison, EE.UU.) a 12 de los sujetos control que arrojó una puntuación T > -2,5 DE.

Los especímenes se obtuvieron como aspirados frescos de médula ósea (5-10 ml) del canal femoral y muestras de cartílago (20-40 mg) del cóndilo femoral de los pacientes de artrosis al practicárseles artroplastia de sustitución total de rodilla, así como de los individuos control al ser sometidos a cirugía de sustitución articular de cadera para el tratamiento de una fractura subcapital.

3.2. AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN CELULAR

3.2.1. Células madre mesenquimales

El aislamiento y cultivo de MSCs se llevó a cabo en el Servicio de Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid según se ha descrito previamente (Pittenger *et al.*, 1999). De forma breve, se lavaron los aspirados con medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) suplementado con antibióticos (DMEM) más suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, EE.UU.). La fracción enriquecida en células se extendió cuidadosamente sobre una solución Percoll al 70% (v/v) (Sigma-Aldrich) y se centrifugó a 500 g durante 15 min a 23 °C. Se recogió la fracción celular de baja densidad, se lavó con DMEM más SFB al 10% (v/v) y se sembró en placa de cultivo de 100 mm (BD Biosciencias, San José, California, EE.UU.). Tras el cultivo primario, se separaron las colonias adherentes mediante tratamiento con tripsina 0,25% (p/v) (Sigma-Aldrich) más EDTA 1 mM (Sigma-Aldrich) durante 5 min a 37 °C y a continuación se

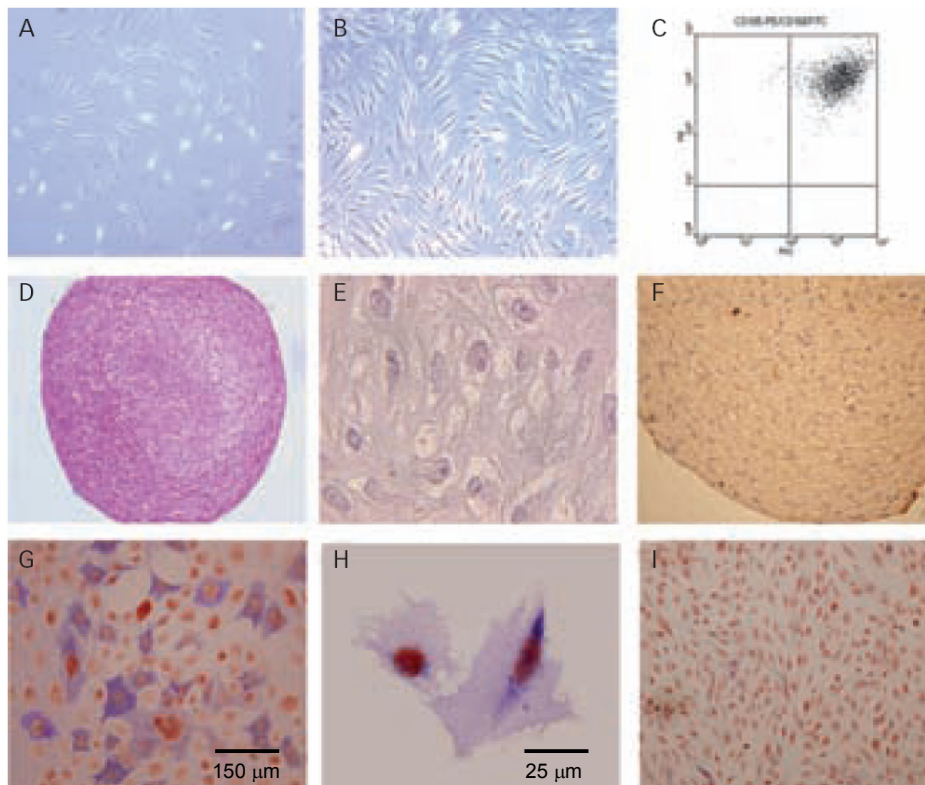


Figura 3.1. Caracterización fenotípica y del potencial diferenciador de las MSCs de médula ósea. (A) Colonias individuales de células formadas tras el cultivo primario. (B) Monocapa de células obtenida tras el subcultivo. (C) Citometría de flujo con anticuerpos anti-CD105 y anti-CD166 que reveló la homogeneidad de las preparaciones celulares tras el cultivo primario. (D) La tinción con safranina O puso de manifiesto la condrogénesis. (E) Formación de condrocitos tras el cultivo en medio condrogénico. (F) Inmunohistoquímica para colágeno tipo II que reveló la condrogénesis. (G) y (H) La osteogénesis se confirmó por el aumento de la actividad fosfatasa alcalina observado en las células cultivadas con complementos osteogénicos en comparación con la de las células cultivadas en medio control (I)

subcultivaron a dilución 1:2. En los experimentos se emplearon las células confluentes (ca. $2 \cdot 10^6$) en el tercer pase.

Las MSCs se caracterizaron atendiendo a sus antígenos de superficie y potencial diferenciador (Fig. 3.1). Se comprobó inmuistoquímicamente la expresión de los marcadores de superficie celular CD90, CD105 y CD166 (Fig. 3.1 C), así como la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos CD14, CD34 y CD45. Así mismo, se comprobó la capacidad de diferenciación condrogénica de las MSCs cultivadas durante 21 días con complementos condrogénicos según lo descrito por Johnstone *et al.* (1998) mediante tinción con safranina O de los glicosaminoglicanos de la MEC (Fig. 3.1 D) e inmunohistoquímica para colágeno tipo II (Fig. 3.1 F). El potencial de diferenciación osteogénica de las MSCs se comprobó midiendo la actividad fosfatasa alcalina en MSCs cultivadas durante 12-16 días con complementos osteogénicos según lo descrito por Pittenger *et al.* (1999) (Fig. 3.1 G y H).

3.2.2. Condrocitos

Tras el lavado de las muestras de cartílago con PBS (Sigma-Aldrich), mediante un bisturí se practicaron cortes desde la superficie articular hasta el hueso subcondral a intervalos de 5 mm para obtener tiras que se fragmentaron en trozos de 1-3 mm³, los cuales se incubaron con tripsina 0,25% (p/v) más EDTA 1 mM durante 10 min a 37 °C. Tras eliminar la disolución de tripsina, se incubaron los fragmentos con un tampón de digestión compuesto por DMEM más SFB al 5% (v/v) y colagenasa clostridial tipo IV (Sigma-Aldrich) durante 12-16 h a 37 °C. A continuación, las células en suspensión fueron sedimentadas mediante centrifugación a 1000 g durante 10 min y lavadas con DMEM más SFB al 5% (v/v). Se recogieron las células y se sembraron a alta densidad ($4 \cdot 10^6$ células por frasco de cultivo de 175 cm², BD Biosciences) en DMEM más SFB al 10% (v/v). Las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% (v/v) de CO₂. Se utilizó el cultivo primario de condrocitos confluentes (*ca.* $2 \cdot 10^6$ células) a las 2-3 semanas. Se efectuaron dos cambios de medio por semana. El tipo celular se verificó mediante inmunohistoquímica para colágeno tipo II y la viabilidad celular se determinó mediante exclusión con azul de tripano (Sigma-Aldrich).

3.3. ANÁLISIS DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para el análisis diferencial de la expresión génica de MSCs entre pacientes con artrosis e individuos control se hibridó el ARNc marcado en microarrays 4 x 44K de genoma humano completo, experimento que se realizó en la Unidad de Genómica del CNIC. A continuación se llevó a cabo el análisis estadístico de las imágenes de los microarrays con el fin de descubrir genes cuya expresión se había alterado de manera significativa (Fig. 3.2), estudiar la abundancia de términos GO en dichos genes, el enriquecimiento de determinados conjuntos de genes y las posibles interacciones entre las correspondientes proteínas.

3.3.1. Preparación de extractos de ARN

Se extrajo ARN total a partir del lisado celular (15 mg) de MSCs de 16 pacientes con artrosis y 16 controles utilizando el kit RNA Isolation (Stratagene, Ámsterdam, Holanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con el fin de eliminar ADN genómico y otros contaminantes que podrían interferir en los posteriores procesos de hibridación y transcripción inversa, el ARN se purificó siguiendo el protocolo de limpieza del kit Absolutely RNA Miniprep (Stratagene). El ARN purificado se resuspendió en agua libre de RNAsas (Invitrogene, Carlsbad, California, EE.UU.) y se conservó a -70 °C hasta su uso. La integridad del ARN se valoró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-

borato-EDTA (Tris-borato 90 mM, pH 8,3; EDTA 2 mM), comprobando que aparecían nítidamente las bandas correspondientes a los ARNs ribosomales 28S y 18S en una relación 2:1 aproximadamente. La concentración de ARN se midió mediante espectroscopía de absorción UV-Vis en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania).

3.3.2. Amplificación, marcaje y purificación de ARN

La amplificación y marcaje de ARN extraído de ocho pacientes de artrosis y ocho controles se llevó a cabo según el protocolo de análisis de expresión génica en microarrays con un color de Agilent Technologies (Palo Alto, California, EE.UU.). Brevemente, se sintetizó ADNc a partir de 5 µg de ARN total empleando como cebador el oligonucleótido (dT)₂₄ con la secuencia promotora de la ARN polimerasa T7 en el extremo 3' y MMLV-RT. A continuación el ADNc se convirtió en ARNc mediante transcripción *in vitro* empleando ARN polimerasa T7 en presencia de Cy3-CTP (Perkin Elmer, Waltham, Massachussets, EE.UU.), que amplifica el material e incorpora CTP marcada con el fluoróforo Cy3 de manera simultánea. La purificación del ARNc marcado y amplificado se llevó a cabo en membranas de sílice empleando el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.3.3. Hibridación en microarrays

La hibridación del ARNc marcado con Cy3 se llevó a cabo en microarrays 4 x 44K de genoma humano completo G4112F (Agilent Technologies), que contienen más de 41.000 sondas (genes únicos y transcritos) recopiladas de las bases de datos RefSeq, Goldenpath Ensembl Unigene Human Genome y GenBank depositadas mediante síntesis de oligos *in situ* (Kroninck, 2004; Wang *et al.*, 2006). Se hibridaron 15 µg de ARNc marcado con Cy3 durante 17 h a 65 °C en un horno de hibridación G2545A (Agilent Technologies) a 10 rpm. Los microarrays se lavaron por centrifugación de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies, 2008).

3.3.4. Adquisición y cuantificación de imágenes

Los microarrays fueron digitalizados a una resolución de 5 µm en un escáner de microarrays G2565BA (Agilent Technologies) empleando los ajustes recomendados por el fabricante para microarrays con formato 4 x 44K de un color. El procesamiento de las imágenes digitales y el cálculo de la intensidad de la señal de cada sonda del microarray se llevaron a cabo mediante el programa Feature Extraction 9.1.3.1 (Agilent Technologies) empleando el

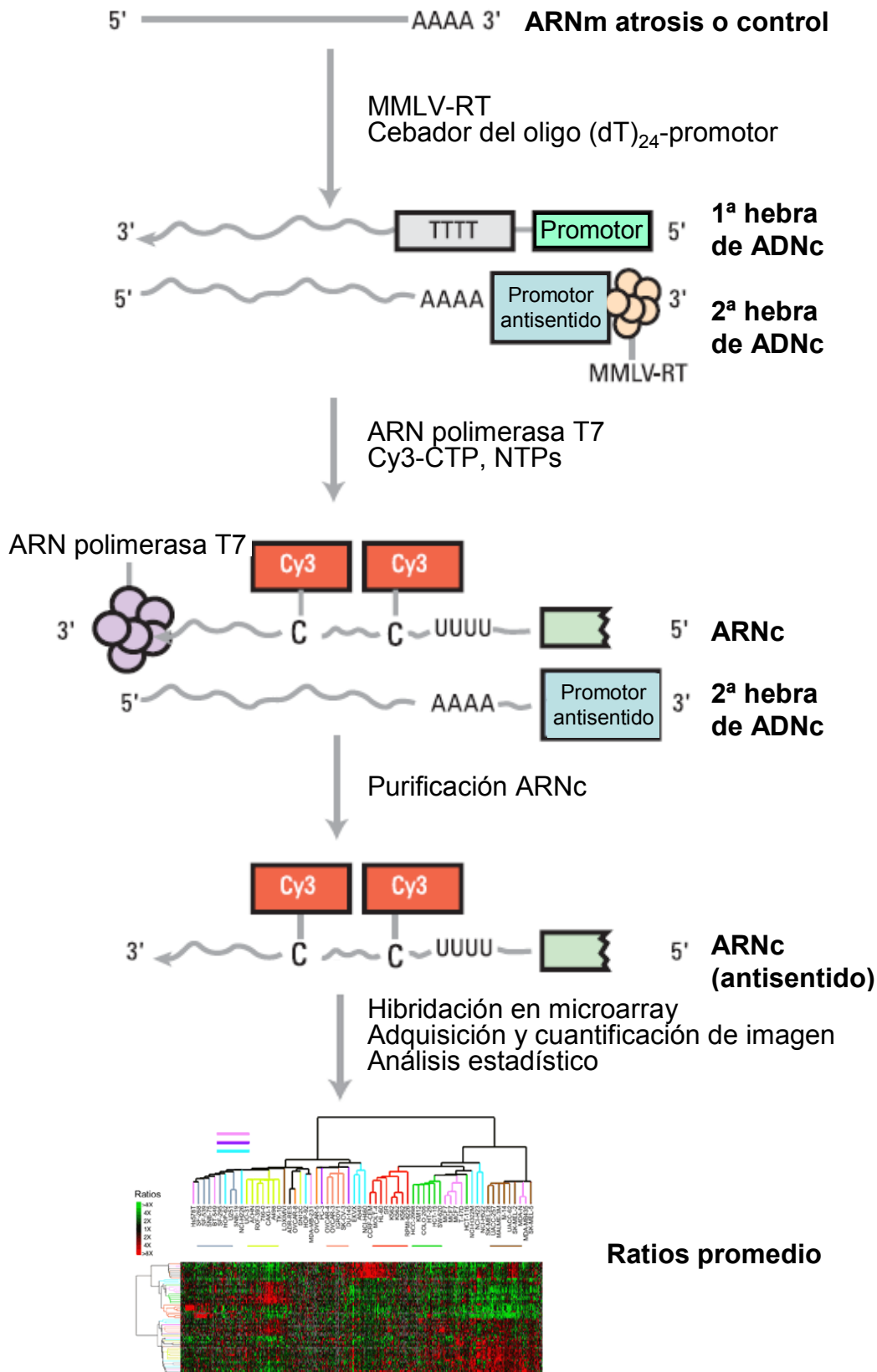


Figura 3.2. Representación esquemática de la metodología empleada para el análisis de la expresión génica diferencial en MSCs de pacientes con artrosis en comparación con individuos control mediante microarrays de genoma humano completo. ADNc, ácido desoxirribonucleico complementario; ARNc y ARNm, ácido ribonucleico complementario y mensajero respectivamente; CTP, citosina trifosfato; MMLV-RT, transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney; NTP, nucleósido-trifosfato.

protocolo de extracción de datos recomendado por el fabricante para este tipo de microarrays (Agilent Technologies, 2004). Las imágenes de los microarrays se inspeccionaron en detalle en busca de artefactos atribuibles a una incorrecta hibridación.

3.3.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico dirigido a la cuantificación de la expresión génica diferencial entre pacientes con artrosis e individuos control, así como al estudio de la abundancia de términos GO en dichos genes, el posible enriquecimiento de determinados conjuntos de genes y las posibles interacciones entre las correspondientes proteínas, se empleó la plataforma R (Chambers, 2008), junto con determinados paquetes del proyecto Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) y aplicaciones como GeneCodis2 (Carmona-Saez *et al.*, 2007; Nogales-Cadenas *et al.*, 2009), GSEA (Subramanian *et al.*, 2005) y STRING (Jensen *et al.*, 2009) (Fig. 3.3).

3.3.5.1. Preprocesamiento de datos

Los datos de cuantificación de imágenes provenientes de Feature Extraction fueron importados en R y procesados mediante el paquete *Agi4x44PreProcess* de Bioconductor. Se tomaron *MeanSignal* y *BGMeanSignal* como señales principal y de fondo respectivamente. A fin de minimizar posibles diferencias originadas por la variación experimental en los procesos de marcaje, hibridación, lavado y digitalización (Knudsen, 2002), se utilizaron distintas funciones del paquete Limma (Smyth, 2005) para efectuar la sustracción de la señal de fondo y la normalización de los datos. Primero se empleó la función *backgroundCorrect* con el método *half* para sustraer la señal de fondo de la señal principal, que el programa Feature Extraction proporciona por separado, y asignar el valor 0,5 a las señales que estaban por debajo de este valor a fin de obtener intensidades corregidas positivas; a continuación se llevó a cabo la normalización entre microarrays mediante la función *normalizeBetweenArrays* con el método *quantile* (Bolstad *et al.*, 2003). Además, se sumó el valor 50 a las intensidades antes de la transformación logarítmica de manera que las relaciones logarítmicas tendiesen a cero para las intensidades más bajas y así reducir la variabilidad de la señales más tenues.

El programa Feature Extraction adjunta a cada dato indicadores que señalan diversas propiedades de la cuantificación de la señal, los cuales pueden emplearse para filtrar señales que no cumplan determinados criterios de calidad. La normalización de los datos se llevó a cabo de forma previa a los procesos de filtrado, ya que si bien buena parte de las sondas que posteriormente resulten descartadas por el filtrado corresponden a señales indiscernibles de la señal de fondo, tratándose por tanto de sondas no expresadas por el sistema biológico en estudio, es interesante conservar sus valores a la hora de normalizar los datos a fin de

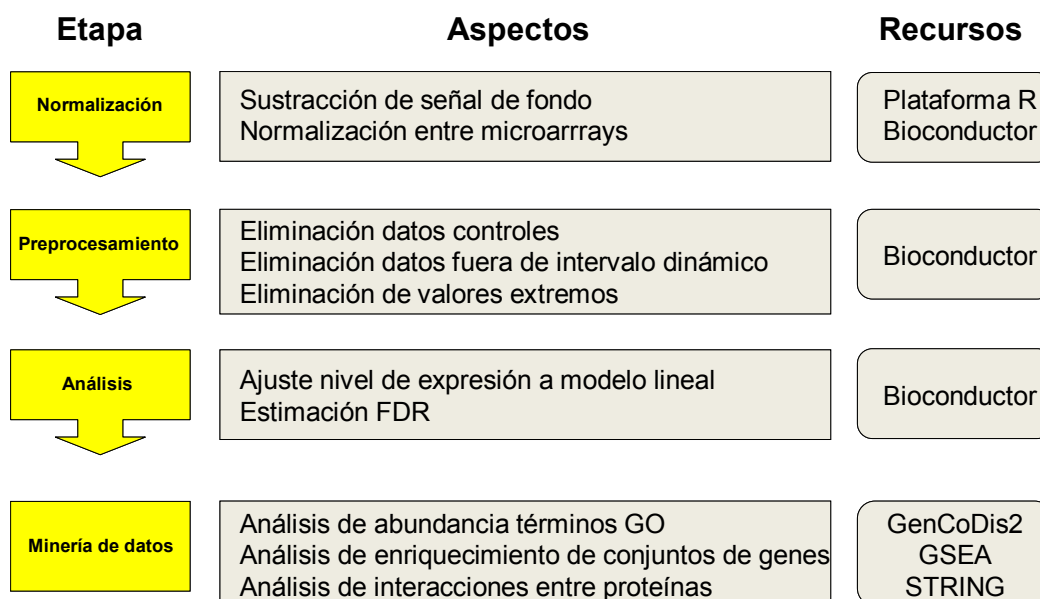


Figura 3.3. Representación esquemática del flujo de trabajo observado en el análisis estadístico de la expresión génica diferencial en MSCs de pacientes con artrosis en comparación con individuos control mediante microarrays de genoma humano completo. FDR, proporción de falsos positivos; GO, *gene ontology*; MSC, célula madre mesenquimal.

hacer uso de la máxima cantidad de información posible. Posteriormente, los indicadores proporcionados por Feature Extraction se emplearon para descartar aquellos datos correspondientes a controles, valores situados fuera del intervalo dinámico del escáner y valores extremos. Para delimitar los datos que se encontraban dentro del intervalo dinámico se consideraron tres niveles independientes de filtrado: señal discernible del fondo, señal encontrada y señal no saturada. En cada etapa de filtrado se exigió que como mínimo el 75% de las réplicas de al menos una condición experimental mostrasen el indicador de que la señal estaba dentro del intervalo dinámico; además, se descartaron las sondas cuyo porcentaje de réplicas que mostraban el indicador de presencia de valores extremos superaba el 25% en al menos una condición experimental. Los microarrays 4 x 44K de genoma humano completo G4112F constan de un conjunto de sondas no control que pueden tener hasta diez réplicas situadas en distintas posiciones del microarray. El cálculo de la media de intensidades de cada conjunto de sondas replicadas permitió estimar la reproducibilidad a través del coeficiente de variación. Una vez completado el procesamiento de los datos, se obtuvieron 21.255 datos válidos para el análisis estadístico. Mediante el paquete de anotaciones de Bioconductor *hgug4112a.db* se asignaron a cada sonda los correspondientes código de acceso, símbolo, descripción e identificadores GO de la base de datos *Gene Ontology* (The Gene Ontology Consortium, 2000).

3.3.5.2. Determinación de genes diferencialmente expresados

Para la determinación de los genes diferencialmente expresados entre pacientes con artrosis e individuos control de manera estadísticamente significativa se emplearon las capacidades de modelado lineal del paquete *Limma* (Smyth, 2005) de Bioconductor. *Limma* hace uso de métodos bayesianos empíricos e incorpora herramientas estadísticas que tienen en cuenta la multiplicidad de los ensayos. Para la estimación del efecto del estado (artrosis frente a control) se ajustó a cada gen un modelo lineal del tipo:

$$y_{ij} = \tau_i + e_{ij}, \quad (3.1)$$

donde y_{ij} es la observación correspondiente al estado i en el individuo j , τ_i el efecto del estado i y e_{ij} el error experimental, que se asume distribuido normalmente con media 0 y varianza σ_e^2 . Los genes expresados diferencialmente debido a diferencias de estado se descubrieron estableciendo la hipótesis nula de ausencia de diferencias entre τ_i para cada gen. La proporción de falsos positivos (*false discovery rate*, FDR), *i.e.* la proporción de genes sin expresión diferencial real que son considerados diferencialmente expresados, se estimó mediante el método de Benjamini y Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995) incorporado en el paquete *Limma*.

3.3.5.3. Análisis de enriquecimiento de términos GO

Se empleó el programa GeneCodis2 (Carmona-Saez *et al.*, 2007; Nogales-Cadenas *et al.*, 2009) para determinar la abundancia de términos GO (proceso biológico, función molecular y componente celular) y KEGG (Kanehisa y Goto, 2000) en el conjunto de genes expresados diferencialmente de forma significativa. Este programa determina los p-valores hipergeométricos para la sobrerrepresentación e infrarrepresentación de cada término GO y KEGG en las anotaciones GO y KEGG de los genes seleccionados mediante un test hipergeométrico que compara la distribución de términos en un universo definido de genes con la distribución de términos en el conjunto de genes seleccionados. Para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$) en la distribución de los distintos términos GO en genes regulados al alza o a la baja se empleó una prueba χ^2 .

3.3.5.4. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

Se empleó el programa GSEA (Subramanian *et al.*, 2005) para investigar la posibilidad de que determinados conjuntos de genes (grupos de genes que comparten función biológica, localización cromosómica o regulación) definidos *a priori* exhibiesen diferencias significativas entre pacientes con artrosis e individuos control. El método consta esencialmente de tres etapas: i) cálculo de la puntuación de enriquecimiento, que refleja en qué medida un

determinado conjunto de genes se encuentra sobrerrepresentado en los extremos (superior o inferior) de la lista de genes ordenada de acuerdo con el nivel de expresión diferencial; ii) estimación del grado de significación estadística de la puntuación de enriquecimiento mediante un test empírico de permutación fenotípica que respeta las complejas correlaciones que existen entre los datos de expresión diferencial; y iii) reajuste de la significación estimada para adaptarla a ensayos de comparaciones múltiples.

Para el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes se emplearon los 249 elementos incluidos en el conjunto de genes Biocarta de la base de datos de GSEA más un conjunto adicional formado por los 43 genes del colágeno humano (Tabla Complementaria 1). La FDR se estimó permutando las etiquetas de los conjuntos de genes 1000 veces.

3.3.5.5. Análisis de interacciones proteicas

Se empleó el programa STRING 8.2 (Jensen *et al.*, 2009) para determinar posibles interacciones entre las proteínas codificadas por los genes expresados diferencialmente de forma significativa. STRING rastrea interacciones proteína-proteína de tipo directo (físicas) e indirecto (funcionales), recopiladas a partir de numerosas bases de datos entre las que se encuentran KEGG y GO. Este conjunto de interacciones predefinidas se complementa con interacciones predichas mediante modelos computacionales de asociación funcional y coexpresión (Harrington *et al.*, 2008; Skrabanek *et al.*, 2008). El programa incorpora además información obtenida mediante minería de texto de fuentes como *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (Nash *et al.*, 2007) y *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) (McKusick, 1998), así como interacciones transferidas entre organismos tras evaluar en qué medida una determinada interacción entre proteínas que se encuentran conservadas en varios organismos puede considerarse común a ellos (von Mering *et al.*, 2005). En total STRING almacena *ca.* $5 \cdot 10^7$ interacciones.

3.4. ANÁLISIS DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

El análisis diferencial de la expresión proteica de MSCs y condrocitos entre pacientes con artrosis e individuos control se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del CNIC. Los extractos proteicos marcados fueron analizados mediante 2D-DIGE. A continuación, el análisis estadístico detallado de las imágenes digitales de los geles 2D así obtenidos permitió cuantificar los cambios significativos en la expresión proteica (Fig. 3.4). Finalmente, las proteínas de interés fueron recortadas de geles 2D teñidos con AgNO_3 , digeridas con tripsina e identificadas mediante búsqueda en bases de datos a partir de la información de masa proporcionada por los correspondientes espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS.

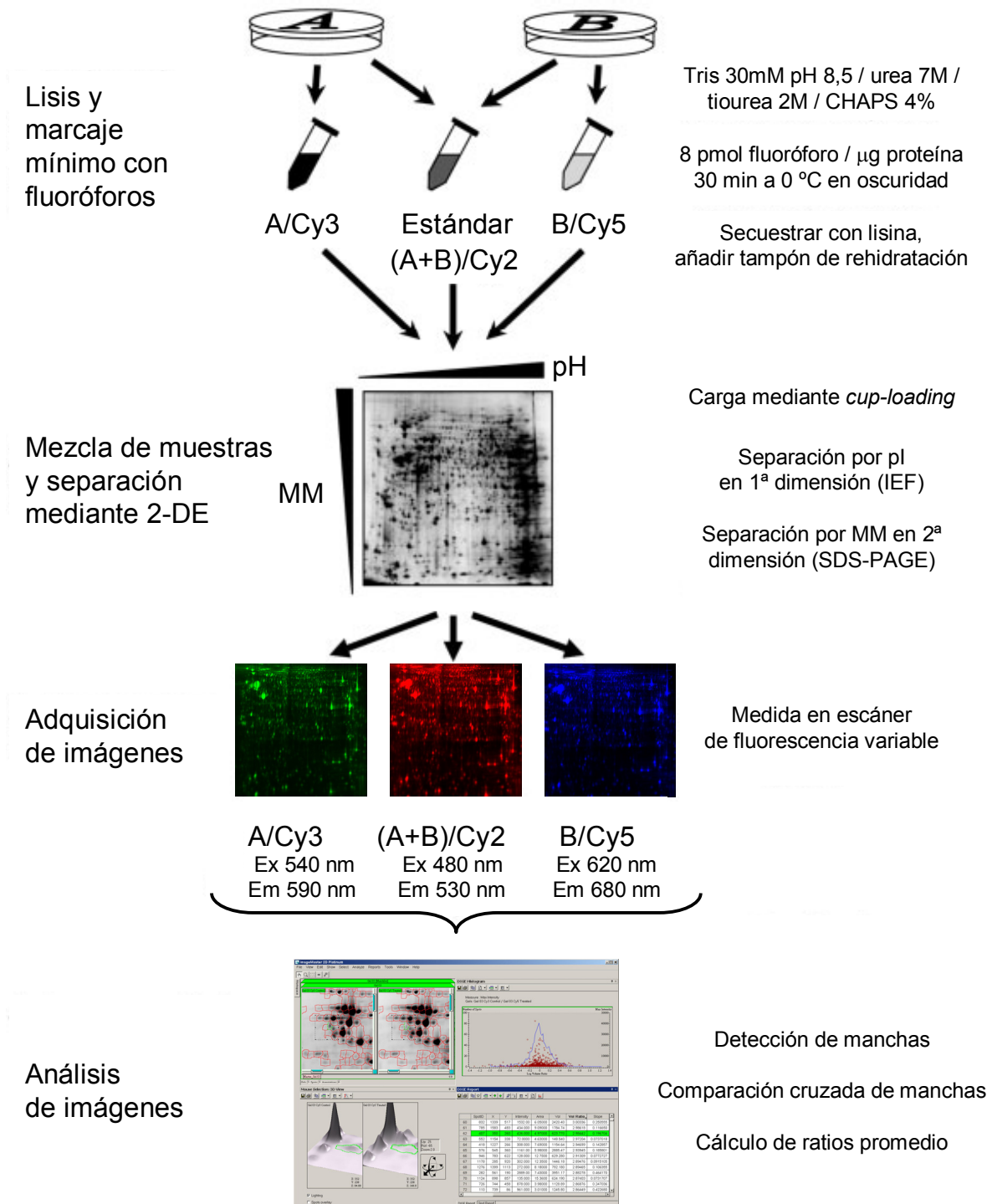


Figura 3.4. Representación esquemática de la metodología empleada para el análisis de la expresión diferencial proteica en MSCs y condrocitos de pacientes con artrosis (muestra A) en comparación con individuos control (muestra B) mediante 2D-DIGE. 2D-DIGE, electroforesis diferencial en geles bidimensionales; CHAPS, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato; Em, emisión; Ex, excitación; IEF, isoelectroenfoque; MM, masa molecular; pI, punto isoelectrico; SDS-PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

3.4.1. Preparación de extractos proteicos

3.4.1.1. Preparación de extractos proteicos para el análisis 2D-DIGE

Las células tripsinizadas fueron lavadas con PBS y centrifugadas. El precipitado de células se trató con tampón de lisis (Tris-HCl 30 mM pH 8,5; urea 7 M; tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v); DTT 50 mM) y se molió en mortero con resina empleando el kit Grinding (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Se utilizó el kit 2D Clean-Up (GE healthcare) para precipitar las proteínas, las cuales se recogieron por centrifugación a 14 krpm. La resuspensión se llevó a cabo en tampón de lisis sin DTT, ya que los agentes reductores interfieren en el proceso de marcaje, ajustando el pH a 8,5 a 4 °C cuando fue necesario. Se midió la concentración de proteínas empleando el kit RCDC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, EE.UU).

3.4.1.2. Preparación de extractos proteicos para el análisis SRM

Las MSCs tripsinizadas fueron lavadas con PBS y centrifugadas. El precipitado de células se trató con tampón de lisis (Tris-HCl 30 mM pH 8,5; urea 7 M; tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v); DTT 50 mM) y se molió en mortero con resina empleando el kit Grinding (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Se midió la concentración de proteínas empleando el kit RCDC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, EE.UU).

3.4.2. Marcaje de proteínas

Se llevó a cabo un marcaje mínimo de los extractos proteicos resuspendidos en tampón de lisis sin DTT provenientes de pacientes con artrosis y de controles con fractura de cadera sin artrosis empleando los fluoróforos CyDye DIGE de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Brevemente, se marcaron por separado 50 µg de cada extracto proteico a 0 °C en la oscuridad durante 30 min con 400 pmol de los N-hidroxisuccinimida ésteres de los colorantes de cianina Cy3 o Cy5 disueltos en dimetilformamida (pureza 99,8%, Sigma-Aldrich). El estándar interno, formado por la mezcla equimolecular de todos los extractos proteicos, se marcó con el fluoróforo Cy2 de forma análoga. La reacción de marcaje fue detenida añadiendo 1 µl de L-lisina 10 mM (Sigma-Aldrich) y se dejó la mezcla en hielo durante 10 min. Tras el marcaje y la parada, se mezclaron apropiadamente las muestras y se añadió tampón de rehidratación (urea 7 M; tiourea 2 M; CHAPS 4% (p/v)) con DTT 50 mM más tampón IPG pH 4-7 0,8% (v/v) para el análisis de MSCs o tampón IPG pH 3-11 NL 0,8% (v/v) para el análisis de condrocitos. Para evitar posibles sesgos originados por las distintas propiedades espectrales de los fluoróforos los extractos proteicos fueron marcados con fluoróforo Cy5 o Cy3 empleando la técnica *dye-switching*.

3.4.3. Electroforesis bidimensional

Se empleó la técnica *cup loading* (Görg *et al.*, 1988) para cargar las muestras en tiras previamente rehidratadas en tampón de rehidratación con DTT más tampón IPG pH 4-7 (MSCs) o en tampón de rehidratación con disulfuro de hidroxietilo 100 mM (DeStreak, GE Healthcare) más tampón IPG pH 3-11 NL (condrocitos). Se emplearon tiras de 24 cm Immobiline DryStrip, pH 4-7 (MSCs) o 3-11 NL (condrocitos) (GE Healthcare), las cuales se sometieron a IEF (primera dimensión) en un equipo IPGPhor II (GE Healthcare) hasta alcanzar el estado estacionario (42 kVh para pH 4-7 y 35 kVh para pH 3-11 NL). Para la separación en la segunda dimensión se utilizaron geles SDS-PAGE (Laemmli, 1970) al 12% (p/v) de poliacrilamida (26 x 20 cm) preparados en vidrio de baja fluorescencia. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo Ettan DALT Six (GE Healthcare) a 25 °C a 2 W/gel durante 1 h y a 15 W/gel hasta que la marca de colorante hubo migrado del gel.

3.4.4. Adquisición y análisis de imágenes

Tras la electroforesis, los geles fueron digitalizados en un escáner de fluorescencia variable Typhoon 9400 (GE Healthcare) empleando las longitudes de onda y filtros adecuados para cada uno de los fluoróforos utilizados (Cy2, Cy3 y Cy5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las imágenes, adquiridas con una resolución de 100 μm , fueron cargadas a través del módulo *Image Loader* del programa de análisis diferencial DeCyder (GE Healthcare) (Karp *et al.*, 2004) para llevar a cabo la cuantificación relativa de proteínas entre sujetos con artrosis y sujetos control. En un primer paso, se empleó el módulo DIA (*differential in-gel analysis*, análisis diferencial en gel) para la detección conjunta de las tres imágenes de cada gel (estándar interno y dos muestras), realizándose de forma automática la sustracción de fondo, cuantificación y normalización de las señales a fin de obtener una medida precisa y coherente de la intensidad de cada mancha de proteína en función de los volúmenes correspondientes a los canales Cy3 y Cy5 relativos al volumen del canal estándar Cy2. A continuación se empleó el módulo BVA (*biological variation analysis*, análisis de la variación biológica) para comprobar la consistencia de las diferencias halladas entre pares de muestras (pacientes con artrosis y controles) entre los distintos geles, para lo cual las imágenes procesadas con el módulo DIA para cada gel fueron comparadas entre sí empleando el estándar interno (canal Cy2) de cada gel como referencia.

Se empleó el test de Student para comparar las ratios promedio correspondientes a cada mancha entre pacientes con artrosis y controles, *i.e.* las diferencias en los niveles de expresión, considerándose significativas las variaciones que se encontraban dentro del intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$). Por otra parte, el análisis de componentes

principales (ACP) proporcionado por el módulo EDA (*extended data analysis*, análisis de datos ampliado) puso de manifiesto que los pacientes con artrosis podían discriminarse eficazmente de los controles sobre la base de los valores de expresión de las proteínas detectadas. Se empleó la varianza como medida de la variabilidad, observándose que las varianzas eran muy pequeñas. De esta forma, se estableció como punto de corte de expresión diferencial una ratio de volumen diferencial de 1,5 (MSCs) o 1,2 (condrocitos), junto con un test de Student significativo.

3.4.5. Tinción con nitrato de plata

Para la tinción con AgNO_3 de los geles 2D previamente empleados en la adquisición y análisis de imágenes se utilizó el kit Silver Staining (GE Healthcare), basado en el método descrito por Heukeshoven y Dernick (1985), siguiendo las recomendaciones de Yan *et al.* (2000). En los pasos que se describen a continuación, los geles fueron sumergidos en 100 ml de la correspondiente solución en recipientes de polietileno o polipropileno de tamaño apropiado que se mantuvieron en agitación sobre un agitador de vaivén. Los geles se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche en solución de fijación (metanol 15% (v/v) y ácido acético 7% (v/v)). A continuación se aplicó la solución de sensibilización (etanol 30% (v/v), tiosulfato sódico 5% (v/v) y acetato sódico 6,8% (p/v)) durante 30 min, tras lo cual se efectuaron tres lavados con agua milli-Q de 10 min cada uno. Entonces los geles se incubaron durante 20 min con una solución de AgNO_3 0,25% (v/v), se lavaron dos veces durante 1 min con agua milli-Q y se revelaron incubándolos con una solución que contenía Na_2CO_3 2,5% (p/v) y formaldehído 0,15‰ (v/v). Tras 5-10 min la reacción de revelado se detuvo incubando durante otros 20 min con solución de parada (EDTA-Na_2 14,6% (p/v)). Los geles se lavaron con agua milli-Q y se conservaron a temperatura ambiente hasta el recorte de las manchas.

3.4.6. Digestión trípica de proteínas en gel

Las manchas de proteína correspondientes a proteínas diferencialmente expresadas entre los dos grupos de acuerdo con el análisis mediante DeCyder y EDA fueron recortadas manualmente de los geles teñidos con plata, colocadas en microplacas de 96 pocillos de polipropileno con el fondo perforado (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania) y digeridas de forma automática en un robot digestor Proteineer DP (Bruker-Daltonics) bajo el control de dpControl 1.2 (Bruker-Daltonics) cuyo protocolo de operación de fábrica se optimizó a partir del método descrito por Shevchenko *et al.* (2006) empleando manchas de proteína recortadas de geles 2D de MSCs adicionales.

3.4.6.1. Optimización del protocolo de digestión automática en gel

En colaboración con el Dr. Peter Hufnagel de Bruker (Bremen, Alemania) se recortaron un total de 539 manchas de proteína de geles 2D de MSCs adicionales teñidos con AgNO_3 a fin de estudiar de forma sistemática un número de variables relacionadas con el proceso de digestión entre las que se incluían:

i) Lavado de iones Ag^+ : se escindieron 141 manchas en dos mitades aproximadas, una de las cuales se sometió al lavado previo de iones Ag^+ propuesto por Gharahdaghi *et al.* (1999): se incubó el pedazo de gel con tiosulfato sódico (Sigma-Aldrich) 50 mM más ferricianuro potásico (Sigma-Aldrich) 15 mM hasta que hubo desaparecido la característica coloración marrón (*ca.* 5 min), tras lo cual se descartó la solución y se lavó el pedazo de gel con NH_4HCO_3 50 mM (pureza: 99,5%; Sigma-Aldrich) dos veces. La otra mitad de las 141 muestras se lavó dos veces con NH_4HCO_3 50 mM. Los 282 pedazos de gel resultantes se procesaron simultáneamente de forma automática como se describe más abajo (concentración de tripsina: 15 mg/l, tiempo de digestión: 10 h);

ii) Concentración de tripsina: se escindieron 137 manchas en cuatro fracciones aproximadamente equivalentes que fueron procesadas simultáneamente de forma automática como se describe más abajo con distintas concentraciones de tripsina porcina modificada (calidad secuenciación; Promega): 25, 15, 8 y 2 mg/l durante 10 h;

iii) Tiempo de incubación con tripsina: se escindieron 139 manchas en cuatro fracciones aproximadamente equivalentes que fueron procesadas simultáneamente de forma automática como se describe más abajo con distintos tiempos de incubación con tripsina porcina modificada a 15 mg/l: 22, 10, 6 y 2 h;

iv) Extracción con acetonitrilo: se escindieron 122 manchas en dos mitades aproximadas que fueron procesadas simultáneamente de forma automática (concentración de tripsina: 15 mg/l, tiempo de digestión: 10 h) como se describe más abajo, con la diferencia de que tras transferir los digeridos a placas de polipropileno de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) una de las mitades se incubó adicionalmente con acetonitrilo (calidad HPLC; Merck, Darmstadt, Alemania) durante 20 min a 37 °C, tras lo cual la disolución fue mezclada por centrifugación con los digeridos anteriores.

Las 1.630 fracciones de gel resultantes fueron sometidas a reducción con DTT 10 mM en NH_4HCO_3 50 mM durante 30 min a 56 °C. A continuación, las proteínas fueron alquiladas con yodoacetamida (Sigma-Aldrich) 55 mM en NH_4HCO_3 50 mM durante 20 min a 25 °C. Después las manchas de proteína se lavaron con NH_4HCO_3 50 mM y acetonitrilo (calidad HPLC; Merck, Darmstadt, Alemania) y fueron secadas en corriente de nitrógeno. A continuación se añadió tripsina porcina modificada (calidad secuenciación; Promega,

Madison, Wisconsin, EE.UU.) en NH_4HCO_3 50 mM y se dejó transcurrir la digestión a 37 °C. Finalmente, los digeridos fueron transferidos por centrifugación a microplacas de polipropileno de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) y llevados a sequedad mediante centrifugación en vacío. La normalidad de las variables (m/z , s/n , intensidad absoluta, intensidad relativa, resolución y anchura del pico a la mitad del máximo en el espectro MALDI-MS del digerido, Sección 3.4.8) se determinó mediante el test de Shapiro-Wilk. Para la comparación estadística de los grupos se utilizó el test t de Student (dos grupos) o el análisis de la varianza (cuatro grupos). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

3.4.6.2. Digestión triptica de proteínas diferenciales en gel

Las manchas correspondientes a proteínas diferencialmente expresadas fueron reducidas con DTT 10 mM en NH_4HCO_3 50 mM durante 30 min a 56 °C. A continuación, las proteínas fueron alquiladas con yodoacetamida 55 mM en NH_4HCO_3 50 mM durante 20 min a 25 °C. Después las manchas de proteína se lavaron con NH_4HCO_3 50 mM y acetonitrilo y fueron secadas en corriente de nitrógeno. A continuación se añadió tripsina porcina modificada a una concentración de 8 mg/l en NH_4HCO_3 50 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 6 h a 37 °C. Finalmente, los digeridos fueron transferidos por centrifugación a microplacas de polipropileno de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) y llevados a sequedad mediante centrifugación en vacío.

3.4.7. Digestión triptica de extractos proteicos en geles SDS-PAGE

Los extractos proteicos tratados con tampón de lisis (150 μg) (Apartado 3.4.1.2) fueron separados en geles SDS-PAGE (Laemli, 1970) al 12% (p/v) de poliacrilamida (10 x 7 cm). La electroforesis se llevó a cabo en un equipo Mini-Protean (Bio-Rad) a 25 °C a 40 V sólo hasta la entrada del frente en el gel separador. Tras la tinción con azul de Coomassie se recortaron tres bandas consecutivas de *ca.* 8 x 2 mm. Las bandas se incubaron con acetonitrilo durante 10 min, tras lo cual se retiró el sobrenadante y se incubaron con DTT 10 mM en NH_4HCO_3 100 mM durante 30 min a 56 °C. Tras retirar el DTT se incubó de nuevo con acetonitrilo durante 10 min y tras retirar el disolvente las bandas fueron sometidas a alquilación con yodoacetamida 55 mM en NH_4HCO_3 100 mM durante 20 min a 25 °C. Tras retirar la yodoacetamida e incubar de nuevo con acetonitrilo durante 10 min, se retiró el disolvente y se añadió tripsina porcina modificada a una concentración de 25 mg/l en NH_4HCO_3 100 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 16 h a 37 °C.

3.4.8. Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

Los digeridos secos provenientes de la digestión en gel fueron reconstituidos con ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker-Daltonics) a 0,25 g/l en acetonitrilo acuoso al 33% y 0,25% de ácido trifluoroacético (pureza: 99,5%; Sigma-Aldrich). Una alícuota de 0,4 μ l de esta disolución se depositó (por triplicado para las 768 muestras empleadas en la optimización del protocolo de digestión automática en gel) en un portamuestras MALDI con pocillos de 600 μ m de diámetro (AnchorChip, Bruker-Daltonics) (Schuerenberg *et al.*, 2000) y se dejó secar a temperatura ambiente. Los espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS se obtuvieron de forma automática en un espectrómetro de masas MALDI Ultraflex (Bruker-Daltonics) equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS (Suckau *et al.*, 2003) bajo el control de flexControl 2.2 (Bruker-Daltonics). Los espectros de masas se midieron en modo positivo, a una frecuencia de láser de 50 Hz, y se acumularon entre 100 y 1000 espectros individuales. Para el análisis de iones fragmento en modo tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser del precursor fueron de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones. El análisis automático de los datos de masas se llevó a cabo con el software flexAnalysis 2.2 (Bruker-Daltonics). Los espectros MALDI-MS fueron etiquetados mediante el algoritmo SNAP (Rockwood y Van Orden, 1996) y calibrados internamente empleando como referencia dos señales de masa correspondientes a péptidos provenientes de la autólisis de la tripsina ($m/z = 842,510$ y $m/z = 2211,105$); a continuación, se eliminaron las etiquetas de señales de masa atribuibles a queratinas humanas contaminantes, autólisis de tripsina y oxidación de metionina (+15,995 Da). La calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de fragmentación de las señales protonadas monoisotópicas de una mezcla de péptidos que cubría el intervalo $m/z = 800-3200$ (Peptide calibration standard II, Bruker-Daltonics). Se empleó una aplicación desarrollada *ad hoc* en Visual Basic 6.3 (Microsoft Corporation, Redmon, Washington, EE.UU.) para extraer de cada uno de los 4.890 espectros MALDI-MS provenientes de las muestras empleadas en la optimización del protocolo de digestión automática en gel ($n = 539$ manchas, 1.630 fracciones) los siguientes parámetros almacenados por flexAnalysis 2.2: m/z , s/n , intensidad absoluta, intensidad relativa, resolución y anchura del pico a la mitad del máximo.

3.4.9. Identificación de proteínas mediante búsqueda en bases de datos

Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa BioTools 3.0 (Bruker-Daltonics) para buscar en la base de datos no redundante NCBI nr (versión

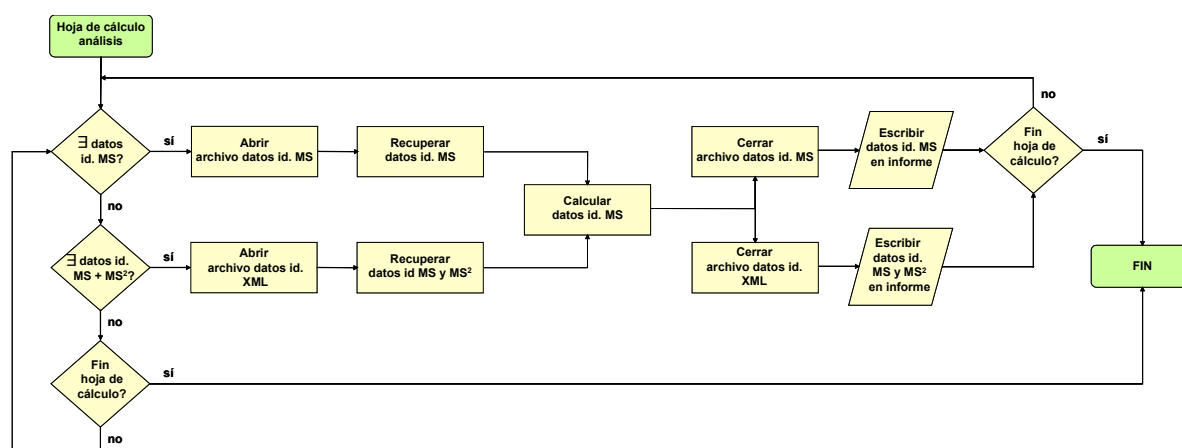


Figura 3.5. Diagrama de flujo de la aplicación desarrollada para el archivado de la información fundamental relativa a los datos finales de identificación de proteínas. Id., identificación; MS, espectrometría de masas; MS², espectrometría de masas en tándem; XML, lenguaje de marcado extensible.

20070421, *ca.* $4,2 \cdot 10^6$ entradas; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, EE.UU.) empleando el software Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido) (Perkins *et al.*, 1999). Los principales parámetros iniciales de búsqueda fueron: tripsina como enzima, carbamidometilcisteína como modificación fija, posibilidad de un corte fallido del enzima, tolerancia de 20 ppm en los datos de MALDI-MS y tolerancia de 0,5 Da en los datos de MALDI-MS/MS. Los espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS, así como los resultados de la búsqueda en bases de datos, fueron revisados manualmente en detalle utilizando los programas flexAnalysis 2.2, BioTools 3.0 y Mascot.

3.4.10. Archivado de datos de identificación de proteínas

Tras el refinamiento de los datos de masas y la iteración de las búsquedas la información fundamental relativa a los resultados finales de identificación de proteínas se archivó de forma organizada empleando una aplicación desarrollada *ad hoc* en Visual Basic 6.3 (Camafeita *et al.*, 2005). Tomando como punto de partida la hoja de cálculo en que se detallan las manchas de proteína a procesar, los procedimientos a emplear en el robot digestor y los métodos de análisis en el espectrómetro de masas, esta aplicación agrupa y organiza la información almacenada por BioTools en archivos de texto e hipertexto de manera individual para cada muestra en una única hoja de cálculo con vínculos internos que facilitan el acceso instantáneo a espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS, códigos de acceso, valores esperados y puntuaciones Mascot, valores de pI y MM, secuencias peptídicas y cobertura de secuencia, así como hipervínculos hacia las correspondientes anotaciones de la base de datos NCBIInr (Fig. 3.5).

3.4.11. Obtención de la función biológica de proteínas

La información sobre las proteínas reguladas diferencialmente en MSCs y condrocitos entre pacientes con artrosis y controles se obtuvo de diversos servidores de información proteómica: *RCSB Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000), *Babelomics* (Al-Shahrour *et al.*, 2005b), *ExPASy* (Gasteiger *et al.*, 2003), *iHOP* (Hoffmann y Valencia, 2004) y *EBIMed* (Rebholz-Schuhmann *et al.*, 2007). Estos servidores reúnen información proveniente de las principales bases de datos de proteínas de acceso público.

3.4.12. Análisis de interacciones proteicas

Se empleó el programa STRING 8.2 (Jensen *et al.*, 2009) para determinar posibles interacciones entre las proteínas expresadas diferencialmente de forma significativa. STRING rastrea interacciones proteína-proteína de tipo directo (físicas) e indirecto (funcionales), tanto teóricas como experimentales, recopiladas a partir de fuentes como el contexto genómico, los datos experimentales y de coexpresión y la información previa (véase Apartado 3.3.5.5).

3.4.13. Validación de los estudios de expresión proteica mediante SRM

Se escogieron tres transiciones precursor-diagnóstico para ocho de las proteínas que se encontraron reguladas en las MSCs de pacientes con artrosis siguiendo las recomendaciones de James y Jorgensen (2010). Los péptidos precursores proteotípicos (Brunner *et al.*, 2007; Kuster *et al.*, 2005) y los correspondientes iones fragmento diagnósticos (iones de la serie y) se escogieron de acuerdo con la información previa disponible en *PeptideAtlas* (Deutsch *et al.*, 2008) y la predicción bioinformática de *PeptideSieve* (Mallick *et al.*, 2007) a fin de optimizar la sensibilidad y la especificidad del ensayo.

La mezcla de péptidos trípticos proveniente de la digestión de extractos proteicos en geles SDS-PAGE (Apartado 3.4.7) fue llevada a sequedad mediante centrifugación en vacío. El material seco se reconstituyó en 30 μ l de ácido acético (calidad HPLC, Merck) al 0,5% (v/v) y fue inyectado en una microcolumna de fase inversa C-18 de 300 μ m de diámetro interno y 5 mm de longitud (PepMap 300, LC Packings, Ámsterdam, Holanda) para eliminar sales. Los péptidos fueron analizados en un gradiente continuo de acetonitrilo (calidad HPLC, Merck) en una nanocolumna casera de fase inversa C-18 (Mediterranea Sea, Teknokroma, Barcelona, España) de 100 μ m de diámetro interno y 15 cm de longitud. El gradiente se desarrolló de 2% a 40% de solución B (95% de acetonitrilo y 0,5% de ácido acético) en 39 min y de 50% a 90% de solución B en 1 min. Se aplicó un flujo de *ca.* 300 nl/min para eluir los péptidos de la nanocolumna e introducirlos en una aguja de nanoelectronebulización

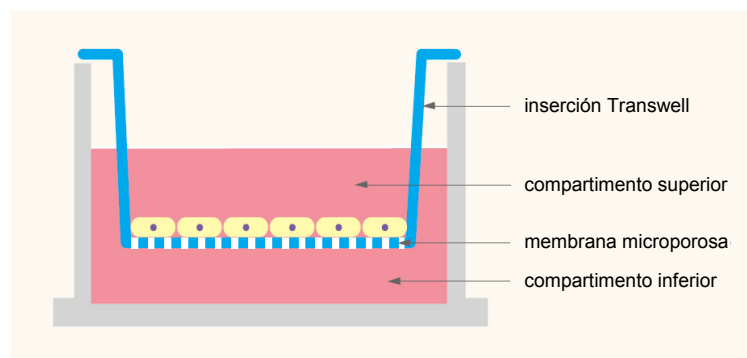


Figura 3.6. Representación esquemática de la cámara de cultivo celular tipo Transwell empleada para los ensayos quimiotácticos.

(New Objective, Woburn, Massachusetts, EE.UU.) para su ionización y fragmentación en tiempo real en un espectrómetro de masas híbrido de triple cuadrupolo (4000 Q-Trap LC-MS/MS System, Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Los iones precursores de interés fueron filtrados en Q1 y los correspondientes iones diagnósticos fueron rastreados en Q3. Tras el experimento SRM se realizó un barrido de alta resolución seguido de una fragmentación inducida por colisión. Se empleó un voltaje de ionización de 3 kV y un potencial de *declustering* de 90 V. Para el experimento de SRM se empleó una energía de colisión de 35 V. El análisis de los espectros de masas se realizó mediante el programa Analyst 4.1 (Applied Biosystems) y los valores resultantes se emplearon en la cuantificación relativa de las proteínas diana. Para la comparación estadística de los grupos (artrosis y control) se utilizó el test t de Student. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

3.5. ENSAYOS QUIMIOTÁCTICOS

Las MSCs confluentes de seis pacientes de artrosis y seis controles con fractura de cadera sin artrosis fueron tripsinizadas, contadas y lavadas por centrifugación. Los ensayos quimiotácticos se llevaron a cabo en el Servicio de Reumatología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid empleando cámaras de cultivo celular de 24 pocillos tipo Transwell (Corning, Nueva York, EE.UU.) con inserciones de 6,5 mm de diámetro y membranas de policarbonato con 8 μm de poro (Fig. 3.6). Se sembraron 0,1 ml de suspensión celular en DMEM ($2 \cdot 10^4$ células) en el compartimento superior y se dejó incubar durante 2 h a 37 °C en CO₂ al 5% (v/v) para la fijación y propagación de las células. Una vez fijadas las células a las membranas Transwell, se añadieron 0,6 ml de medio de cultivo con 1 ng/ml de rhPDGF-BB (R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, EE.UU.) al compartimento inferior. Tras 4 h de incubación a 37 °C, se eliminaron las células remanentes de la superficie superior de la

membrana con un hisopo de algodón, mientras que las células restantes, que habían migrado hacia la parte inferior de la membrana, fueron fijadas con formaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% (v/v) y teñidas con cristal violeta (Sigma-Aldrich). Como control se emplearon pocillos en cuyo compartimento inferior sólo se había añadido DMEM. Las medidas se llevaron a cabo en al menos seis experimentos independientes por triplicado.

El recuento de células migradas en los pocillos control y estimulados se llevó a cabo en 10 campos aleatorios por pocillo empleando un aumento de 100x. Los resultados se expresaron como índice quimiotáctico (IQ), calculado como el número promedio de células migradas en los pocillos estimulados dividido entre el número promedio de células migradas en los pocillos control. La normalidad de las variables se determinó mediante el test de Shapiro-Wilk. Para la comparación estadística de los dos grupos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

4. Resultados

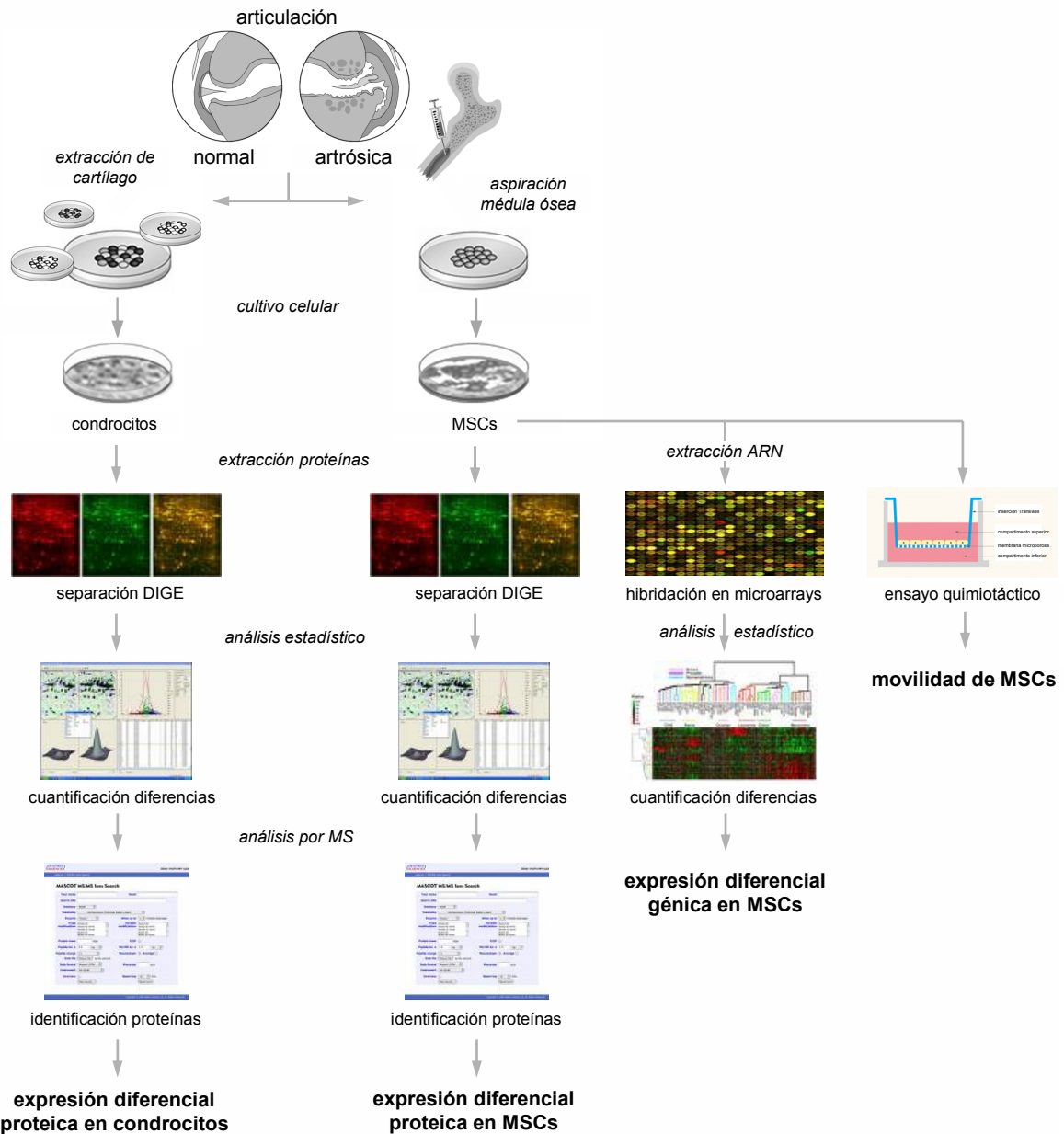


Figura 4.1. Representación esquemática de los procedimientos empleados para el análisis de la expresión diferencial en muestras de pacientes con artrosis y controles.

4.1. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE PACIENTES CON ARTROSIS

Para el análisis diferencial de la expresión génica en MSCs provenientes de médula ósea de pacientes con artrosis e individuos control, los correspondientes extractos de ARN se analizaron mediante microarrays de genoma humano completo. Un análisis estadístico detallado puso de manifiesto aquellos genes cuya expresión se había alterado de manera significativa (Fig. 4.1).

4.1.1. Perfil de expresión génica diferencial

Para la hibridación del ARNc marcado proveniente de MSCs de 8 pacientes con artrosis y 8 individuos control con fractura de cadera sin artrosis se emplearon microarrays de genoma humano completo con *ca.* 41.000 sondas. Una vez completadas las distintas etapas de procesamiento de las imágenes digitales de los microarrays, se encontró un total de 21.255 genes válidos para el tratamiento estadístico subsiguiente (Tabla Complementaria 2). Las señales provenientes de estos genes se analizaron con métodos bayesianos empíricos a los que se incorporaron herramientas que consideran la multiplicidad de los ensayos. De esta forma se encontraron 1.967 genes diferencialmente expresados entre MSCs de pacientes con artrosis e individuos control a un nivel de significación $p < 0,05$. De estos genes 532 (27%) mostraron una ratio promedio de cambio

superior a dos veces, de los cuales 240 (45%) estaban sobreexpresados y 292 (55%) infraexpresados en las MSCs de pacientes con artrosis en comparación con los controles (Fig. 4.2 y Tabla Complementaria 2). Sesenta y un genes (3%) mostraron una ratio promedio superior a cinco veces, de los cuales 21 (34%) estaban sobreexpresados y 40 (65%) infraexpresados (Tabla 4.1). Finalmente, en 13 genes (0,7%) se encontraron cambios de expresión superiores a 10 veces, ocho de los cuales (62%), que codifican diversas inmunoglobulinas, lipoproteinlipasa y fosfoproteína secretada 1, se encontraban regulados a la baja en las MSCs de pacientes con artrosis en comparación con los controles, mientras que dos análogos de quitinasa 3, tenascina XB, osteoglicina y un receptor de quimiocinas constituyeron los cinco genes con niveles de sobreexpresión más elevados (Tabla 4.1).

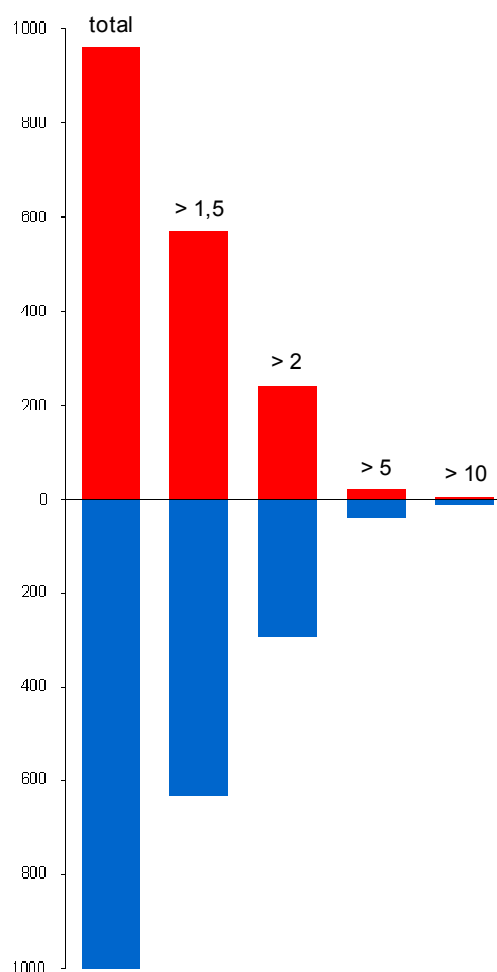


Figura 4.2. Expresión génica diferencial en MSCs de pacientes con artrosis en comparación con individuos control. Se representa el número de total de genes sobreexpresados (rojo) e infraexpresados (azul) con $p < 0,05$, así como los correspondientes a ratios promedios de cambio $> 1,5$, > 2 , > 5 y > 10 veces. MSC, célula madre mesenquimal.

Tabla 4.1. Los 38 genes con mayor nivel de expresión diferencial en MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis mediante microarrays

Ratio promedio ^a	p-valor	Símbolo	Código de acceso	Nombre	Términos GO ^b
+51,2	7,0·10 ⁻³	CHI3L1	1116	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	metabolismo de carbohidratos catabolismo de quitina matriz extracelular proteica
+17,7	1,2·10 ⁻²	CHI3L2	1117	Chitinase 3-like 2	metabolismo de carbohidratos catabolismo de quitina espacio extracelular
+13,1	1,2·10 ⁻²	TNXB	7148	Tenascin XB	adhesión celular transducción de señal organización y biogénesis del citoesqueleto
+11,7	1,510 ⁻²	OGN	4969	Osteoglycin	matriz extracelular proteica unión de proteínas actividad factor de crecimiento
+10, 2	1,710 ⁻²	CCRL1	51554	Chemokine (C-C motif) receptor-like 1	quimiotaxis respuesta inmune transducción de señal
+9,3	1,110 ⁻²	PRG4	10216	Proteoglycan 4	proliferación celular espacio extracelular
+9,0	3,1·10 ⁻²	PDPN	10630	Podoplanin	morfogénesis celular linfangiogénesis transporte de aminoácidos
+8,9	1,2·10 ⁻²	CLU	1191	Clusterin	metabolismo de lípidos apoptosis espacio extracelular
+8,2	3,1·10 ⁻³	BARX1	56033	BARX homeobox 1	regulación de la transcripción señalización celular desarrollo tisular
+8,1	3,7·10 ⁻²	CD70	970	CD70 molecule	apoptosis respuesta inmune señalización celular
+7,6	3,3·10 ⁻²	MYOC	4653	Myocilin, trabecular meshwork inducible glucocorticoid response	percepción visual morfogénesis de estructura anatómica espacio extracelular
+6,2	1,7·10 ⁻²	ANGPTL5	253935	Angiotensin-like 5	transducción de señal unión de receptores
+5,9	4,5·10 ⁻²	MMP1	4312	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	metabolismo de peptidoglicano proteólisis catabolismo de colágeno
+5,9	3,8·10 ⁻³	PCOLCE2	26577	Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	unión de heparina
+5,9	1,6·10 ⁻²	FGF18	8817	Fibroblast growth factor 18	osificación transducción de señal señalización celular
+5,7	3,8·10 ⁻²	NTN1	9423	Netrin 1	apoptosis motilidad celular regulación positiva de la proliferación celular
+5,5	1,4·10 ⁻²	AEBP1	165	AE binding protein 1	desarrollo del citoesqueleto proteólisis adhesión celular
+5,5	1,8·10 ⁻²	FBLN1	2192	Fibulin 1	región extracelular matriz extracelular proteica constituyente estructural de la matriz extracelular
+5,2	3,0·10 ⁻²	EPB41L3	23136	Erythrocyte membrane protein band 4,1-like 3	organización y biogénesis del citoesqueleto de actina cortical unión intercelular unión de actina
-6,5	1,5·10 ⁻²	CCL3	6348	Chemokine (C-C motif) ligand 3	homeostasis de ion calcio celular motilidad celular quimiotaxis
-6,7	1,5·10 ⁻²	COL11A1	1301	Collagen, type XI, alpha 1	condensación del cartilago organización y biogénesis de la matriz extracelular constituyente estructural de la matriz extracelular
-6,7	1,2·10 ⁻²	PLN	5350	Phospholamban	homeostasis de ion calcio celular regulación del transporte de iones calcio actividad reguladora de canales de calcio
-7,1	1,6·10 ⁻²	CHRD2	25884	Chordin-like 2	osificación diferenciación celular desarrollo del cartilago
-7,4	1,3·10 ⁻²	CNN1	1264	Calponin 1, basic, smooth muscle	regulación de la contracción del músculo liso organización y biogénesis de la estructura de actomiosina unión a actina
-7,5	1,4·10 ⁻²	TYROBP	7305	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	respuesta de defensa celular señalización intracelular unión de proteínas
-7,7	1,8·10 ⁻²	KCNMB1	3779	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 1	transporte de iones contracción del músculo liso proteína integral de membrana
-7,7	2,4·10 ⁻²	ACP5	54	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	proteína integral de membrana unión de iones hierro actividad hidrolasa
-8,3	2,5·10 ⁻²	IGHM	3507	Immunoglobulin heavy constant mu	activación de la actividad MAPK respuesta inmune procesamiento y presentación de antígenos
-8,4	3,8·10 ⁻³	HEYL	26508	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	regulación de la transcripción vía de señalización Notch desarrollo de organismo multicelular
-8,4	2,6·10 ⁻²	IGL@	3535	Immunoglobulin lambda locus	
-8,7	3,6·10 ⁻²	CTA-246H3,1	91353	Similar to omega protein	
-9,9	3,3·10 ⁻²	IGLL1	3543	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	respuesta inmune membrana
-11,5	2,1·10 ⁻²	IGHG4	3503	Immunoglobulin heavy constant gamma 4 (G4m marker)	respuesta inmune fracción de membrana unión de antígenos
-13,4	3,1·10 ⁻³	LPL	4023	Lipoprotein lipase	metabolismo de ácidos grasos catabolismo de lípidos región extracelular
-15,8	1,6·10 ⁻²	IGKC	3514	Immunoglobulin lambda locus	respuesta inmune región extracelular unión de antígenos
-16,2	1,4·10 ⁻²	SPP1	6696	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein 1, early T-lymphocyte activation 1)	osificación adhesión celular adhesión célula-matriz
-37,9	6,6·10 ⁻³	IGHA2	3494	Immunoglobulin heavy constant alpha 2 (A2m marker)	respuesta inmune fracción de membrana unión de antígenos
-48,1	1,2·10 ⁻²	IGH@	3492	Immunoglobulin heavy locus	

^aLos símbolos "+" y "-" indican aumento o disminución, respectivamente, del nivel de expresión en artrosis en comparación con los controles; ^bSe muestran sólo algunos términos GO representativos; GO, gene ontology; MSC, célula madre mesenquimal.

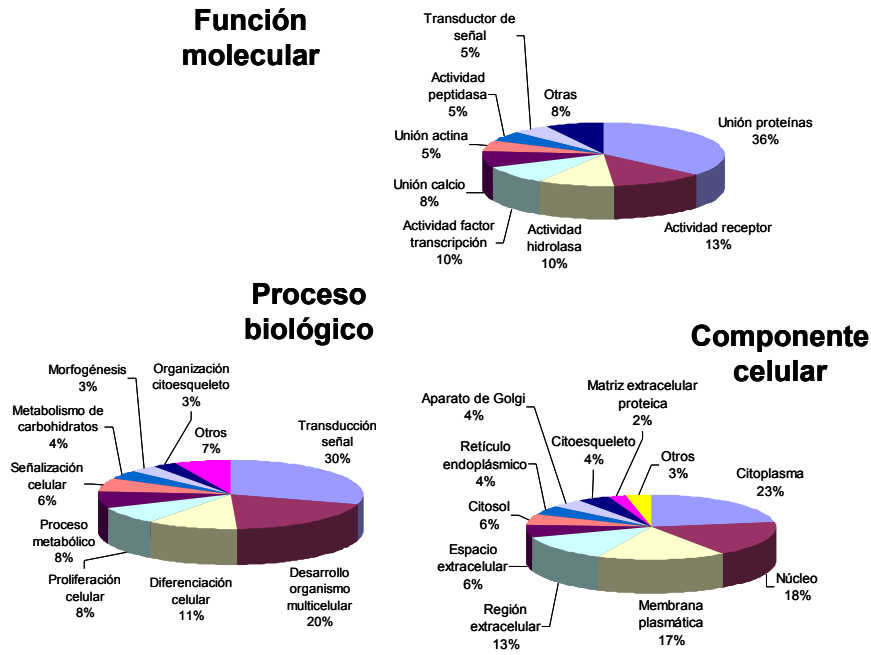


Figura 4.3. Distribución de los genes regulados de MSCs en sus distintas categorías funcionales. MSC, célula madre mesenquimal.

4.1.2. Análisis estadístico de términos GO

El análisis estadístico de términos GO de los 1.200 genes que resultaron diferencialmente expresados con una ratio promedio de cambio superior a 1,5 veces se llevó a cabo mediante la aplicación web GeneCodis2, la cual determina los p-valores hipergeométricos para la sobrerrepresentación e infrarrepresentación de términos GO y KEGG mediante un test hipergeométrico que compara la distribución de términos entre un universo definido de genes y el conjunto de genes seleccionados. De esta forma, los 1.032 genes para los que se encontraron anotaciones fueron agrupados en diversos términos GO de acuerdo con la funcionalidad y localización subcelular de los correspondientes productos proteicos (Fig. 4.3). Los tres términos GO más frecuentes en cada categoría fueron: *unión de proteínas* (198 genes), *actividad receptor* (69) y *actividad hidrolasa* (55) en la categoría *función molecular*; *transducción de señal* (100 genes), *desarrollo* (67) y *diferenciación* (38) en la categoría *proceso biológico*; y *citoplasma* (244 genes), *núcleo* (192) y *membrana plasmática* (179) en la categoría *componente celular*. En la Figura 4.4 se representa la frecuencia de genes regulados al alza y a la baja en los términos GO más representativos de cada una de las tres categorías mencionadas. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la distribución de algunos términos GO en genes regulados al alza o a la baja de acuerdo con una prueba χ^2 : *actividad receptor* (menos frecuente en genes regulados al alza en artrosis),

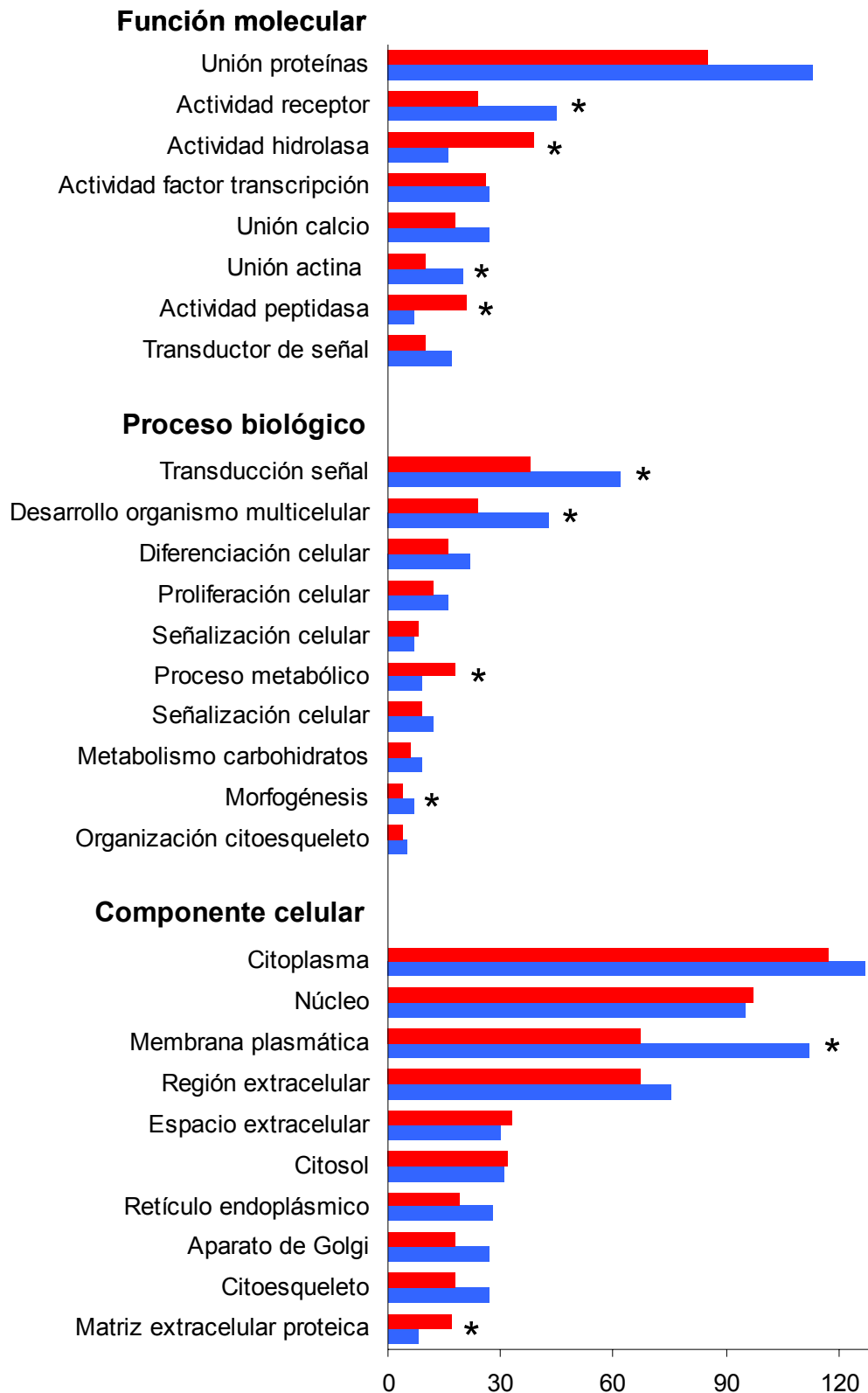


Figura 4.4. Frecuencia de los términos GO más significativos de cada una de las tres categorías funcionales (función molecular, proceso biológico y componente celular) en los genes regulados al alza (rojo) y a la baja (azul) en las MSCs de fenotipo artrósico. Los términos adscritos de forma significativa mayoritaria a genes sobreexpresados o infraexpresados se indican con un asterisco. GO, *gene ontology*; MSC, célula madre mesenquimal.

Tabla 4.2. Conjuntos de genes enriquecidos en el fenotipo control de MSCs de médula ósea

Conjunto	Tamaño ^a			Puntuación enriquecimiento	Puntuación enriquecimiento normalizada	p-valor nominal	q-valor FDR	p-valor TEF
	original ^b	restringido ^c	core ^d					
NKTPATHWAY	29	18	5	-0,76	-1,91	0,001	0,026	0,019
CSKPATHWAY	24	16	9	-0,72	-1,75	0,006	0,093	0,196
Genes de colágeno	43	30	11	-0,63	-1,77	0,007	0,100	0,144

^aEn número de genes; ^bEn la base de datos Biocarta; ^cTras desechar genes ausentes en los datos de expresión; ^dSubconjunto de genes con mayor contribución al enriquecimiento; FDR, proporción de falsos positivos; MSC, célula madre mesenquimal; TEF, tasa de error por familia.

actividad hidrolasa (más frecuente en genes regulados al alza en artrosis), *unión a actina* (menos frecuente) y *actividad peptidasa* (más frecuente) en la categoría *función molecular*; *transducción de señal* (menos frecuente), *desarrollo* (menos frecuente), *proceso metabólico* (más frecuente) y *morfogénesis* (menos frecuente) en la categoría *proceso biológico*; y *membrana plasmática* (menos frecuente) y *MEC proteica* (más frecuente) en la categoría *componente celular*.

Asimismo, el análisis detallado de los elementos comprendidos en los distintos términos GO que se describen en las Figuras 4.3 y 4.4 reveló que el término *región extracelular* de la categoría *componente celular* comprendía los genes de colágeno *COL4A1*, *COL4A2*, *COL8A1*, *COL10A1* y *COL11A1*, los cuales se encontraban claramente infraexpresados en las MSCs de los pacientes con artrosis. Por su parte, en el término *desarrollo* de la categoría *proceso biológico* se encontraron tanto genes homeóticos (*HOXB3*, *HOXC12*, *DLX2*, *HOXB4*, *HOXC13*, *SIX6* y *SHOX*) como otros genes relacionados con la vía de señalización Wnt/ β -catenina (*SFRP2*, *RUNX3*, *BARX1*, *RSPO2*, *RSPO3*, *SPP1* y *DACT1*), todos ellos regulados a la baja.

4.1.3. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

Mediante la aplicación GSEA se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes en el conjunto de los datos de expresión en busca de conjuntos de genes definidos *a priori* que exhibiesen diferencias significativas entre pacientes con artrosis e individuos control. El análisis de enriquecimiento ignora los conjuntos de genes con menos de 15 genes o más de 500 genes, de manera que 148 conjuntos fueron excluidos y el análisis se llevó a cabo sobre 102 conjuntos de genes. Se empleó un test-t para clasificar los genes de cada conjunto en el total de datos procesados. Además, los genes duplicados del conjunto de 26.499 genes procesados se excluyeron del análisis, de manera que finalmente el análisis GSEA se llevó a cabo sobre 14.354 genes. Para el fenotipo artrósico, el análisis de

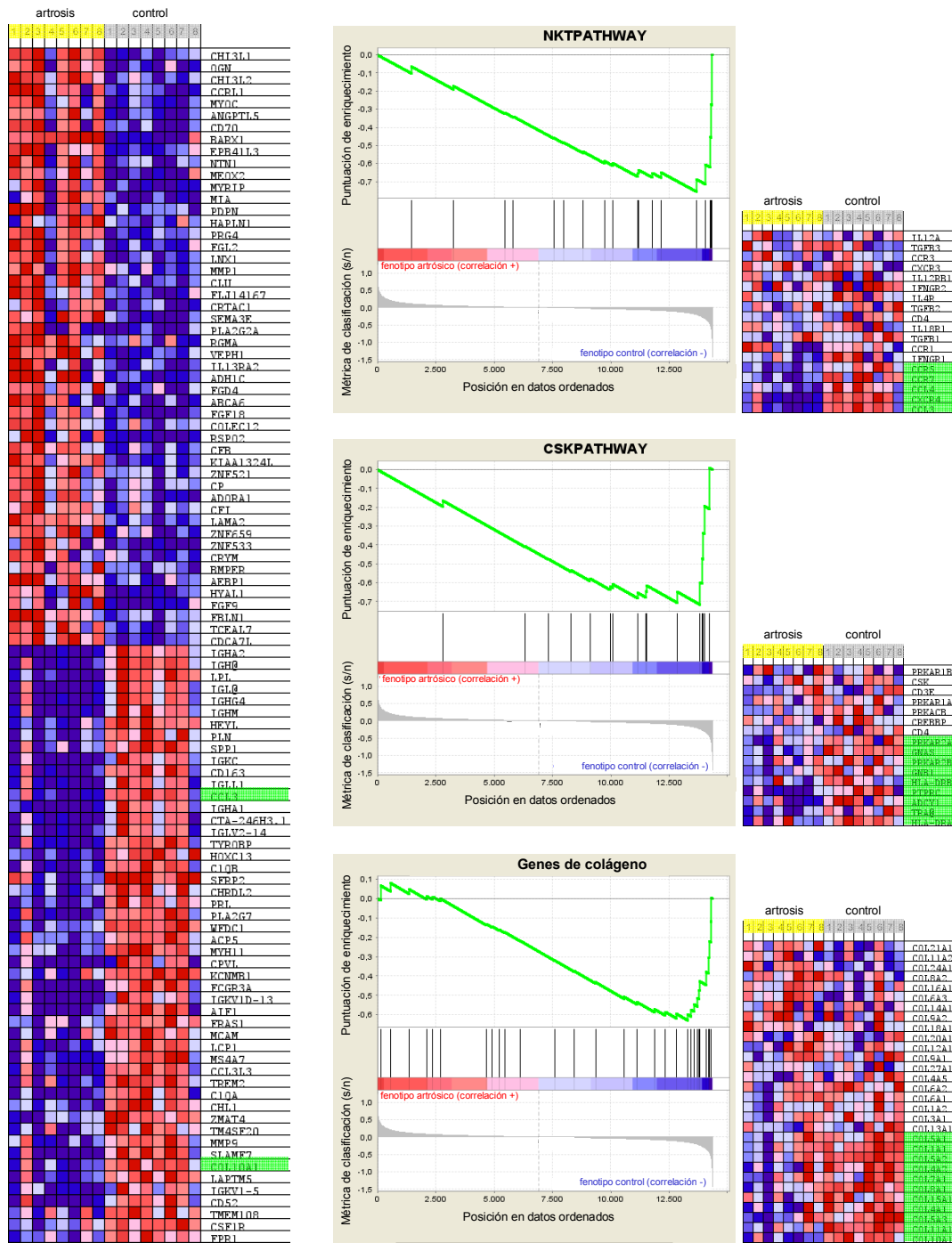


Figura 4.5. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes en MSCs de pacientes con artrosis. Izquierda: diagrama de calor de los 50 genes con mayor nivel de expresión en cada fenotipo (artrosis, n = 8 y control, n = 8) del total de 14.354 elementos de la lista ordenada de genes. Sobre fondo verde se destacan *CCL3* y *COL10A1*, elementos del subconjunto de genes con mayor contribución al enriquecimiento del conjunto NKTPATHWAY y del conjunto de genes de colágeno respectivamente. Derecha: Gráfica de enriquecimiento y diagrama de calor de los tres conjuntos de genes enriquecidos significativamente con FDR < 25%. La parte superior de cada gráfica muestra el perfil de enriquecimiento (■) obtenido a medida que el análisis de enriquecimiento procede a lo largo de la lista ordenada de genes para obtener la puntuación de enriquecimiento en el punto de inflexión de la función. La parte media de la gráfica de enriquecimiento señala las posiciones que ocupan los elementos del conjunto de genes correspondiente en la lista ordenada de genes; los elementos del subconjunto de genes con mayor contribución al enriquecimiento del correspondiente conjunto (destacados sobre fondo verde en el correspondiente diagrama de calor) aparecen a la derecha del punto de inflexión. La parte inferior de la gráfica de enriquecimiento muestra la evolución de la métrica de clasificación (■) a lo largo de la lista ordenada de genes. Los valores negativos indican correlación con el fenotipo control. FDR, proporción de falsos positivos; MSC, célula madre mesenquimal.

enriquecimiento arrojó un total de 32 conjuntos de genes sobreexpresados y ningún conjunto significativamente enriquecido, mientras que en el fenotipo control se sobreexpresaron 70 conjuntos de genes y tres conjuntos se hallaron significativamente enriquecidos con una FDR < 25% ($p < 0,25$): los dos conjuntos de la base de datos Biocarta NKTPATHWAY (FDR = 3%) y CSKPATHWAY (9%) más el conjunto de genes de colágeno (FDR = 10%) (Tabla 4.2). El conjunto de genes NKTPATHWAY está constituido por receptores de quimiocinas expresados por linfocitos CD4+ durante el proceso de polarización celular, receptores que juegan un importante papel en la migración y asentamiento de dichas células, mientras que el conjunto CSKPATHWAY comprende genes implicados en la modulación de la activación de receptores de linfocitos por la Src quinasa C-terminal.

De los 43 elementos que conforman el conjunto de genes de colágeno, 13 fueron descartados por el análisis GSEA por no formar parte de los datos de expresión; entre los 30 elementos restantes se encontró un subconjunto de 11 genes, incluido *COL10A1*, el único marcador molecular de hipertrofia específico de condrocitos descrito hasta la fecha (Zheng *et al.*, 2003), que contribuían de forma esencial al enriquecimiento del conjunto de genes de colágeno en el fenotipo control de MSCs y, consecuentemente, a la infraexpresión de dicho conjunto en el fenotipo artrósico de las MSCs (Fig. 4.5).

4.1.4. Análisis de interacciones proteicas

Mediante la aplicación STRING se construyó un mapa de posibles interacciones entre las proteínas codificadas por los genes comprendidos en el conjunto de los datos de expresión de acuerdo con la información acumulada acerca de interacciones de tipo directo (físicas) e indirecto (funcionales) (Fig. 4.6). Los nodos más importantes (*i.e.* los que centralizan un mayor número e intensidad de interacciones), ampliamente interconectados, de la red de interacciones predichas para las proteínas codificadas por los genes sobreexpresados en las MSCs de pacientes con artrosis están ocupados por genes implicados en la organización de la MEC (*ACAN*, *PRELP* y *PDGFRA*); la proteólisis y el catabolismo de la MEC (*MMP1*, *CH3L1*, *CH3L2*, *ANPEP* y *DPP4*) y la osteogénesis (*BMP4* y *OGN*). Entre los genes infraexpresados los nodos de interacción más relevantes corresponden a constituyentes del colágeno (*COL10A1*, *COL11A1*, *COL4A1*, *COL4A2* y *COL8A1*), así como a genes implicados en la respuesta inmune (*IGHM*, *IGHG4*, *IGLL1*, *IGL@*, *IGHG1*, *C1QA* y *C1QB*); citoesqueleto y motilidad (*SPP1*, *ACTA2*, *CCL3*, *CCL4*, *ENPP2*, *CALD1*, *CXCR4*, *LCP1* y *CNN1*); desarrollo, diferenciación y morfogénesis (*DACT1*, *TAGLN*, *NOG*, *MYH11*, *ELN* y *SORT1*); y apoptosis y transducción de señales (*RUNX3*, *TGFBR1*, *SOCS2* y *NGFR*).

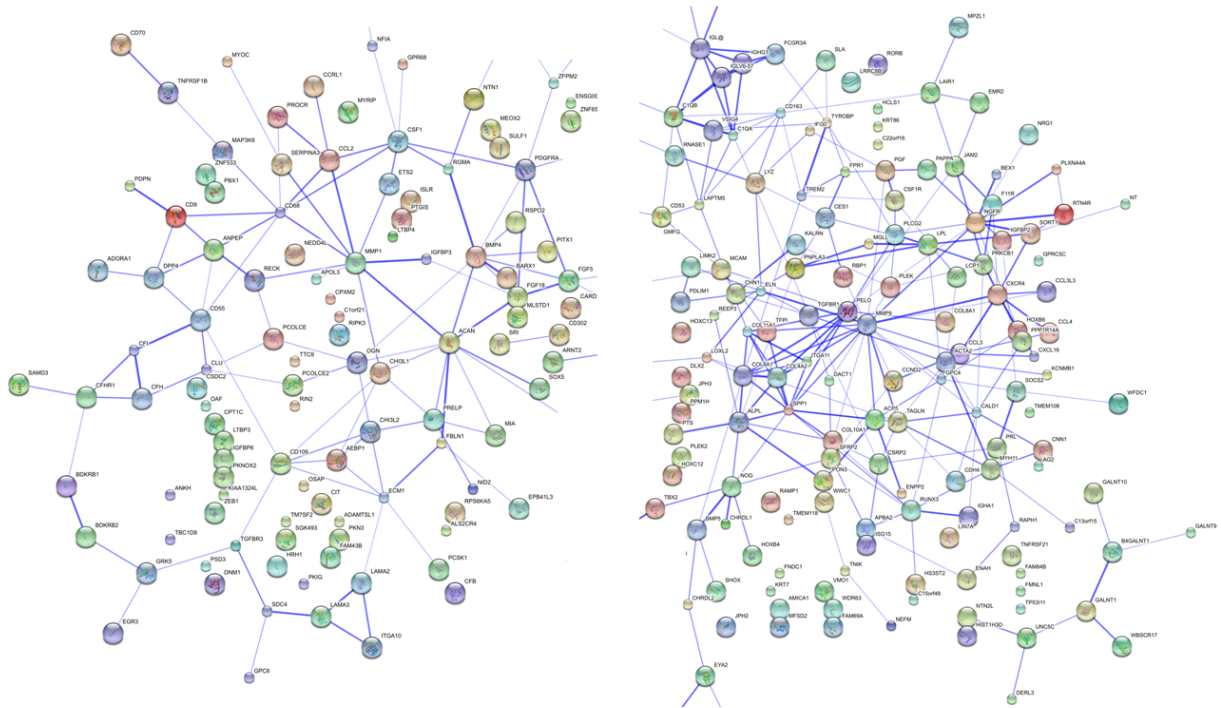


Figura 4.6. Red de interacciones entre las proteínas codificadas por los genes sobreexpresados (izquierda) e infraexpresados (derecha) en las MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis en microarrays. El grosor de las líneas que unen los nodos es proporcional a la intensidad de la interacción. Para facilitar la visualización sólo se muestra el detalle del área más rica en nodos de interacción. MSC, célula madre mesenquimal.

4.2. EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y CONDROCITOS DE PACIENTES CON ARTROSIS

Para el estudio de la expresión diferencial de proteínas en MSCs y condrocitos provenientes de pacientes con artrosis e individuos control se analizaron mediante 2D-DIGE los extractos proteicos obtenidos a partir de los correspondientes cultivos celulares. Un análisis estadístico detallado puso de manifiesto alteraciones significativas en determinadas manchas de proteína que fueron sometidas a digestión en gel en un robot digestor cuyo protocolo de operación había sido previamente optimizado con el objeto de lograr preparaciones sobre el portamuestras MALDI de buena calidad que maximizaran tanto el número de péptidos medidos en el análisis de los digeridos mediante MALDI-MS como su s/n (Fig. 4.7). De este modo se buscaba optimizar el proceso de identificación de las proteínas diferencialmente expresadas mediante búsqueda en bases de datos en términos tanto del porcentaje de identificaciones como de cobertura de secuencia y nivel de significación estadística (Fig. 4.1).

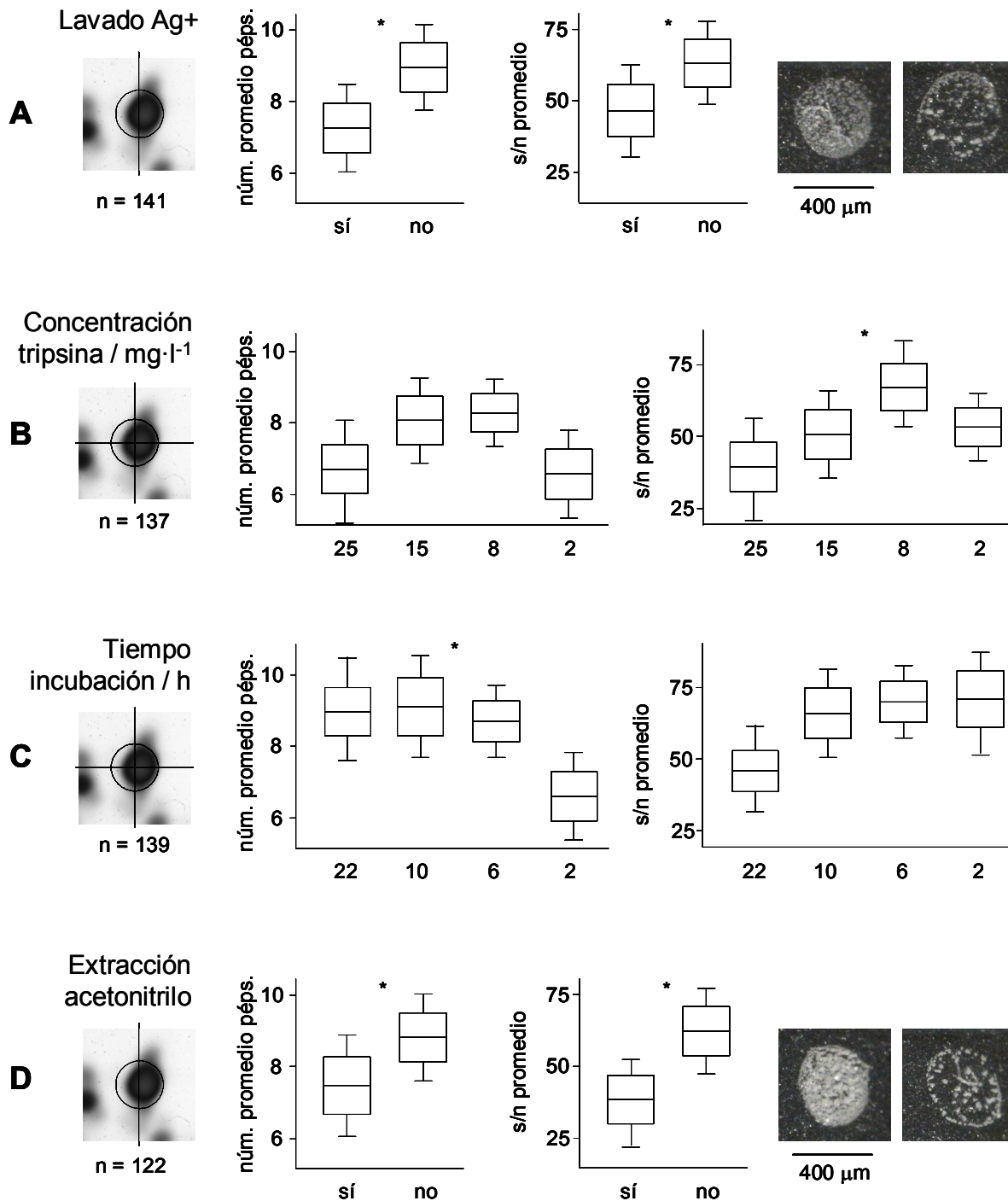


Figura 4.7. Influencia del lavado de iones Ag⁺ (A), la concentración de tripsina (B), el tiempo de incubación con tripsina (C) y la extracción con acetonitrilo (D) en el número promedio de péptidos medidos en los correspondientes espectros MALDI-MS y en su s/n promedio. Se representan los valores máximo y mínimo y la media ± DE obtenidos a partir de tres preparaciones MALDI de cada uno de los digeridos de las fracciones de gel obtenidas a partir de un total de 539 manchas de proteína recortadas de geles 2D de MSCs. En (A) y (D) se muestra una imagen representativa de la correspondiente preparación en el portamuestras MALDI en la que se acusa una pérdida de calidad al efectuar el lavado y la extracción respectivamente. El asterisco indica p-valores menores de 0,05, los cuales se consideraron significativos. DE, desviación estándar; MALDI, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; MS, espectrometría de masas; MSC, célula madre mesenquimal; núm., número; péps., péptidos; s/n, relación señal/ruido.

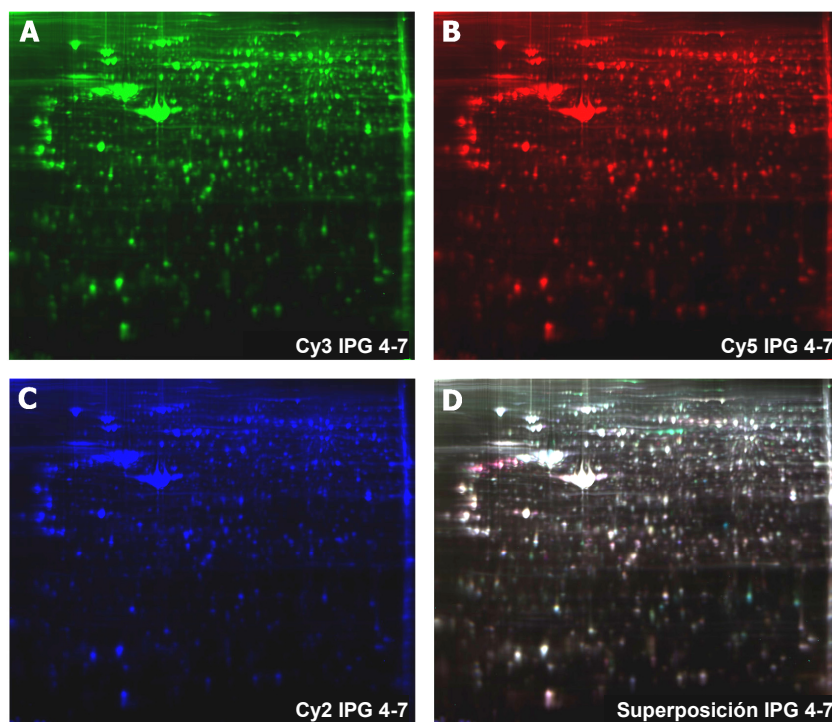


Figura 4.8. Imagen representativa de la tinción diferencial de extractos proteicos de MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis (A), individuos control (B) y de la mezcla equimolecular de ambos empleada como estándar interno (C). En (D) se muestra la imagen resultante de la superposición de las tres anteriores. El pH varía de 4 a 7 de izquierda a derecha. MSC, célula madre mesenquimal.

4.2.1. Análisis de células madre de pacientes con artrosis

4.2.1.1. Electroforesis diferencial en geles bidimensionales

Se analizaron mediante 2D-DIGE los extractos proteicos de MSCs de médula ósea de seis pacientes con artrosis y seis individuos control con fractura de cadera sin artrosis. La Figura 4.8 muestra una imagen representativa de la tinción diferencial de estas proteínas, en la cual las proteínas de la muestra de artrosis aparecen en color verde (fluoróforo Cy3), las del control en rojo (fluoróforo Cy5) y las del estándar interno, compuesto por la mezcla equimolecular de ambos, en azul (fluoróforo Cy2). Mediante el módulo DIA del programa de análisis diferencial DeCyder (GE Healthcare) se detectaron un total de 2.384 ± 92 manchas (media \pm DE; $n = 6$ artrosis; $n = 6$, controles) en cada gel analítico que había sido cargado con $50 \mu\text{g}$ de extracto proteico total. Uno de los geles fue excluido del análisis estadístico multivariante debido a que su insuficiente resolución en la región alcalina de pI provocaba una notable disminución del número de manchas comunes a los seis geles. A partir del análisis de componentes principales integrado en el módulo EDA se observó un patrón de manchas proteicas diferencial entre muestras de artrosis y controles (Fig 4.9). Del total de proteínas detectadas se seleccionaron para su ulterior análisis aquéllas cuya ratio promedio

de cambio entre muestras de artrosis y controles era igual o superior a 1,5 veces de manera significativa ($n = 5$ en ambos grupos, test t , $p < 0,05$). De esta manera se encontraron 73 manchas significativamente alteradas.

4.2.1.2. Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas

Las 73 manchas significativamente alteradas fueron recortadas manualmente de geles teñidos con AgNO_3 (Fig. 4.10 A) y las correspondientes proteínas digeridas *in situ* para posteriormente ser sometidas al proceso de identificación basado en espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos. Mediante este abordaje pudieron identificarse proteínas de manera significativa ($p < 0,05$) en un total de 60 manchas (82%). Como ejemplos ilustrativos del proceso, la Figura 4.10 B muestra la representación tridimensional proporcionada por el programa DeCyder de las proteínas identificadas en tres de las 60 manchas, mientras que en la Figura 4.10 C aparecen los espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS que se emplearon para dicha identificación; estos ejemplos ilustran la disminución del nivel de vimentina y el aumento de los niveles de catepsina B y estatmina 1 en las MSCs de pacientes con artrosis frente a los controles.

La Tabla 4.3 muestra los detalles más relevantes acerca de las proteínas identificadas, clasificadas de acuerdo con su función biológica, así como las ratios promedio de cambio y los p -valores proporcionados por el programa DeCyder. Excluyendo las manchas

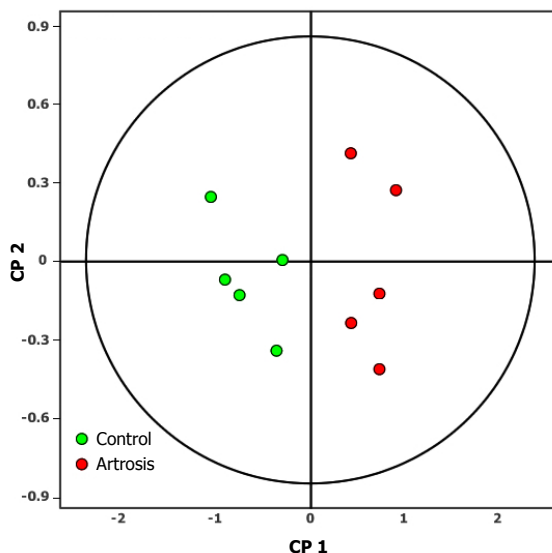


Figura 4.9. Análisis de componentes principales de los patrones de manchas proteicas de MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis y controles. MSC, célula madre mesenquimal.

en las que se identificaron queratinas humanas (manchas 17, 23, 32, 36 y 54) o albúminas (manchas 35, 39, 40, 42 y 55), se identificaron 38 proteínas distintas, de las cuales cinco aparecen en diversas manchas del gel teñido con AgNO_3 (Fig. 4.10 A) correspondientes a movilidades aparentes comparables y puntos isoeléctricos distintos: vimentina (gi|340219; manchas 2, 4, 6, 8 y 9), anexina V (gi|4502107; manchas 10 y 11), GRP78 (gi|386758; manchas 12 y 14), proteína de choque térmico 27 (gi|662841; manchas 16, 24, 27 y 38) y triosafosfato isomerasa 1 (gi|17389815;

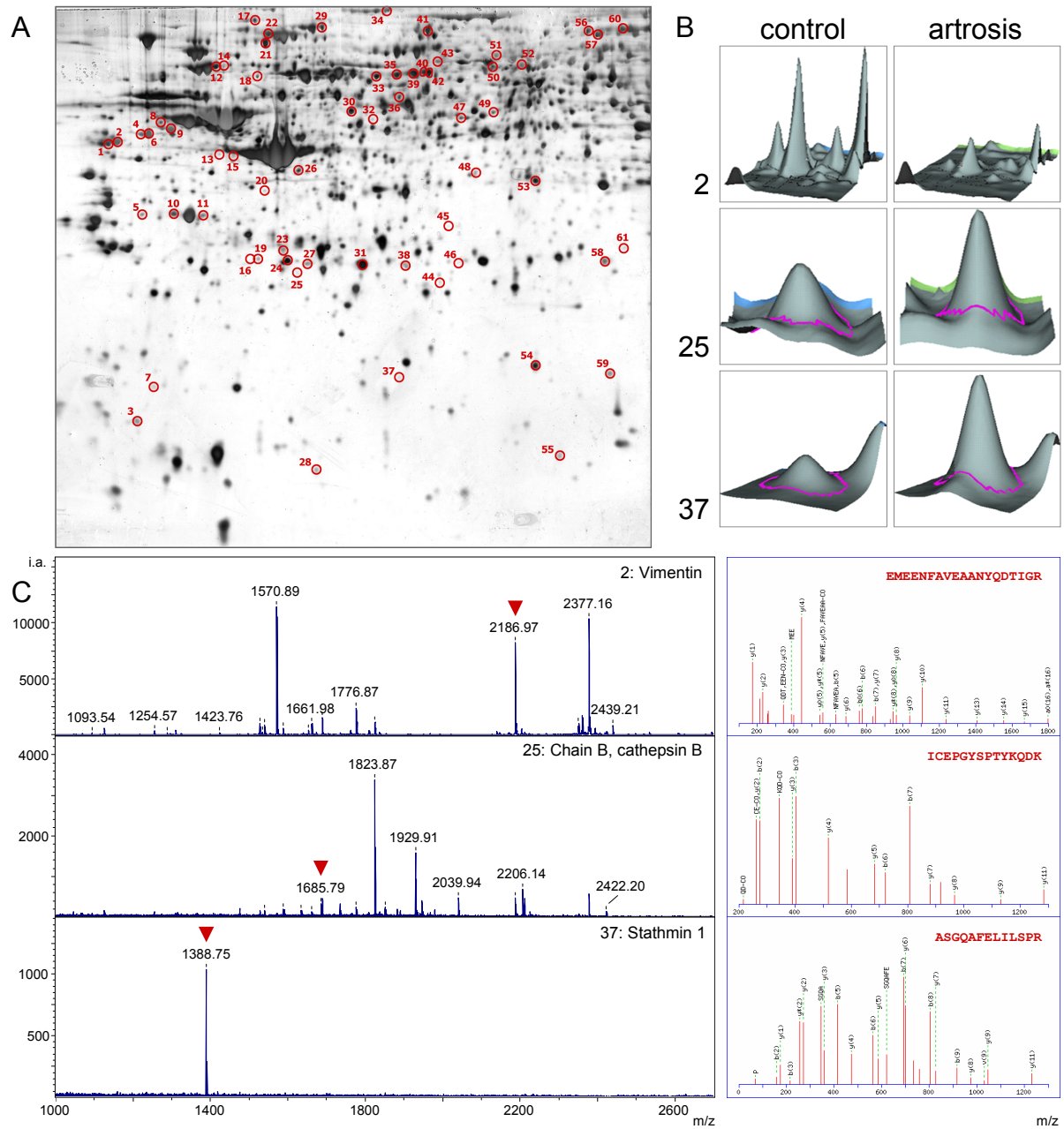


Figura 4.10. Estudio de la expresión diferencial de proteínas en MSCs de pacientes con artrosis. (A) Gel bidimensional de proteínas de MSCs teñido con AgNO_3 . Las manchas para las cuales el análisis estadístico cuantitativo mostró una ratio de cambio en la expresión $\geq 1,5$ veces junto con $p < 0,05$ en el test de Student se destacan en círculos y numeradas en orden creciente de pI y MM. El pH varía de 4 a 7 de izquierda a derecha. (B) Representación tridimensional de algunas proteínas diferencialmente expresadas en MSCs de pacientes con artrosis en comparación con los individuos control proporcionada por el programa DeCyder. (C) Las manchas correspondientes a proteínas diferencialmente expresadas fueron recortadas del gel y sometidas a digestión con tripsina. Los digeridos fueron analizados mediante MALDI-MS para obtener las correspondientes huellas peptídicas de masa (izquierda), así como los espectros de fragmentación de péptidos seleccionados (indicados mediante ▼) (derecha). Esta información de masa se empleó para la identificación de proteínas (Tabla 4.3 y Tabla Complementaria 3). MALDI-MS, espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; MM, masa molecular; MSC, célula madre mesenquimal; pI, punto isoelectrico.

Tabla 4.3. Proteínas diferencialmente expresadas en MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis mediante 2D-DIGE y MALDI-MS

Mancha ^a	Ratio promedio ^b	p-valor	Código de acceso	Nombre	Puntuación Mascot ^c	Valor esperado	MM /kDa	pI	Núm. péps.	Cob. sec. /%
Citoesqueleto/motilidad										
2	-4,17	8,6·10 ⁻⁴	gi 340219	Vimentin	428	3,2·10 ⁻³⁸	54	5,1	18	46
3	-1,64	8,1·10 ⁻⁴	gi 55957228	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	125	1,2·10 ⁻⁶	13	5,1	2	23
4	-5,56	1,8·10 ⁻⁴	gi 340219	Vimentin	248	6,0·10 ⁻¹⁹	54	5,0	15	36
6	-3,68	1,7·10 ⁻³	gi 340219	Vimentin	364	8,1·10 ⁻³²	54	5,0	17	39
8	-3,68	2,4·10 ⁻⁴	gi 340219	Vimentin	294	8,1·10 ⁻²⁵	54	5,0	16	44
9	-2,43	2,1·10 ⁻³	gi 340219	Vimentin	491	1,6·10 ⁻⁴⁴	54	5,0	21	48
13	-1,61	4,1·10 ⁻³	gi 15277503	Beta-actin	104	1,5·10 ⁻⁴	41	5,6	6	22
16	-1,70	6,5·10 ⁻³	gi 662841	Heat shock protein 27	93	4,6·10 ⁻⁷	22	7,8	1	5
18	+1,85	3,1·10 ⁻³	gi 15126742	Lamin B1	268	1,1·10 ⁻²⁰	67	5,1	10	15
20	-1,76	7,4·10 ⁻³	gi 14389309	Tubulin alpha 6	126	5,1·10 ⁻⁸	51	4,7	7	19
22	-2,61	8,6·10 ⁻³	gi 4501891	Actinin alpha 1	216	5,1·10 ⁻¹⁷	104	4,9	20	23
24	-2,35	9,6·10 ⁻³	gi 662841	Heat shock protein 27	239	8,6·10 ⁻¹⁸	22	7,8	7	33
27	-1,86	2,5·10 ⁻³	gi 662841	Heat shock protein 27	131	3,0·10 ⁻⁷	22	7,8	7	36
37	+7,25	3,0·10 ⁻⁴	gi 15680064	Stathmin 1	112	6,6·10 ⁻⁹	17	8,5	1	10
38	-2,03	4,4·10 ⁻³	gi 662841	Heat shock protein 27	56	3,7·10 ⁻³	22	7,8	1	5
45	-3,20	1,5·10 ⁻³	gi 340219	Vimentin	104	1,5·10 ⁻⁴	54	5,1	7	23
51	-1,93	8,1·10 ⁻³	gi 219898	L-caldesmon II	287	7,5·10 ⁻²³	61	6,3	28	46
52	-2,09	8,5·10 ⁻³	gi 16878176	Moesin	368	6,0·10 ⁻³¹	68	6,0	30	42
53	-1,97	1,5·10 ⁻²	gi 54696696	Annexin A1	255	1,2·10 ⁻¹⁹	39	6,6	16	52
59	+4,30	6,0·10 ⁻³	gi 58530848	Destrin isoform B	98	3,4·10 ⁻⁵	17	8,6	1	7
Enzimas metabólicas										
5	-1,68	1,4·10 ⁻³	gi 119606727	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 5	144	1,8·10 ⁻⁸	20	4,9	2	9
21	+2,50	8,3·10 ⁻³	gi 6005942	Valosin-containing protein	374	8,1·10 ⁻³³	90	5,1	28	45
25	+1,90	3,6·10 ⁻²	gi 999909	Chain B, cathepsin B	201	1,7·10 ⁻¹⁵	23	5,2	7	33
28	-2,42	1,1·10 ⁻⁴	gi 189011546	N-acylsphingosine amidohydrolase 1 isoform B	123	1,1·10 ⁻⁷	47	8,0	2	2
29	+1,85	6,3·10 ⁻³	gi 57209338	Ubiquitin-activating enzyme E1	277	7,5·10 ⁻²²	119	5,4	20	26
33	+1,50	7,6·10 ⁻³	gi 10933784	Aminopeptidase B	364	2,7·10 ⁻³⁰	73	5,5	18	32
41	+1,99	4,1·10 ⁻³	gi 2274968	Glucosidase II	427	7,5·10 ⁻³⁷	107	5,7	28	40
43	-2,34	1,8·10 ⁻³	gi 6996010	Glycyl-tRNA synthetase	135	1,2·10 ⁻⁷	78	5,9	11	20
46	-1,82	5,1·10 ⁻⁶	gi 17389815	Triosephosphate isomerase 1	148	6,0·10 ⁻⁹	27	6,5	9	42
48	+1,50	3,5·10 ⁻²	gi 4506003	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1	252	4,3·10 ⁻¹⁹	38	5,9	10	26
50	-2,50	2,8·10 ⁻²	gi 62087970	Dihydropyrimidinase-like 2 variant	172	2,4·10 ⁻¹¹	69	5,8	12	27
56	+2,80	1,6·10 ⁻²	gi 62739166	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 isoform B	153	1,9·10 ⁻⁹	85	6,3	9	16
57	+1,63	1,6·10 ⁻⁴	gi 62087740	Brain glycogen phosphorylase variant	281	5,5·10 ⁻²²	100	6,5	13	19
58	-1,75	2,0·10 ⁻³	gi 17389815	Triosephosphate isomerase 1	199	4,8·10 ⁻¹⁴	27	6,5	10	39
61	-1,75	9,9·10 ⁻³	gi 4505753	Phosphoglycerate mutase 1 (brain)	153	1,9·10 ⁻¹⁰	29	6,7	8	40

Tabla 4.3 (continuación)

Mancha ^a	Ratio promedio ^b	p-valor	Código de acceso	Nombre	Puntuación Mascot ^c	Valor esperado	MM /kDa	pI	Núm. péps.	Cob. sec. /%
Transportadores										
26	+1,51	9,2·10 ⁻³	gi 13938355	ATP6V1B2 protein	194	1,8·10 ⁻¹³	56	5,4	5	11
30	-2,11	4,7·10 ⁻³	gi 13938355	ATP6V1B2 protein	187	7,5·10 ⁻¹³	56	5,4	11	30
31	-1,92	3,3·10 ⁻³	gi 4758788	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3	190	2,2·10 ⁻¹⁴	30	7,0	6	20
44	+1,72	2,3·10 ⁻²	gi 10835025	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa	214	8,1·10 ⁻¹⁷	28	8,2	8	28
Otros										
1	-3,66	4,2·10 ⁻³	gi 14603330	Reticulocalbin 1, precursor	140	3,8·10 ⁻⁸	39	4,9	6	24
10	-1,61	7,1·10 ⁻³	gi 4502107	Annexin 5	194	1,5·10 ⁻¹³	36	4,7	11	33
11	-2,41	6,5·10 ⁻⁵	gi 4502107	Annexin 5	162	2,4·10 ⁻¹⁰	36	4,7	9	29
12	-4,09	5,9·10 ⁻³	gi 386758	GRP78 precursor	211	1,8·10 ⁻¹⁶	72	5,0	12	26
14	-3,08	2,3·10 ⁻²	gi 386758	GRP78 precursor	147	4,5·10 ⁻¹⁰	72	5,0	9	18
15	-1,81	1,2·10 ⁻³	gi 62897939	Methylosome protein 50	142	1,3·10 ⁻⁹	37	5,0	3	10
19	+1,75	9,4·10 ⁻³	gi 938026	Ran-binding protein 1	132	2,4·10 ⁻⁷	23	5,2	2	17
34	+2,07	7,1·10 ⁻³	gi 31621305	Leucine-rich PPR motif-containing protein	291	3,0·10 ⁻²³	159	5,7	27	24
47	+1,99	1,6·10 ⁻³	gi 48145673	HNRPH1	217	7,5·10 ⁻¹⁶	49	5,8	12	45
49	+2,75	1,4·10 ⁻²	gi 14290607	Selenium binding protein 1	136	9,5·10 ⁻⁸	53	5,9	3	6
60	+1,89	1,9·10 ⁻³	gi 4503483	Eukaryotic translation elongation factor 2	182	2,4·10 ⁻¹²	96	6,4	13	20

^aLa numeración de las manchas de proteína corresponde a la de la Fig. 4.10; ^bLos símbolos "+" y "-" indican aumento o disminución, respectivamente, del nivel de expresión en artrosis en comparación con los controles; ^cLa Tabla Complementaria 3 permite el acceso a espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS, así como a las anotaciones de la base de datos NCBI y a la página de Mascot que describe los resultados de la búsqueda; Cob. sec., cobertura de secuencia; 2D-DIGE, electroforesis diferencial en geles bidimensionales; MALDI, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; MM, masa molecular; MS, espectrometría de masas; MSC, célula madre mesenquimal; Núm. péps., número de péptidos; pI, punto isoelectrico.

manchas 46 y 58). La vimentina (gi|340219) se identificó también a menor movilidad aparente y punto isoelectrico mayor de lo esperado en la mancha 45, posiblemente debido a la fragmentación de esta proteína. La Tabla Complementaria 3, generada mediante la aplicación desarrollada *ad hoc* (Apartado 3.4.10), permite el acceso a espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS, así como a las anotaciones de la base de datos NCBI y a la página de Mascot que describe los resultados de la búsqueda.

4.2.1.3. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas

La mayoría de las proteínas cuyos niveles cambiaron al menos 1,5 veces ($p < 0,05$) pertenecen a las siguientes categorías: enzimas metabólicas (14 proteínas distintas, 37%), citoesqueleto/motilidad (12 proteínas, 32%) y transportadores (3 proteínas, 8%). Ocho (57%) de estas enzimas metabólicas se encontraban sobreexpresadas en las MSCs de pacientes con artrosis, constituyendo el 47% del total de proteínas sobreexpresadas, mientras que la gran mayoría de las proteínas relacionadas con citoesqueleto/motilidad (9 proteínas, 75%) tenían niveles inferiores en los pacientes con artrosis, conformando el 45% del total de proteínas infraexpresadas. En la Figura 4.11 se representa la distribución de las

Tabla 4.4. Clasificación funcional de los dos grupos principales de proteínas diferencialmente expresadas en MSCs de pacientes con artrosis

Citoesqueleto/motilidad			Enzimas metabólicas		
Subcategoría	Nombre	Ratio promedio	Subcategoría	Nombre	Ratio promedio
Proteínas de microfilamento y de remodelación de actina	Beta-actin	-1,61	Metabolismo celular	Chain B, cathepsin B	+1,90
	Actinin alpha 1	-2,61		Ubiquitin-activating enzyme E1	+1,85
	Heat shock protein 27	-1,70, -2,35, -1,86, -2,03		Valosin-containing protein	+2,50
	L-caldesmon II	-1,93		Aminopeptidase B	+1,50
	Moesin	-2,09		Protein phosphatase 1	+1,50
	Destrin isoform B	+4,30		Glycyl-tRNA synthetase	-2,34
			Procollagen-lysine	+2,80	
Proteínas microtubulares y de remodelación de microtúbulos	Tubulin alpha 6	-1,76	Metabolismo celular de carbohidratos	Triosephosphate isomerase 1	-1,82, -1,75
	Stathmin 1	+7,25		Phosphoglycerate mutase 1	-1,75
		Brain glycogen phosphorylase		+1,63	
		Glucosidase II		+1,99	
Filamentos intermedios	Vimentin	-4,17, -5,56, -3,68, -3,68, -2,43, -3,20	Metabolismo celular de lípidos	N-acylsphingosine amidohydrolase 1	-2,42
	Lamin B1	+1,85			
Migración	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	-1,64	Metabolismo celular de nucleótidos	Nudix-type motif 5	-1,68
	Annexin A1	-1,97		Dihydropyrimidinase-like 2	-2,50

MSC, célula madre mesenquimal.

proteínas alteradas en sus distintas categorías funcionales, mientras que la Tabla 4.4 proporciona una clasificación funcional más detallada que señala el grupo de proteínas relacionadas con los microfilamentos y la remodelación de actina por una lado y el de las proteínas relacionadas con el metabolismo celular por otro como la subcategorías que albergan un mayor número de proteínas alteradas.

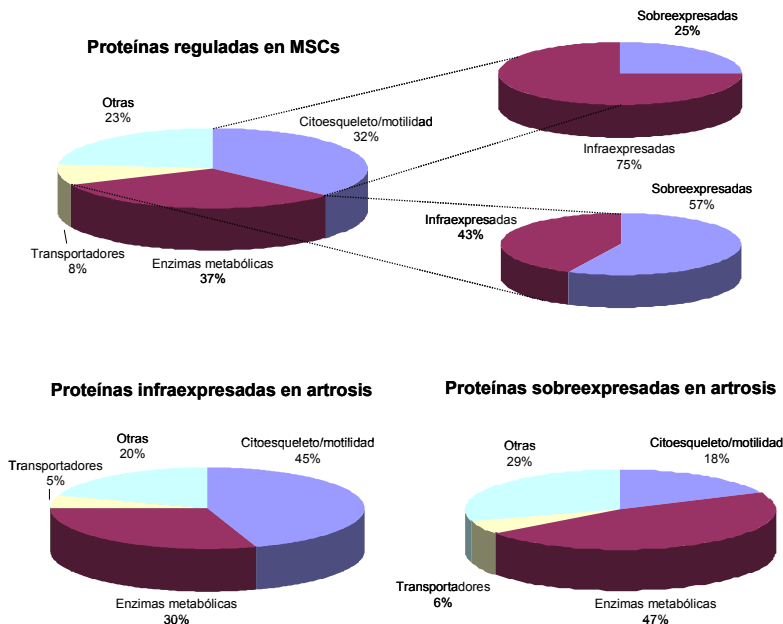


Figura 4.11. Distribución de las proteínas alteradas de MSCs en sus distintas categorías funcionales. MSC, célula madre mesenquimal.

4.2.1.4. Interacciones entre las proteínas diferencialmente expresadas

Mediante la aplicación STRING se elaboró un mapa de posibles interacciones entre las proteínas expresadas de forma diferencial entre MSCs de pacientes con artrosis y controles. Los nodos más importantes (*i.e.* los que centralizan un mayor número e intensidad de interacciones) de esta red de interacciones están ocupados por proteínas relacionadas con citoesqueleto/motilidad, todas ellas interconectadas y reguladas a la baja (vimentina, beta-actina, tubulina alfa 6, alfa actinina y anexina A1) excepto la estatmina, notablemente sobreexpresada en artrosis. Así mismo, dos enzimas metabólicas (proteína con valosina y análoga a dihidropirimidinas 2) ocuparon nodos destacables de la red de interacciones.

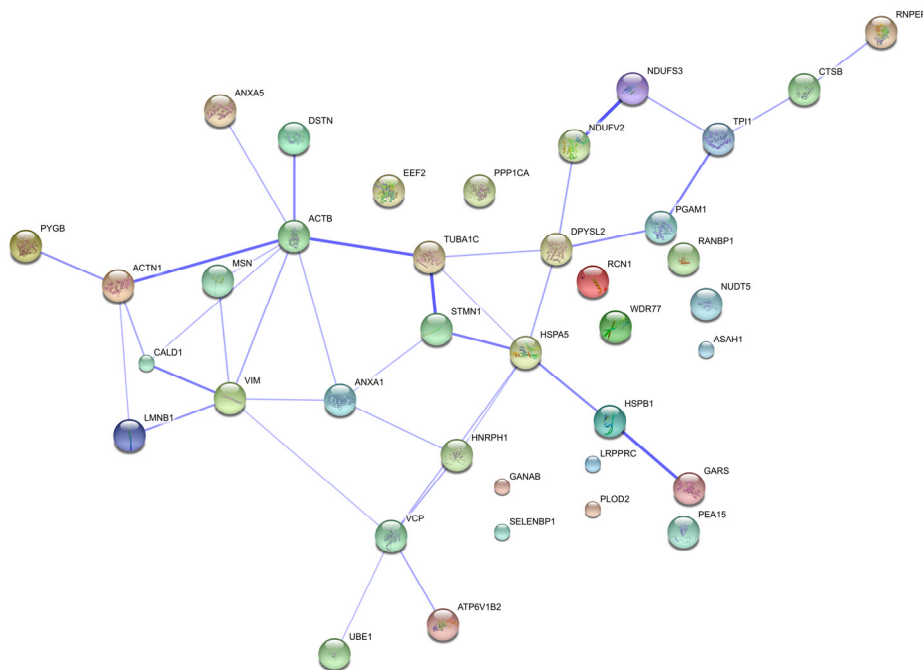


Figura 4.12. Red de interacciones entre las proteínas reguladas diferencialmente en las MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis basado en 2D-DIGE y MALDI-MS. El grosor de las líneas que unen a las proteínas que interactúan es proporcional a la intensidad y número de interacciones. 2D-DIGE, electroforesis diferencial en geles bidimensionales; MALDI, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; MS, espectrometría de masas; MSC, célula madre emsenquimal.

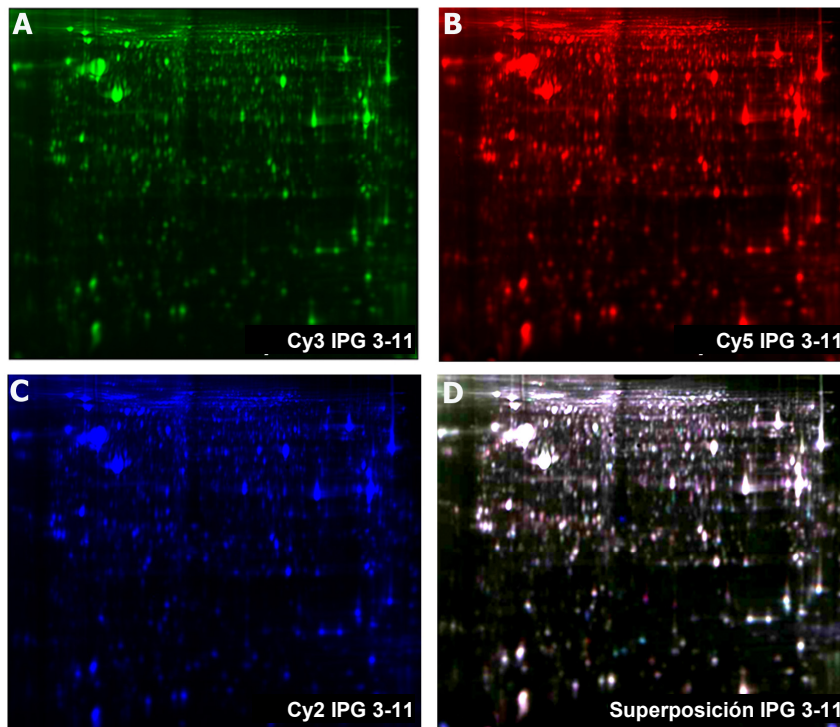


Figura 4.13. Imagen representativa de la tinción diferencial de extractos proteicos de condrocitos de pacientes con artrosis (A), individuos control (B) y de la mezcla equimolecular de ambos empleada como estándar interno (C). En (D) se muestra la imagen resultante de la superposición de las tres anteriores. El pH varía de 3 a 11 de izquierda a derecha.

4.2.2. Análisis de condrocitos de pacientes con artrosis

4.2.2.1. Electroforesis diferencial en geles bidimensionales

Se analizaron mediante 2D-DIGE los extractos proteicos de condrocitos de cartílago de seis pacientes con artrosis y seis individuos control con fractura de cadera sin artrosis. La Figura 4.13 muestra una imagen representativa de la tinción diferencial de estas proteínas, en la cual las proteínas de la muestra de artrosis aparecen en color verde (fluoróforo Cy3), las del control en rojo (fluoróforo Cy5) y las del estándar interno, compuesto por la mezcla equimolecular de ambos, en azul (fluoróforo Cy2). Mediante el módulo DIA del programa de análisis diferencial DeCyder (GE Healthcare) se detectaron un total de 2127 ± 117 manchas (media \pm DE; $n = 6$, artrosis; $n = 6$, controles) en cada gel analítico que había sido cargado con $50 \mu\text{g}$ de extracto proteico total. Dos de los geles fueron excluido del análisis estadístico multivariante debido a que su insuficiente resolución en la región alcalina de pI provocaba una notable disminución del número de manchas comunes a los seis geles. A partir del análisis de componentes principales integrado en el módulo EDA se observó un patrón de manchas proteicas diferencial entre muestras de artrosis y controles (Fig 4.14). Del total de proteínas detectadas se seleccionaron para su ulterior análisis aquellas cuyo ratio promedio de cambio entre muestras de artrosis y controles era igual o superior a 1,2 veces de manera

significativa ($n = 4$ en ambos grupos, test t , $p < 0,05$). De esta manera se encontraron 35 manchas significativamente alteradas.

4.2.2.2. Identificación de las proteínas diferencialmente expresadas

Las 35 manchas significativamente alteradas fueron recortadas manualmente de geles teñidos con AgNO_3 (Fig. 4.15 A) y las correspondientes proteínas digeridas *in situ* para posteriormente ser sometidas al proceso de identificación basado en espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos. Mediante este abordaje pudieron identificarse proteínas de manera significativa ($p < 0,05$) en un total de 29 manchas (83%). Como ejemplos ilustrativos del proceso, la Figura 4.15 B muestra la representación tridimensional proporcionada por el programa DeCyder de las proteínas identificadas en tres de las 29 manchas, mientras que en la Figura 4.15 C aparecen los espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS que se emplearon para dicha identificación; estos ejemplos ilustran la disminución de los niveles de catepsina D cadena B y destrina isoforma B junto con el aumento del nivel de la proteína macrofágica mutante de bloqueo en los condrocitos de pacientes con artrosis frente a los controles.

La Tabla 4.5 muestra los detalles más relevantes acerca de las proteínas identificadas, clasificadas de acuerdo con su función biológica, así como las ratios promedio de cambio y los p-valores proporcionados por el programa DeCyder. Excluyendo la mancha 13, en la que se identificó queratina humana, se identificaron 26 proteínas distintas, de las cuales dos aparecen en dos manchas del gel teñido con AgNO_3 (Fig. 4.15 A)

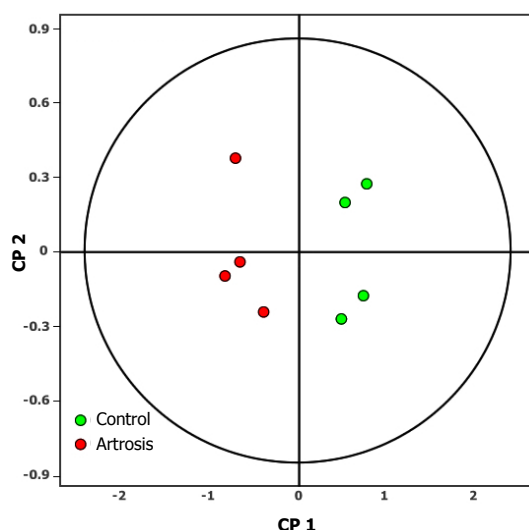


Figura 4.14. Análisis de componentes principales de los patrones de manchas proteicas de condrocitos de pacientes con artrosis y controles.

correspondientes a movilidades aparentes comparables y puntos isoeléctricos distintos: proteína macrofágica mutante de bloqueo (gi|33357110; manchas 10 y 11) y cofilina 1 (gi|5031635; manchas 15 y 26). La Tabla Complementaria 4, generada mediante la aplicación desarrollada *ad hoc* (Apartado 3.4.10), permite el acceso a espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS, así como a las anotaciones de la base de datos NCBI y a la página de Mascot que describe los resultados de la búsqueda.

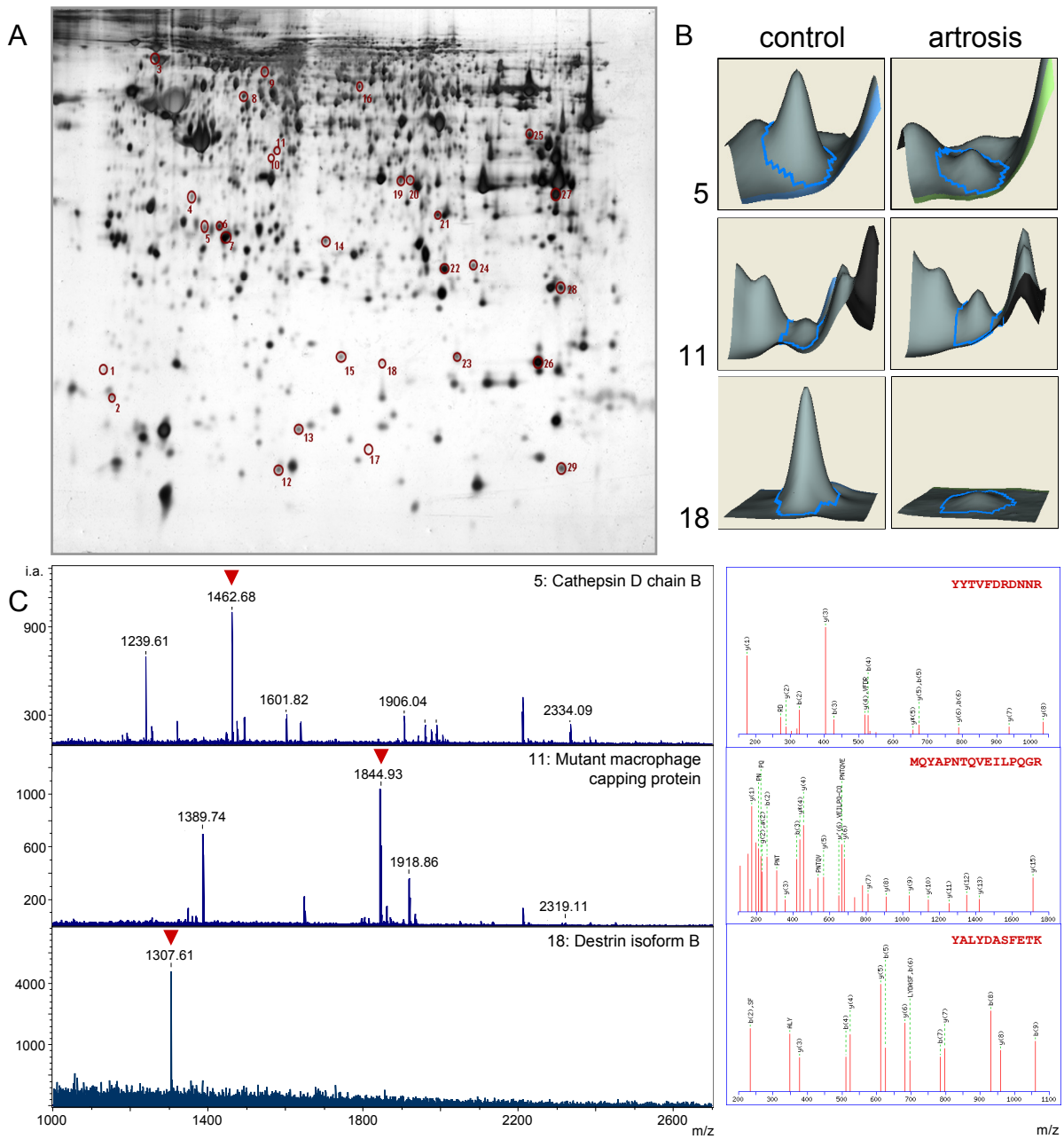


Figura 4.15. Estudio de la expresión diferencial de proteínas en condrocitos de pacientes con artrosis. (A) Gel bidimensional de proteínas de condrocitos teñido con AgNO_3 . Las manchas para las cuales el análisis estadístico cuantitativo mostró una ratio de cambio en la expresión $\geq 1,2$ veces junto con $p < 0,05$ en el test de Student se destacan en círculos y numeradas en orden creciente de pI y MM. El pH varía de 3 a 11 de izquierda a derecha. (B) Representación tridimensional de algunas proteínas diferencialmente expresadas en condrocitos de pacientes con artrosis en comparación con los individuos control proporcionada por el programa DeCyder. (C) Las manchas correspondientes a proteínas diferencialmente expresadas fueron recortadas del gel y sometidas a digestión con tripsina. Los digeridos fueron analizados mediante MALDI-MS para obtener las correspondientes huellas peptídicas de masa (izquierda), así como los espectros de fragmentación de péptidos seleccionados (indicados mediante \blacktriangledown) (derecha). Esta información de masa se empleó para la identificación de proteínas (Tabla 4.5 y Tabla Complementaria 4). MALDI-MS, espectrometría de masas de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; MM, masa molecular; pI, punto isoelectrico.

Tabla 4.5. Proteínas diferencialmente expresadas en condrocitos de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis mediante 2D-DIGE y MALDI-MS

Mancha ^a	Ratio promedi	p-valor	Código de acceso	Nombre	Puntuación	Valor esperado	MM /kDa	pI	Núm. péps.	Cob. sec.
Citoesqueleto										
10	+1,81	3,7·10 ⁻²	gij33357110	Mutant macrophage capping protein	87	8,4·10 ⁻³	39	5,4	1	3
11	+1,54	2,6·10 ⁻²	gij33357110	Mutant macrophage capping protein	231	1,0·10 ⁻¹⁸	39	5,4	4	19
15	-4,34	5,1·10 ⁻⁴	gij5031635	Cofilin 1 (non-muscle)	139	5,5·10 ⁻⁸	19	8,2	3	18
18	-4,05	1,1·10 ⁻⁵	gij58530848	Dextrin isoform B	111	5,5·10 ⁻⁵	17	8,6	1	7
19	+1,27	3,7·10 ⁻²	gij5453710	LIM and SH3 protein 1	147	2,2·10 ⁻⁸	30	6,6	9	35
20	+1,36	2,8·10 ⁻²	gij4757756	Annexin A2 isoform 2	260	2,2·10 ⁻²¹	39	7,6	12	28
23	+1,31	3,5·10 ⁻²	gij14719392	Cofilin 2	140	4,4·10 ⁻⁸	19	7,7	3	18
26	-1,26	8,3·10 ⁻⁴	gij5031635	Cofilin 1 (non-muscle)	134	1,7·10 ⁻⁷	19	8,2	8	32
Unión de proteínas										
3	-1,44	1,5·10 ⁻⁴	gij386758	GRP78 precursor	142	2,8·10 ⁻⁸	72	5,0	10	22
4	+1,50	1,6·10 ⁻²	gij47933379	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	305	1,4·10 ⁻²⁴	34	5,2	16	63
7	-1,24	2,5·10 ⁻²	gij7330335	Chloride intracellular channel 4	161	3,5·10 ⁻¹⁰	29	5,5	4	19
17	+1,22	3,7·10 ⁻²	gij11496277	MAPK scaffold protein 1	132	1,4·10 ⁻⁸	14	6,7	3	49
25	-1,25	1,2·10 ⁻²	gij58761500	Obg-like ATPase 1 isoform 1	242	1,4·10 ⁻¹⁹	45	7,6	8	23
28	-1,28	1,4·10 ⁻³	gij4502011	Adenylate kinase 1	191	3,5·10 ⁻¹³	22	8,7	10	44
29	+1,26	3,3·10 ⁻²	gij4504523	Heat shock 10kDa protein 1	124	1,7·10 ⁻⁶	11	8,9	3	19
Actividad hidrolasa										
1	-1,43	6,9·10 ⁻³	gij23110932	Proteasome beta 9 subunit isoform 2 proprotein	139	5,5·10 ⁻⁸	22	4,9	3	18
2	+1,27	5,7·10 ⁻³	gij67464262	Human B type phosphoglycerate mutase	136	5,4·10 ⁻⁹	30	6,7	7	34
5	-1,92	1,8·10 ⁻²	gij494296	Cathepsin D, chain B	240	1,3·10 ⁻¹⁹	26	5,3	7	45
8	+1,23	2,4·10 ⁻²	gij19913428	Vacuolar H+ATPase B2	141	3,5·10 ⁻⁸	57	5,4	8	25
16	-1,56	2,9·10 ⁻²	gij4503379	Dihydropyrimidinase-like 3	144	1,7·10 ⁻⁸	62	6,0	9	20
Actividad oxidorreductasa										
21	+1,26	3,2·10 ⁻²	gij4503607	Electron transfer flavoprotein, alpha polypeptide	177	8,8·10 ⁻¹²	35	8,6	4	21
27	-1,29	5,2·10 ⁻³	gij5031857	Lactate dehydrogenase A	131	3,5·10 ⁻⁷	37	8,4	8	30
Otros										
6	-1,32	3,8·10 ⁻²	gij30410792	Proteasome activator subunit 2	197	8,7·10 ⁻¹⁴	28	5,4	6	27
9	-1,24	4,2·10 ⁻³	gij19920317	Cytoskeleton-associated protein 4	180	4,4·10 ⁻¹²	66	5,6	14	35
12	+1,34	1,3·10 ⁻²	gij10140853	Diazepam binding inhibitor	268	6,9·10 ⁻²¹	12	6,1	4	53
14	+1,38	1,1·10 ⁻²	gij5803013	Endoplasmic reticulum protein 29 isoform 1 precursor	182	2,8·10 ⁻¹²	29	6,8	10	34
22	-1,25	2,4·10 ⁻²	gij14702180	Eukaryotic translation initiation factor 4H isoform 2	104	1,7·10 ⁻⁴	25	7,8	7	38
24	+1,23	3,2·10 ⁻²	gij83715985	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10 isoform 2	151	3,5·10 ⁻⁹	27	6,7	7	38

^aLa numeración de las manchas de proteína corresponde a la de la Fig. 4.15; ^bLos símbolos "+" y "-" indican aumento o disminución, respectivamente, del nivel de expresión en artrosis en comparación con los controles; ^cLa Tabla Complementaria 4 permite el acceso a espectros MALDI-MS y MALDI-MS/MS, así como a las anotaciones de la base de datos NCBI y a la página de Mascot que describe los resultados de la búsqueda; Cob. sec., cobertura de secuencia; 2D-DIGE, electroforesis diferencial en geles bidimensionales; MALDI, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; MM, masa molecular; MS, espectrometría de masas; Núm. péps., número de péptidos; pI, punto isoelectrico.

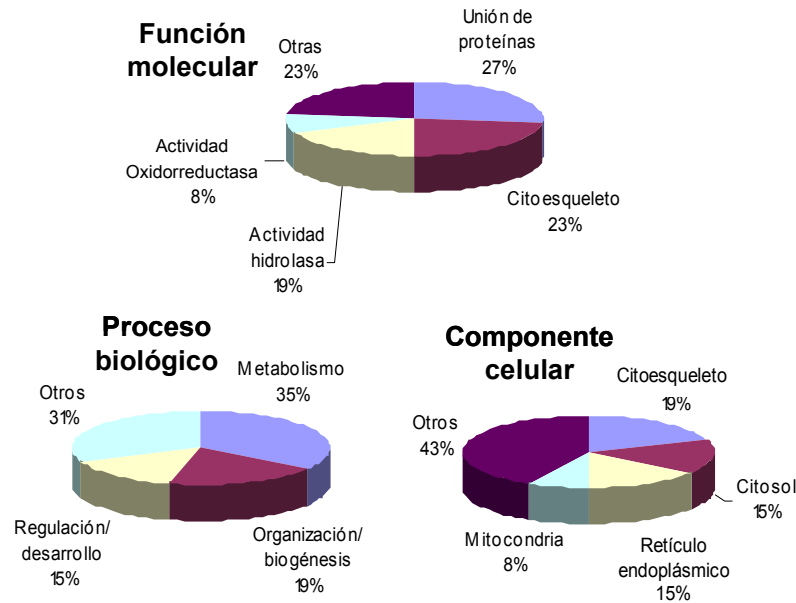


Figura 4.16. Distribución de las proteínas alteradas de condrocitos en sus distintas categorías funcionales.

4.2.2.3. Clasificación funcional de las proteínas diferencialmente expresadas

Las proteínas cuyos niveles cambiaron al menos 1,2 veces ($p < 0,05$) se agrupan principalmente en las siguientes categorías funcionales: unión de proteínas (siete proteínas distintas, 27%), citoesqueleto (seis proteínas distintas, 23%), actividad hidrolasa (cinco proteínas, 19%) y actividad oxidorreductasa (dos proteínas, 8%). El número de proteínas significativamente reguladas al alza y a la baja en los condrocitos de pacientes con artrosis fue de 13 (50%) en ambos casos. En la Figura 4.16 se representa la distribución de las proteínas alteradas en sus distintas categorías funcionales.

4.2.2.4. Interacciones entre las proteínas diferencialmente expresadas

Mediante la aplicación STRING se elaboró un mapa de posibles interacciones entre las proteínas expresadas de forma diferencial entre condrocitos de pacientes con artrosis y controles. Se encontraron dos nodos interconectados que concentraban interacciones con al menos tres proteínas: cofilina 1 (proteína de citoesqueleto regulada a la baja en artrosis) y proteína de retículo endoplásmico 29 (relacionada con el procesamiento de proteínas secretadas en el retículo endoplásmico y regulada al alza).

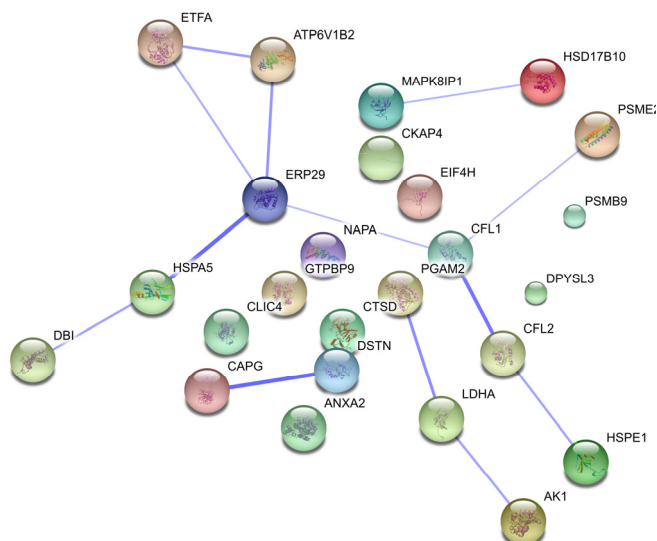


Figura 4.17. Red de interacciones entre las proteínas reguladas diferencialmente en los condrocitos de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis basado en 2D-DIGE y MALDI-MS. El grosor de la líneas que unen a las proteínas que interactúan es proporcional a la intensidad y número de interacciones. 2D-DIGE, electroforesis diferencial en geles bidimensionales; MALDI, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; MS, espectrometría de masas.

4.2.3. Validación de los estudios de expresión proteica mediante SRM

Los experimentos de SRM llevados a cabo en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo híbrido permiten filtrar de manera muy selectiva secuencias peptídicas seleccionadas correspondientes a una determinada proteína de interés. Este filtrado es doble, ya que los iones precursores se seleccionan tanto por su masa (en el primer cuadrupolo, Q1) como por las de algunos de sus iones fragmento (en el tercer cuadrupolo, Q3) producidos por fragmentación inducida, a los que se denomina iones diagnóstico (Fig. 1.11). Se seleccionaron ocho proteínas, entre un total de 38, que habían sido encontradas reguladas en las MSCs de pacientes con artrosis mediante el análisis de la expresión proteica diferencial basado en 2D-DIGE y MALDI-MS (Apartado 4.2.1). De estas ocho proteínas para las que se midieron las transiciones SRM apropiadas se validaron cinco proteínas cuyos niveles de expresión arrojaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre pacientes y controles (tubulina $\alpha 6$, catepsina B, análoga a dihidropirimidinas 2, L-caldesmon II y destrina isoforma B), como muestran los correspondientes cromatogramas de iones extraídos (XIC) y gráficos de caja (Fig. 4.18). Las restantes proteínas mostraron en los ensayos SRM una tendencia acorde con los resultados del estudio de expresión proteica diferencial, si bien no arrojaron diferencias significativas entre pacientes y controles.

Mancha ^a	Ratio promedio ^b	Proteína	Secuencia precursor	Q1(carga)	Q3(ion)	XIC
20	-1,76	Tubulina α 6	DVNAAIATIK LISQIVSSITASLR	508,3(+2) 744,4(+2)	801,4(y8) 933,5(y9)	a b
25	+1,90	Catepsina B	LPASFDAR NGPVEGAFSVYSDFLLYK	438,7(+2) 1003,5(+2)	666,3(y6) 1048,5(y8)	c d
50	-2,50	Análoga a dihidropirimidinas 2	VFNLYPR IAVGSDADLVIWDPDSVK IAVGSDADLVIWDPDSVK	454,7(+2) 950,5(+2) 950,5(+2)	662,3(y5) 545,7(y6) 846,4(y7)	e f g
51	-1,93	L-caldesmon II	GNVFSPTAAGTPNK	724,4(+2)	856,5(y9)	h
59	+4,30	Destrina isoforma B	YALYDASFETK	654,3(+2)	797,4(y7)	i

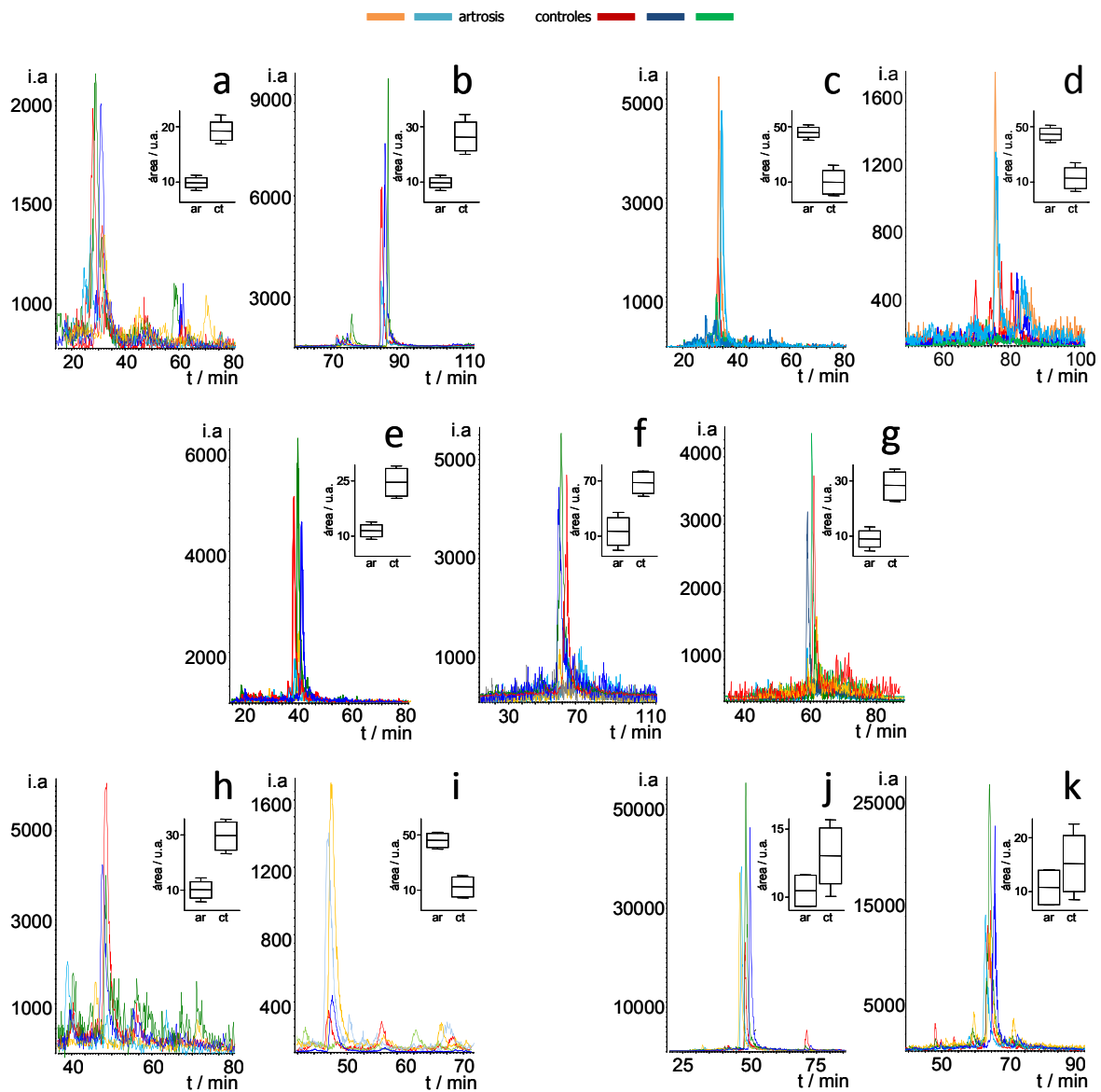


Figura 4.18. Análisis SRM de proteínas encontradas reguladas en MSCs de pacientes con artrosis mediante 2D-DIGE y MALDI-MS. Se muestra, para los valores considerados significativos ($p < 0,05$), el XIC junto con los valores máximo y mínimo y la media \pm DE obtenidos midiendo las áreas de cada una de las transiciones que se detallan en la tabla (a-i) junto con los obtenidos de dos transiciones correspondientes a péptidos de piruvato quinasa (j, k) empleados para normalizar los valores (GDLGIEIPAEEK: 571,3(+2) \rightarrow 686,4(y6); IYVDDGLISLQVK: 731,9(+2) \rightarrow 574,4(y5)). ^aLa numeración de las manchas de proteína corresponde a la de la Fig. 4.10; ^bLos símbolos "+" y "-" indican aumento o disminución, respectivamente, del nivel de expresión en artrosis en comparación con los controles según el análisis mediante 2D-DIGE; ar, artrosis; ct, controles; DE, desviación estándar; 2D-DIGE, electroforesis diferencial en geles bidimensionales; MALDI, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz; MS, espectrometría de masas; SRM, monitorización selectiva de reacciones; XIC, cromatograma de iones extraídos.

4.3. Ensayos quimiotácticos

Dado que el estudio de la expresión proteica diferencial de MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis indicaba la regulación de proteínas implicadas en reorganización del

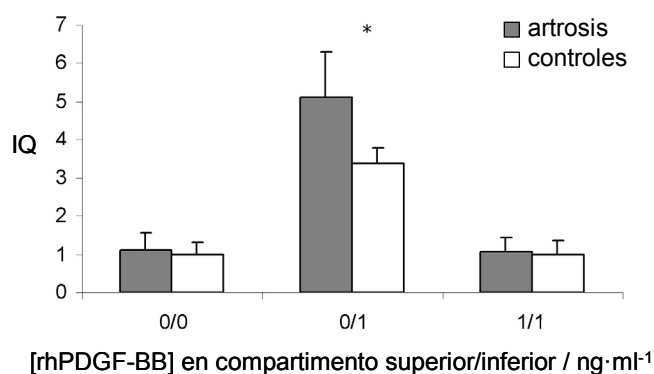


Figura 4.19. Respuesta quimiotáctica de MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis en comparación con individuos control a 1 ng/ml de rhPDGF-BB. El asterisco indica p-valores menores de 0,05, los cuales se consideraron significativos. IQ, índice quimiotáctico; MSC, célula madre mesenquimal; rhPDGF, factor de crecimiento plaquetario humano recombinante.

con el cual Fiedler *et al.* (2002) calcularon un IQ máximo a 1 ng/ml. Los resultados de la medida de la respuesta quimiotáctica en cámaras de cultivo celular de 24 pocillos tipo Transwell se muestran en la Figura 4.19, donde se aprecia un aumento significativo de la respuesta migratoria de las MSCs provenientes de pacientes con artrosis en comparación con los controles (IQ $5,13 \pm 1,19$ frente a $3,35 \pm 0,42$; $p = 0,043$) cuando se añade 1 ng/ml de rhPDGF-BB al compartimento inferior de la inserción Transwell. Cuando la concentración de rhPDGF-BB es idéntica en los compartimentos superior e inferior no se observan cambios significativos en la respuesta migratoria de las MSCs (Fig. 4.20).

citoesqueleto y motilidad celular, y habida cuenta de que la respuesta migratoria de las MSCs al daño tisular tiene lugar de acuerdo con un gradiente quimiotáctico (Fiedler *et al.*, 2002; Fiedler *et al.*, 2004), se investigó la respuesta quimiotáctica de las MSCs provenientes de médula ósea de pacientes con artrosis empleando MSCs de individuos sanos como control. La migración de las MSCs se estimuló mediante la adición de rhPDGF-BB, un potente factor quimiotáctico de células mesenquimales dosis-dependiente

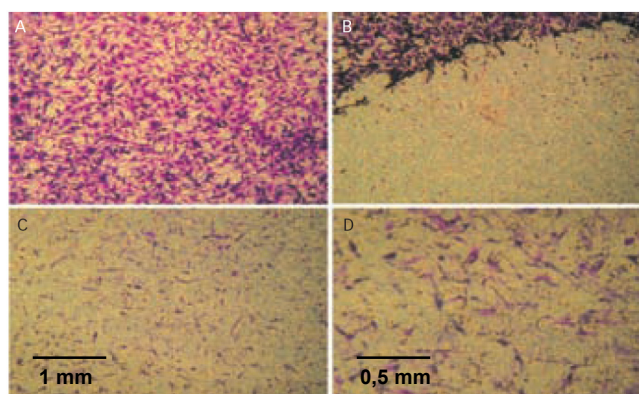


Figura 4.20. Tinción con violeta cristal de la membrana microporosa de la cámara de cultivo celular empleada en el ensayo quimiotáctico con MSCs. (A) Preincubación con MSCs adherentes. (B) Incubación con MSCs control en ausencia de rhPDGF-BB. (C) y (D) Incubación de 6 h con MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis en presencia de rhPDGF-BB. MSC, célula madre mesenquimal; rhPDGF, factor de crecimiento plaquetario humano recombinante.

5. Discusión

Aunque los mecanismos moleculares implicados en la artrosis son todavía desconocidos, ciertas evidencias señalan al cartílago y al hueso subcondral como elementos protagonistas en la generación de dolor y la progresión de una enfermedad en la que las alteraciones metabólicas y la predisposición genética conducen a una MEC defectuosa (Aspden, 2008). La MEC, rica en colágeno y secretada por los condrocitos, progenie condrogénica de las MSCs que constituye el único componente celular del cartílago, proporciona la estructura básica del cartílago y juega un papel esencial en la biología del hueso durante el desarrollo embrionario, la osificación endocondral y la remodelación ósea. Posiblemente uno de los motivos por los que ocurre la degeneración del cartílago resida en su limitada capacidad de regeneración, razón por la cual las terapias basadas en el empleo de células dotadas de potencial regenerador constituyen un abordaje prometedor (Clouet *et al.*, 2009; Dray y Read, 2007).

Los condrocitos han mostrado cierta capacidad de regeneración del cartílago articular (Jiang *et al.*, 2010), pero al tratarse de células ya diferenciadas y con una función biológica definida su uso en transplantes autólogos es problemático debido a factores como la dediferenciación y la senescencia. Por ello las MSCs, células progenitoras multipotenciales capaces de autorenovarse y de diferenciarse en distintas células del tejido conectivo (Pittenger *et al.*, 1999) cuyo reservorio principal es la médula ósea (Caplan, 2005), han suscitado recientemente gran interés por su potencial aplicación en la terapia celular de enfermedades reumáticas (Djouad *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2010). Por esta razón, y con el fin de ampliar nuestro conocimiento sobre el papel que distintos tipos celulares pudieran jugar en la patogénesis de la artrosis, en este trabajo se han buscado genes y proteínas alterados en MSCs de médula ósea y en condrocitos del cartílago articular de pacientes con artrosis mediante ensayos comparativos tanto de genómica como de proteómica basados, respectivamente, en microarrays de ADN y electroforesis bidimensional diferencial.

5.1. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE PACIENTES CON ARTROSIS

Los cambios en la expresión génica no sólo se ponen de manifiesto en genes individuales, sino que afectan a rutas de señalización, grupos funcionales de genes o redes de regulación génica. Por ello en este trabajo hemos buscado procesos biológicos, moleculares o reguladores que pudieran encontrarse significativamente alterados en las MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis. Una patología compleja como la artrosis es muy probablemente el resultado de pequeñas alteraciones coordinadas de la expresión o de la actividad de numerosas proteínas, de tal manera que los cambios de expresión de algunos de los genes implicados podrían no alcanzar el valor umbral necesario que ponga dichos genes de manifiesto en el análisis de microarrays (Mootha *et al.*, 2003). Algunos métodos de análisis de desarrollo reciente como GSEA permiten detectar pequeños cambios coordinados en la expresión de grupos de genes relacionados

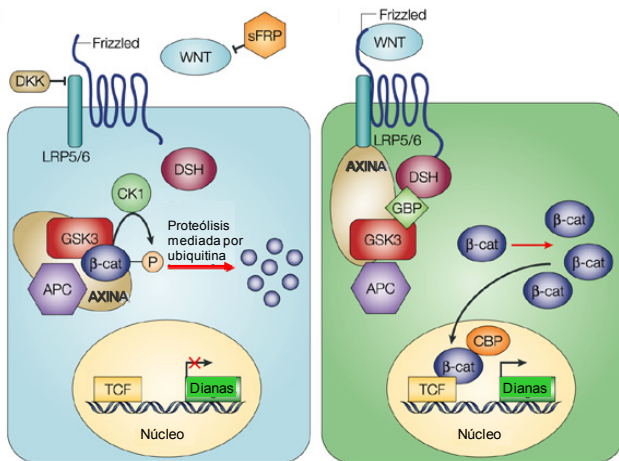


Figura 5.1. La vía de señalización Wnt/ β -catenina. En ausencia de señales de Wnt (izquierda), la proteólisis y el complejo de degradación (formado por GSK-3, axina, APC y β -TrCP/Slimb) mantiene bajo el nivel de β -catenina. En presencia de Wnt (derecha), se dispara la cascada de señalización Wnt. La activación de la proteína DSH mediante hiperfosforilación impide la fosforilación de la β -catenina, la cual en ausencia de degradación proteolítica se acumula en el citoplasma. En este caso la β -catenina interactúa con TCF y es translocada al núcleo para estimular la transcripción de genes diana. APC, poliposis adenomatosa coli; β -TrCP, proteína con repeticiones β -transducina; DSH, proteína *dishevelled*; GSK-3, glicógeno sintasa quinasa 3; TCF, factor de transcripción de células T.

funcionalmente mediante la búsqueda de grupos de genes enriquecidos en el conjunto de los datos de expresión, poniendo de manifiesto grupos de genes relacionados funcionalmente que se expresan diferencialmente en bloque (Al-Shahrour *et al.*, 2005a; Subramanian *et al.*, 2005).

5.1.1. Alteración de procesos de transducción de señal, desarrollo y diferenciación

Las posibles alteraciones tempranas experimentadas por las MSCs de médula ósea de fenotipo artrósico podrían jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad. Las MSCs defectuosas genética o funcionalmente generarían condrocitos alterados incapaces de mantener la homeostasis del principal elemento funcional del cartílago, la MEC. Con el fin de identificar posibles alteraciones transcripcionales en las MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis se llevó a cabo un estudio genómico comparativo basado en microarrays de ADN según el cual los genes regulados a la baja se distribuyeron fundamentalmente en los términos GO *transducción de señal, desarrollo, diferenciación y proliferación* (Apartado 4.1.2), procesos biológicos esenciales en células pluripotenciales, conformando además una tupida red de interacciones (Apartado 4.1.4). Este hallazgo sugiere una disminución de la capacidad de las MSCs de fenotipo artrósico para generar un linaje funcional de condrocitos que mantengan la homeostasis del tejido musculoesquelético.

Entre los elementos del término *desarrollo* de la categoría *proceso biológico* se encontraron tanto genes homeóticos como otros genes relacionados con la vía de señalización Wnt/ β -catenina (Fig. 5.1), la cual comprende factores de señalización que regulan procesos de desarrollo esenciales para la organización de la placa de crecimiento, la definición de los límites del cartílago y la osificación endocondral (Tamamura *et al.*, 2005). Además, se han descrito proteínas de esta vía capaces de inhibir la condrogénesis (Day *et al.*, 2005) y la adipogénesis (Christodoulides *et al.*, 2009), mientras que su efecto en la osteogénesis es dual (Baksh *et al.*, 2007). La vía Wnt/ β -catenina regula el fenotipo, la maduración y la función del condrocito mediante la unión a receptores tipo *frizzled* y a receptores relacionados con los de la lipoproteína

de baja densidad (*low-density lipoprotein*, LDL) (Baksh *et al.*, 2007), por lo cual juega un papel en la función del condrocito articular y en la patogénesis de la artrosis (Zhu *et al.*, 2009). Entre los reguladores negativos de la vía Wnt/ β -catenina se encuentran las SFRPs (*secreted frizzled-related proteins*, proteínas secretadas relacionadas con frizzled) (Alfaro *et al.*, 2008). Mientras que Loughlin *et al.* (2004) mostraron la existencia de polimorfismos funcionales en *FRZB* (SFRP3) que confieren susceptibilidad hacia la artrosis de cadera en mujeres, en nuestro trabajo encontramos regulación a la baja de *SFRP2*, lo cual podría dificultar que las MSCs de fenotipo artrósico pasen a la etapa de diferenciación terminal para adoptar otros linajes musculoesqueléticos.

RUNX3 forma un complejo ternario con la β -catenina para atenuar la actividad señalizadora de Wnt. Este gen, implicado en desarrollo, pertenece a una familia de tres miembros que se expresan durante la condrogénesis (Yoshida y Komori, 2005) y forman parte de cascadas de señalización mediadas tanto por TGF- β como por BMPs (Ito y Miyazono, 2003); además, se ha encontrado que en ratones *RUNX3* actúa como mediador de la maduración condrocitaria (Soung *et al.*, 2007). Osterix, un factor de transcripción necesario para la osteogénesis, está regulado negativamente por *RUNX3*, mientras que la sobreexpresión de este gen incrementa la expresión de integrinas y podría por tanto contribuir a intensificar la migración (Dominguez-Soto *et al.*, 2005). De este modo, la infraexpresión de *RUNX3* observada en nuestro estudio podría estar relacionada con una diferenciación condrocitaria defectuosa.

BARX1, también regulado a la baja en las MSCs de fenotipo artrósico, es un modulador negativo de la vía de señalización Wnt que resulta esencial para la proliferación celular, la agregación y la condensación de los precondrocitos (Sperber y David, 2008). También se encontraron regulados a la baja *RSPO2* y *RSPO3*, pertenecientes a la familia de proteínas secretadas R-Spondin, algunos de cuyos miembros están involucrados en el desarrollo de vertebrados, actuando como ligandos de las proteínas frizzled-8 y LRP6 (una proteína relacionada con los receptores de LDL), las cuales promueven la activación de la vía de señalización Wnt (Friedman *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008). Respecto a la infraexpresión de *SPP1* (osteopontina) en el fenotipo artrósico de las MSCs, se ha descrito que esta glicoproteína secretada de expresión temprana en la diferenciación de células mesenquimales se une a componentes de la MEC y juega un papel en la regulación de la mineralización ósea (Giachelli y Steitz, 2000). *DACT1* codifica uno de los elementos de la familia de proteínas frodo/dapper, constituida por adaptadores de señalización que regulan, entre otras, la vía de señalización Wnt durante el desarrollo y en procesos tumorales (Brott y Sokol, 2005).

5.1.2. Alteración de interacciones quimiocina-receptor

Los resultados del análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (Apartado 4.1.3) pusieron de manifiesto la infraexpresión en el fenotipo artrósico de las MSCs de dos de los 249 conjuntos

de genes predefinidos en la base de datos Biocarta: NKTPATHWAY, formado por quimiocinas y receptores de quimiocinas, y CSKPATHWAY, formado fundamentalmente por genes reguladores de interacciones quimiocina-receptor.

5.1.2.1. Regulación de quimiocinas y sus receptores

El análisis detallado de los genes que componen el conjunto NKTPATHWAY reveló que éste está formado por seis quimiocinas (de las cuales cuatro se encuentran infraexpresadas y una sobreexpresada con una ratio de cambio > 2 veces) y cuatro receptores de quimiocinas (de los cuales uno se encuentra sobreexpresado y otro infraexpresado) (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Quimiocinas y receptores de quimiocinas regulados en las MSCs de pacientes con artrosis

Nombre	Ratio de cambio ^a
<i>CCRL1</i>	+10,18
<i>CCL2</i>	+2,31
<i>CXCR4</i>	-2,79
<i>CCL4</i>	-2,85
<i>CXCL16</i>	-2,88
<i>CCL3L3</i>	-3,62
<i>CCL3</i>	-6,51

^aLos símbolos "+" y "-" indican aumento o disminución, respectivamente, del nivel de expresión en artrosis en comparación con los controles. MSC, célula madre mesenquimal.

Diversos estudios han subrayado el papel esencial que podrían jugar las quimiocinas y sus correspondientes receptores en la movilización y migración de las MSCs hacia tejidos lesionados (Djouad *et al.*, 2007; Fiedler *et al.*, 2002; Fiedler *et al.*, 2004; Honczarenko *et al.*, 2006; Ponte *et al.*, 2007; Ringe *et al.*, 2007; Sordi *et al.*, 2005). Si bien no existe consenso acerca del repertorio de quimiocinas y receptores involucrados, probablemente debido a la diversidad de abordajes experimentales y técnicas de aislamiento y cultivo *in vitro* empleados por los distintos autores, algunos trabajos han demostrado el papel estimulante de ciertas quimiocinas. Así, en ratones con infarto de miocardio inducido en los que habían administrado MSCs, Abbot *et al.* (2004) lograron inhibir la migración de estas células hacia zonas infartadas mediante

la antagonización de *CXCR4*, el receptor de *CXCL12*, mientras que Schenk *et al.* (2007) consiguieron inducir la migración de MSCs hacia áreas infartadas mediante la implantación previa de fibroblastos que sobreexpresaban *CCL7*. Nakamizo *et al.* (2005) lograron una significativa disminución de la migración de MSCs en xenoinjertos de gliomas humanos mediante el tratamiento de los medios condicionados con un cóctel de anticuerpos en cuya composición se encontraba el anticuerpo anti-*CXCL2*. Karnoub *et al.* (2007) demostraron la capacidad de las MSCs para incrementar la potencia metastática de células de carcinoma mamario mediante la producción de *CCL5*, que de forma paracrina genera un aumento de la movilidad de las células cancerígenas. Respecto a *CXCL12*, se ha descrito una abundante producción de esta quimiocina por parte de los osteoblastos durante la remodelación del tejido óseo en condiciones artrósicas (Lisignoli *et al.*, 2006), mientras que recientemente se ha demostrado que el eje *CXCL12/CXCR4* juega un papel esencial en la migración de las MSCs a sitios de fractura ósea, en los cuales se ha observado ausencia de reclutamiento de MSCs al inhibir la señal de *CXCL12* (Kitaori *et al.*, 2009).

El receptor *CCRL1* aparece fuertemente sobreexpresado (ratio de cambio +10,18) en las MSCs de pacientes con artrosis. Diversos trabajos han asociado la interacción entre este receptor y su ligando *CX3CL1* (fractalcina) a la inducción de la quimiotaxis y la migración en diversos tipos celulares como células dendríticas, precursores hematopoyéticos y mastocitos (Dichmann *et al.*, 2001; Heinzl *et al.*, 2007; Papadopoulos *et al.*, 2000). Lucas *et al.* (2003) describieron un subconjunto de células mononucleares que expresaban altos niveles de *CX3CL1* en placas de ateroma, así como la expresión de *CCRL1* en células de músculo liso de la neoíntima. Además mostraron que las células de músculo liso vascular en cultivo expresan *CCRL1* y experimentan quimiotaxis hacia *CX3CL1*, por lo que esta quimiocina podría actuar como mediador de la migración de células del músculo liso en lugar de regular el reclutamiento de células inflamatorias. La fuerte sobreexpresión del receptor *CCRL1* observada en las MSCs de pacientes con artrosis está en consonancia con el incremento de la respuesta quimiotáctica de estas células descrito en el Apartado 4.3 (véase el Apartado 5.3 más abajo).

En el ambiente específico de la articulación, células inmunes y sinoviocitos son otra posible fuente de quimiocinas que podrían influir en la movilización y migración de las MSCs, las cuales a su vez pueden producir citocinas y quimiocinas y así dar soporte trófico y promover la regeneración de los tejidos dañados mediante señalización autocrina y paracrina. En la hipótesis de que las MSCs de pacientes con artrosis se encuentran preactivadas, posiblemente por señales enviadas por el hueso subcondral, cabe preguntarse por qué entonces no contribuyen a la reparación de los daños tisulares asociados a la artrosis. Podría deberse a una cantidad insuficiente de células o a mecanismos inhibitorios como la presencia de citocinas proinflamatorias o NO (Frenkel *et al.*, 1996). La posibilidad de que una alteración funcional de las MSCs estuviese implicada en la patogénesis de la artrosis había sido apuntada ya por Luyten (2004) basándose en la observación previa de la disminución del potencial condrogénico y adipogénico de las MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis avanzada (Murphy *et al.*, 2002), si bien más recientemente se ha descrito que el potencial condrogénico de las MSCs de médula ósea es independiente de la edad y la etiología de la artrosis (Scharstuhl *et al.*, 2007).

5.1.2.2. Regulación de las interacciones quimiocina-receptor

El análisis detallado de los elementos que componen el conjunto CSKPATHWAY reveló que éste está formado fundamentalmente por genes implicados en la regulación de interacciones quimiocina-receptor. Cuatro de los componentes del conjunto CSKPATHWAY se encontraron significativamente regulados a la baja en las MSCs de fenotipo artrósico: *PRKACB* (ratio de cambio -1,19), *GNAS* (-1,37), *GNB1* (-1,50) y *PTPRC* (-1,58). *GNAS* y *GNB1* codifican subunidades de la proteína G, un elemento clave en los procesos de transducción de señal basados en la interacción receptor-ligando, mientras que *PTPRC* es una molécula señalizadora que regula diversos procesos celulares entre los que se incluyen el crecimiento celular, la

diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica y *PRKACB* es una serín/treonín quinasa implicada en cascadas de fosforilaciones que determinan diversas respuestas celulares. Si bien en cualquier caso se trata de diferencias de expresión muy pequeñas, la regulación a la baja de estos genes es compatible con una posible inhibición de las interacciones quimiocina-receptor que explicaría, al menos en parte, la deficiente capacidad reparadora de las MSCs de fenotipo artrósico a pesar de su supuesta preactivación (véase el Apartado 5.3 más abajo).

5.1.3. Regulación de genes de colágeno

Tanto el análisis detallado de los términos GO (Apartado 4.1.2) como el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (Apartado 4.1.3) arrojaron una clara regulación a la baja de genes de colágeno, los cuales conforman además una tupida red de interacciones (Apartado 4.1.4), en el fenotipo artrósico de las MSCs de médula ósea (Tabla 5.2). Entre estos genes se incluye *COL10A1* (colágeno tipo X, alfa 1), el único marcador molecular específico de hipertrofia condrocitaria descrito hasta la fecha (Zheng *et al.*, 2003).

Cinco de los 11 genes con mayor contribución a la infraexpresión del conjunto de genes de colágeno en el fenotipo artrósico de las MSCs (*COL1A1*, *COL4A2*, *COL5A1*, *COL5A2* y *COL15A1*) habían sido previamente asociados a artrosis (Karlsson *et al.*, 2010; Valdes *et al.*, 2006). Distintas mutaciones en *COL11A1* se han asociado a colagenopatías como los síndromes de Stickler (Robin *et al.*, 2000) y de Marshall (Shanske *et al.*, 1998), así como a la hernia de disco lumbar (Mio *et al.*, 2007), mientras que *COL4A1* ha sido implicado en las alteraciones funcionales y de diferenciación y en los desequilibrios entre osteoblastogénesis y adipogénesis que tienen lugar en la osteoporosis (Hopwood *et al.*, 2009). En *COL5A2* y *COL5A3* se han descrito mutaciones asociadas al síndrome de Ehlers-Danlos, una alteración hereditaria del tejido conectivo caracterizada por laxitud y fragilidad de los tejidos conectivos blandos (Segev *et al.*, 2006), en tanto que *COL7A1* es hasta la fecha el único gen asociado a la epidermólisis bullosa distrófica (Pfundner y Lucky, 2006), una rara enfermedad hereditaria caracterizada por la erupción de ampollas en la dermis que dan lugar a una piel de extremada fragilidad.

El colágeno de tipo X es sintetizado por condrocitos hipertróficos antes de que tenga lugar la mineralización de la MEC (Fig. 1.2). La relevancia de los colágenos en la formación de la matriz ha sido puesta de manifiesto en numerosas displasias esqueléticas (Newman y Wallis,

Tabla 5.2. Subconjunto de genes de colágeno con mayor contribución a la infraexpresión del conjunto en las MSCs de pacientes con artrosis de acuerdo con el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

Nombre	Ratio de cambio ^a
<i>COL11A1</i>	-6,66
<i>COL10A1</i>	-4,44
<i>COL4A1</i>	-4,11
<i>COL15A1</i>	-2,94
<i>COL5A3</i>	-2,69
<i>COL4A2</i>	-2,57
<i>COL8A1</i>	-2,53
<i>COL1A1</i>	-2,19
<i>COL5A2</i>	-1,88
<i>COL5A1</i>	-1,71
<i>COL7A1</i>	-1,67

^aLos símbolos “+” y “-” indican aumento o disminución, respectivamente, del nivel de expresión en artrosis en comparación con los controles. MSC, célula madre mesenquimal.

2003). En humanos se ha encontrado deficiencia de colágeno X en la condrodisplasia metafisiaria tipo Schmid, enfermedad que radiográficamente se caracteriza por la observación de mineralización irregular en los huesos largos (Bateman *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2001; Wallis *et al.*, 1996). La producción disminuida o defectuosa de colágeno X observada en este trabajo para las MSCs de fenotipo artrósico apoyaría la hipótesis apuntada más arriba de que estas células generan un hueso subcondral alterado o inestable. Este hueso subcondral, que proporciona soporte al cartílago articular, puede afectar a la conformación de la articulación induciendo la deformación de la superficie del cartílago y del hueso, creando así zonas sometidas a estrés en el cartílago adyacente.

5.2. EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE PACIENTES CON ARTROSIS

Durante los últimos años diversas poblaciones de MSCs han sido caracterizadas mediante abordajes proteómicos. Estos estudios han definido patrones temporales asociados al cambio morfológico en cultivos de MSCs y han descrito la expresión diferencial de proteínas responsables de la diferenciación osteogénica y adipogénica (Lee *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2006); sin embargo, el estudio del proteoma diferencial de MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis no había sido abordado todavía.

En este estudio, la determinación cuantitativa mediante 2D-DIGE de los cambios diferenciales del proteoma de MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis, en comparación con individuos control sanos, y la posterior identificación de las proteínas diferencialmente expresadas mediante MALDI-MS permitió la identificación de 38 proteínas distintas, de las cuales 14 (37%) son enzimas metabólicas y 12 (32%) están relacionadas con citoesqueleto/motilidad (Apartado 4.2.1). El análisis de interacciones puso de manifiesto la existencia de fuertes interacciones entre los componentes de estos grupos (Apartado 4.2.1.4).

5.2.1. Alteración de proteínas relacionadas con citoesqueleto/motilidad

El citoesqueleto, una red fibrilar de proteínas ubicada en el citoplasma que da forma a la célula y juega un papel en el movimiento celular, está formado por tres tipos de filamentos proteicos: filamentos de actina (microfilamentos), filamentos intermedios y microtúbulos. En vertebrados se han identificado tres isoformas principales de actina, denominadas alfa, beta y gamma actina, constituyendo las dos últimas importantes mediadores de la motilidad celular interna (Fig. 5.2). De acuerdo con nuestros resultados, del total de 12 proteínas alteradas relacionadas con citoesqueleto/motilidad, se encontraron cambios en el nivel de expresión de beta actina (mancha 13, ratio de cambio -1,61) junto con el de cinco proteínas remodeladoras de actina: alfa actinina 1 (mancha 22, ratio de cambio -2,61), proteína de choque térmico 27 (manchas 16, 24, 27 y 38, ratios de cambio -1,70, -2,35, -1,86 y -2,03 respectivamente), L-caldesmon II (mancha 51, ratio

de cambio -1,93), moesina (mancha 52, ratio de cambio -2,09) y destrina isoforma b (mancha 59, ratio de cambio +4,30).

La caldesmon es una proteína de unión a actina y miosina que resulta esencial en el movimiento celular (Li *et al.*, 2004) e intracelular (Hegmann *et al.*, 1991), así como en la citocinesis (Warren *et al.*, 1996). Esta proteína inhibe las funciones de la gelsolina y del complejo Arp2/3 (Fig. 5.2), dos elementos imprescindibles en la formación de los podosomas que caracterizan a las células invasivas (Yoshio *et al.*, 2007). La moesina pertenece a la familia ezrina-radixina-moesina, cuyos miembros llevan a cabo numerosas funciones celulares entre las que se incluyen la regulación del citoesqueleto de actina, la modulación de la forma, la capacidad de adhesión y la

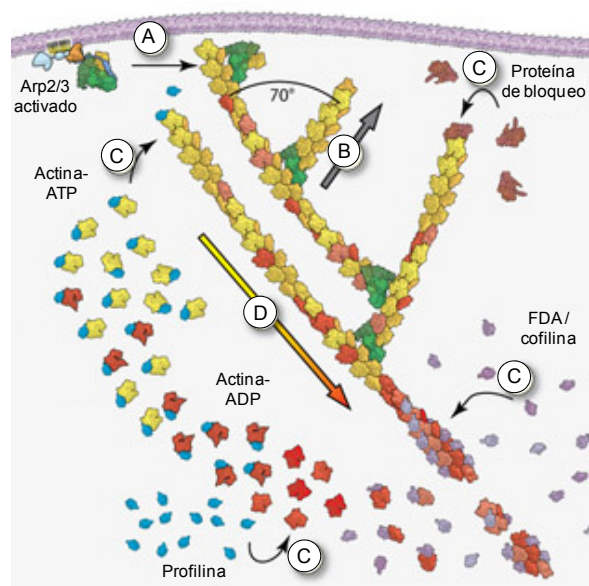


Figura 5.2. Remodelación del citoesqueleto de actina. (A) El complejo Arp2/3 activado actúa como agente nucleante de la polimerización de actina y favorece la formación de estructuras dendríticas y en anastomosis en dirección a la membrana. (B) La acción conjunta de diversos filamentos crecientes ejerce una fuerza sobre la membrana que provoca el movimiento celular. (C) Diversas proteínas de unión a actina regulan el proceso de polimerización/ despolimerización (D). ADP, adenosín difosfato; ATP, adenosín trifosfato; FDA, factor de despolimerización de actina.

motilidad celular y la regulación de rutas de señalización (Hughes y Fehon, 2007); en ausencia de moesina la célula pierde sus propiedades epiteliales y adopta un comportamiento migratorio invasivo a través de la antagonización de la GTPasa Rho pequeña, un factor clave en la regulación de las rutas de señalización que regulan los cambios en el citoesqueleto de actina que facilitan la motilidad y la adhesión celulares (Hughes y Fehon, 2007). La destrina, uno de los factores despolimerizantes de la actina, resulta esencial en procesos como la citocinesis y la motilidad celular (Hotulainen *et al.*, 2005), habiéndose demostrado que en cáncer de colon su presencia promueve la migración y la invasión celulares en respuesta a bombesina (Estornes *et al.*, 2007). La infraexpresión de caldesmon y moesina y la sobreexpresión de destrina en las MSCs de pacientes con artrosis está de acuerdo con el incremento de la capacidad migratoria de estas células descrito en el Apartado 4.3 (véase el Apartado 5.3 más abajo). Respecto a la alfa actinina, Celli *et al.* (2006) demostraron que la asociación de las alfa actininas 1 y 4 con ICAM-1 resulta esencial para la extravasación leucocitaria. Schäfer *et al.* (1999) propusieron que la fosforilación de la proteína de choque térmico 27 es necesaria para la estabilización del citoesqueleto de actina en células de ovario de hámster chino.

Los microtúbulos del citoesqueleto eucariota llevan a cabo diversas funciones esenciales y están compuestos principalmente por un heterodímero de alfa y beta tubulina, jugando la gamma tubulina un papel crítico en su nucleación. Nuestros resultados muestran alteraciones en los niveles de tubulina alfa 6 (mancha 20, ratio de cambio -1,76) y de estatmina 1 (mancha 37, ratio de cambio +7,25), proteína que juega un importante papel en la estabilización de los microtúbulos al promover su desensamblaje. La familia de las estatminas ejerce numerosas funciones reguladoras en la célula, algunas de las cuales están implicadas en el control fisiológico de la proliferación y la diferenciación (Curmi *et al.*, 1999). En pacientes con esclerosis múltiple la estatmina promueve el fenotipo migratorio de los progenitores oligodendrocíticos (Liu *et al.*, 2005), por lo que la fuerte sobreexpresión de esta proteína en las MSCs de pacientes con artrosis está relacionada, al menos parcialmente, con el mencionado incremento de la capacidad migratoria de estas células.

Los filamentos intermedios conforman una tercera clase de elementos del citoesqueleto, siendo la vimentina la subunidad propia del tejido mesenquimal. La vimentina, involucrada en procesos clave como el reclutamiento, la migración y la señalización (Ivaska *et al.*, 2007), constituye una de las principales fosfoproteínas de las MSCs (Ogawara *et al.*, 1995) y sus niveles de fosforilación podrían regular el ensamblaje de los filamentos intermedios (Eriksson *et al.*, 2004), mientras que la desestabilización del citoesqueleto de vimentina se ha asociado con la pérdida de la homeostasis condrocitaria (Blain *et al.*, 2006). En las MSCs de pacientes con artrosis la infraexpresión de vimentina se manifiesta en seis manchas diferenciales (manchas 2, 4, 6, 8, 9 y 45, ratios de cambio -4,17, -5,56, -3,68, -3,68, -2,43 y -3,20 respectivamente), patrón de expresión que podría explicarse, al menos en parte, por la coexistencia de diversos estados de fosforilación de la proteína. La posible vinculación entre la alteración de la red de vimentina observada en este trabajo y la patogénesis de la artrosis merece un estudio más profundo.

Se encontró también expresión diferencial de lamina B (mancha 18, ratio de cambio +1,85), perteneciente a una familia de componentes estructurales esenciales de la lámina nuclear (Vergnes *et al.*, 2004). Nedjadi *et al.* (2009) han descrito un posible papel de la interacción de lamina B con S100A6 en la promoción de la motilidad de células tumorales pancreáticas por parte de esta molécula. Respecto a la fosfoproteína enriquecida en astrocitos 15 (mancha 3, ratio de cambio -1,64), se ha demostrado que su capacidad de inhibir la migración de astrocitos está mediada por un mecanismo dependiente de proteína quinasa C delta (Renault-Mihara *et al.*, 2006). La anexina A1 (mancha 53, ratio de cambio -1,97) pertenece a una familia de proteínas de unión a fosfolípidos que ha sido relacionada con el tráfico de membranas y la migración e invasión de células epiteliales (Babbin *et al.*, 2006). Así mismo, se ha demostrado la capacidad de un fragmento N-terminal de anexina 1 de inducir la migración quimiotáctica de las MSCs, así como su posible intervención en la reparación de tejidos (Kim *et al.*, 2007b).

5.2.2. Alteración de enzimas metabólicas

El otro grupo principal de proteínas de MSCs cuya expresión se encontró alterada en pacientes con artrosis está formado por 14 enzimas metabólicas. Siete de estas enzimas participan en el metabolismo de proteínas celulares: catepsina B (mancha 25, ratio de cambio +1,9), enzima activadora de ubiquitina E1 (mancha 29, ratio de cambio +1,85), proteína con valosina (mancha 21, ratio de cambio +2,5), aminopeptidasa B (mancha 33, ratio de cambio +1,5), proteína fosfatasa 1 (mancha 48, ratio de cambio +1,5), glicil-tRNA sintetasa (mancha 43, ratio de cambio -2,34) y la isoforma b de procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2 (mancha 56, ratio de cambio +2,8). Cabe señalar que el término GO *proceso metabólico* se encontró significativamente enriquecido en los genes sobreexpresados por las MSCs de acuerdo con el análisis de términos GO llevado a cabo con los datos de expresión génica diferencial obtenidos en microarrays (Apartado 4.1.2).

La catepsina B es una cisteín proteasa que podría jugar un papel en la degradación y el recambio de proteínas dentro de la célula. Las catepsinas se encuentran fuertemente sobreexpresadas en diversos tipos de tumores (Mohamed y Sloane, 2006) y participan en procesos protumorales básicos como la angiogénesis, la proliferación, la apoptosis y la invasión (Gocheva *et al.*, 2006). En hendiduras y zonas de hiper celularidad del cartílago artrósico se han encontrado altos niveles de catepsina B (Baici *et al.*, 1995). Así mismo, se ha encontrado un aumento de la actividad intracelular de catepsina B en condrocitos (Baici *et al.*, 1995) y sinovio (Mehraban *et al.*, 1997) degradados. El incremento de catepsina B observado en las MSCs de fenotipo artrósico sugiere la implicación de esta proteína en el metabolismo del cartílago artrósico mediante proteólisis descontrolada en el lugar indebido.

La proteína fosfatasa 1 podría jugar un papel en la apoptosis condrocitaria (Kim y Blanco, 2007), mientras que la glicil-tRNA sintetasa ejerce funciones en la biosíntesis de proteínas y ha sido descrita como diana de autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes humanas como la polimiositis y la dermatomiositis (Freist *et al.*, 1996). La isoforma B de procolágeno-lisina, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2 cataliza la hidroxilación de residuos de lisina en péptidos colagénicos. Las hidroxilinas resultan esenciales en la estabilización de la red de colágeno, habiéndose encontrado deficiencias en la actividad lisil hicroxilasa en algunos pacientes con síndrome de Ehlers-Danlos tipo VI, mientras que el síndrome de Bruck (osteogénesis imperfecta con contracturas articulares congénitas) se ha asociado con mutaciones en la región que codifica este gen (Ha-Vinh *et al.*, 2004).

El grupo de enzimas metabólicas diferencialmente expresadas en MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis incluye cuatro especies proteicas adicionales que participan en el metabolismo celular de carbohidratos: triosafosfato isomerasa 1 (manchas 46 y 58, ratios de cambio -1,82 y -1,75 respectivamente), fosfoglicerato mutasa 1 (mancha 61, ratio de cambio -1,75), glicógeno fosforilasa de cerebro (mancha 57, ratio de cambio +1,63) y glucosidasa II

(mancha 41, ratio de cambio +1,99). Xiang *et al.* (2004) encontraron autoanticuerpos de tipo IgG frente a trifosfato isomerasa en *ca.* 25% de los sueros de pacientes con artrosis frente a <6% de las muestras provenientes de pacientes con otras patologías reumáticas como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico. La glucosidasa II, que interviene en el procesamiento de glicoproteínas inmaduras, ha sido propuesta como marcador potencial de artrosis en estudios basados en microarrays de ADN con muestras de sangre de pacientes con artrosis de rodilla (Marshall *et al.*, 2005).

Se encontraron asimismo niveles de expresión disminuidos en tres proteínas implicadas en el metabolismo celular de lípidos: N-acilesfingosina amidohidrolasa 1 (mancha 28, ratio de cambio -2,42), nudix motivo 5 (mancha 5, ratio de cambio -1,68) y dihidropirimidinasa-like 2 (mancha 50, ratio de cambio -2,5). Si bien la obesidad es un importante factor de riesgo para la artrosis (Lementowski y Zelicof, 2008), no existen estudios que relacionen el metabolismo de lípidos con la enfermedad a nivel molecular, por lo que la disminución de los niveles de estas proteínas en las MSCs de fenotipo artrósico merece un estudio más profundo.

5.3. INTENSIFICACIÓN DE LA RESPUESTA MIGRATORIA A rhPDGF-BB DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE PACIENTES CON ARTROSIS

Diversas moléculas podrían regular la migración de las MSCs siguiendo un gradiente quimiotáctico en respuesta al daño tisular (Fiedler *et al.*, 2002; Fiedler *et al.*, 2004). La isoforma BB del polipéptido PDGF constituye un potente factor quimiotáctico para MSCs incluso a bajas concentraciones (Fiedler *et al.*, 2002; Godwin y Soltoff, 1997; Hughes *et al.*, 1992), razón por la cual en este estudio se investigó el efecto quimiotáctico de PDGF-BB sobre MSCs provenientes de pacientes con artrosis empleando células de individuos sanos como control. Los resultados ponen de manifiesto un incremento significativo del IQ en la respuesta migratoria de las MSCs de fenotipo artrósico a rhPDGF-BB (1 ng/ml) en comparación con los controles (Apartado 4.3). La marcada sobreexpresión del receptor de quimiocinas *CCRL1*, junto con la disminución de los niveles de expresión de proteínas relacionadas con la reorganización del citoesqueleto y la motilidad celular y la regulación al alza de genes y proteínas implicados en procesos metabólicos son compatibles con la hipótesis de una activación de las MSCs de médula ósea en pacientes con artrosis en respuesta a las señales enviadas por el hueso y el cartílago dañados característicos de esta enfermedad.

5.4. EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL EN CONDROCITOS DE PACIENTES CON ARTROSIS

Algunos trabajos han analizado el perfil secretor del cartílago articular normal y artrósico mediante herramientas proteómicas (García *et al.*, 2006; Hermansson *et al.*, 2004). Ruiz-Romero *et al.* (2005) describieron el proteoma de condrocitos humanos sanos, mientras que otros

trabajos (Lambrecht *et al.*, 2007; Ruiz-Romero *et al.*, 2008b) han estudiado el proteoma diferencial de condrocitos humanos provenientes de cartílago articular artrósico por comparación con tejido sano mediante 2-DE y MS. Recientemente se ha llevado a cabo el estudio del subproteoma mitocondrial de condrocitos artrósicos mediante 2D-DIGE y MS (Ruiz-Romero *et al.*, 2008a).

En este trabajo se aborda por primera vez el estudio del proteoma diferencial de condrocitos articulares provenientes de pacientes con artrosis en comparación con individuos sanos mediante 2D-DIGE y MALDI-MS. De esta manera se identificaron 26 proteínas distintas, de las cuales siete (27%) tienen función de unión a proteínas, seis (23%) son de citoesqueleto, cinco (19%) muestran actividad hidrolasa y dos (8%) actividad oxidorreductasa. La proteína macrofágica mutante de bloqueo (manchas 10 y 11, ratios de cambio +1,81 y +1,54 respectivamente), perteneciente a la familia gelsolina/villina de proteínas reguladoras de actina, se une al extremo libre del filamento de actina, impidiendo la incorporación de nuevas subunidades. La cofilina 1 (manchas 15 y 26, ratios de cambio -4,34 y -1,26 respectivamente), la cofilina 2 (mancha 23, ratio de cambio +1,31) y la destrina isoforma B (mancha 18, ratio de cambio -4,05), son proteínas pequeñas que se unen tanto a monómeros como a filamentos de actina cuya principal función fisiológica consiste en la despolimerización de dichos filamentos (Fig. 5.2) (Hotulainen *et al.*, 2005; Paavilainen *et al.*, 2004). Algunos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la organización de la actina en el control del fenotipo condrocitario (Loty *et al.*, 1995; Woods *et al.*, 2005), mientras que Nurmiskaya y Linsenmayer (1996) encontraron sobreexpresión de una proteína tipo gelsolina en condrocitos hipertróficos por comparación con condrocitos no hipertróficos. El citoesqueleto de actina juega un papel en la mecanotransducción condrocitaria, a través de la cual las células del cartílago se adaptan a los estímulos mecánicos externos (Grodzinsky *et al.*, 2000; Guilak, 1995; Millward-Sadler y Salter, 2004; Wang *et al.*, 1993), proceso que resulta esencial para la integridad funcional del cartílago articular mediante el control de la síntesis y el catabolismo de la MEC y la prevención de una respuesta inflamatoria a la carga mecánica. Campbell *et al.* (2007) encontraron sobreexpresión del gen de cofilina, así como del de su isoforma destrina, en condrocitos sometidos a cargas mecánicas, mientras Ruiz-Romero *et al.* (2008b) encontraron también sobreexpresión de gelsolina en el proteoma de condrocitos humanos artrósicos empleando geles 2D. Recientemente Hubert *et al.* (2009) han sugerido que la proteína macrofágica de bloqueo podría actuar como mediador del diálogo entre el citoesqueleto de actina y orgánulos basados en microtúbulos que regulan la división celular.

Algunos estudios han demostrado la expresión de marcadores terminales y de hipertrofia, incluyendo anexina A2 (mancha 20, ratio de cambio +1,36), en el cartílago artrósico (Kirsch *et al.*, 2000), tejido en el que también se observaron mineralización y apoptosis (Derfus *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1998; Kirsch *et al.*, 2000). Se ha propuesto que la sobreexpresión de

anexina en el cartílago artrósico podría provocar la entrada de Ca^{2+} en los condrocitos articulares y el consiguiente estímulo de eventos de diferenciación terminal en estas células (Wang *et al.*, 2003). Si bien en condiciones normales estos eventos son necesarios para la formación del hueso endocondral, en condiciones patológicas como la artrosis podrían desencadenar la destrucción del cartílago. La sobreexpresión de anexina A2 en los condrocitos de pacientes con artrosis que arrojan nuestros resultados ilustraría el papel de la apoptosis en esta enfermedad.

La chaperona GRP78 (mancha 3, ratio de cambio -1,44) no sólo está implicada en el plegamiento y ensamblaje de proteínas en el retículo endoplásmico, sino también en el procesamiento y transporte de la forma silvestre de la trombospondina COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*, proteína oligomérica de la matriz del cartílago). COMP, que se localiza en el condrocito normal y en la matriz territorial que lo rodea, juega un papel en la retención de la COMP mutante en los condrocitos pseudocondroplásicos (Hecht *et al.*, 2001). La otra chaperona cuya expresión se encontró alterada, la proteína de choque térmico de 10 kDa 1 (mancha 29, ratio de cambio +1,26), es conocida principalmente por su papel en el plegamiento de proteínas intracelulares (Slavotinek y Biesecker, 2001); además, Johnson *et al.* (2005) propusieron un papel en la regulación de la respuesta inmune innata para la proteína extracelular, que ejercería funciones antiinflamatorias e inmunoreguladoras. Así, el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide con esta proteína resulta en una mejora a corto plazo de los indicadores de la actividad de la enfermedad (Vanags *et al.*, 2006). Otra de las proteínas alteradas en los condrocitos de pacientes con artrosis, la isoforma 1 de la proteína del retículo endoplásmico 29 (mancha 14, ratio de cambio +1,38), podría participar en el procesamiento de proteínas secretadas en el retículo endoplásmico a través del control de su plegamiento (Hubbard *et al.*, 2006).

Dos proteínas implicadas en la glicólisis se encontraron alteradas en los condrocitos artrósicos: fosfoglicerato mutasa B (mancha 2, ratio de cambio +1,27) y lactato deshidrogenasa A (mancha 27, ratio de cambio -1,29). La primera cataliza la conversión anaeróbica de glucosa en lactato o piruvato que resulta en el almacenamiento de energía en forma de ATP, mientras que la lactato deshidrogenasa cataliza la conversión de L-lactato y NAD en piruvato y NADH en la etapa final de la glicólisis. El cartílago articular es un tejido conectivo avascular con reducida disponibilidad de oxígeno y glucosa en comparación con el líquido sinovial y el plasma, mientras que la glucosa actúa como fuente de energía y precursor estructural y juega un importante papel en la síntesis de macromoléculas de la MEC en el cartílago articular. En la matriz extracelular el condrocito desarrolla su función con limitados nutrientes y bajo nivel de oxígeno, de modo que podría responder a estas alteraciones con un ajuste del metabolismo celular y de la expresión de enzimas glicolíticas. Ruiz-Romero *et al.* (2008b) también encontraron alteraciones en los niveles de enzimas glicolíticas en su estudio de condrocitos artrósicos mediante 2-DE.

Las proteasas juegan un importante papel en la degradación y destrucción tisular propias de la articulación artrítica (Cunnane *et al.*, 2001; Keyszer *et al.*, 1998). La catepsina D (mancha 5, ratio de cambio -1,92), una aspartil proteasa lisosomal y secretada, podría contribuir al procesamiento proteolítico del núcleo de agregano del cartílago articular (Handley *et al.*, 2001). Algunos autores (Nakase *et al.*, 2000) han sugerido la participación de esta proteasa en el proceso de osificación endocondral en humanos, mientras que Ruiz-Romero *et al.* (2005) la identificaron en el proteoma de condrocitos humanos normales mediante 2-DE y MS. En la etiopatogénesis de la artrosis se encuentra la sobreexpresión de enzimas degradantes de la MEC; sin embargo, Bowe *et al.* (2007) encontraron que bajo un régimen intenso de ejercicio no sólo tenían lugar cambios fenotípicos característicos de la artrosis temprana (Murray *et al.*, 1999), sino una inesperada disminución del porcentaje de condrocitos positivos para catepsina D, especialmente en la zona del cartílago más próxima al hueso subcondral. En consonancia con este resultado, en este trabajo hemos encontrado niveles disminuidos de catepsina D en los condrocitos de pacientes con artrosis.

En los condrocitos de pacientes con artrosis se encontraron niveles disminuidos de dos proteínas relacionadas con el proteasoma: la isoforma 2 de la subunidad beta 9 del proteasoma (mancha 1, ratio de cambio -1,43) y la subunidad 2 del activador del proteasoma (mancha 6, ratio de cambio -1,32). Algunos trabajos recientes han relacionado alteraciones en subunidades del proteasoma con enfermedades reumáticas como el síndrome de Sjogren (Morawietz, 2009), el lupus eritematoso sistémico (Barcellos, 2009) y la espondilitis anquilosante (Maksymowych, 2009), por lo que el posible papel de estas proteínas en la patogénesis de la artrosis merece un estudio más profundo.

5.5. CONSIDERACIONES GLOBALES

5.5.1. Correlación entre la expresión diferencial de genes y proteínas en las células madre mesenquimales de pacientes con artrosis

El análisis detallado de los genes y proteínas que se encontraron regulados en las MSCs de pacientes con artrosis revela que sólo existe cierto grado de correlación entre un número limitado de especies fundamentalmente reguladas a la baja (10, equivalente al 26% y 1%, respectivamente, de las proteínas y los genes regulados) (Fig. 5.3). Investigaciones recientes han coincidido en subrayar la pobre correlación que existe entre los perfiles de ARNm y proteínas, especialmente en mamíferos (Chen *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2002; Ideker *et al.*, 2001; Rogers *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2004), desacuerdo que algunos autores han fundamentado en la existencia de diferencias entre los mecanismos que controlan la transcripción y la traducción de genes. Otra razón estriba en el hecho de que un gen puede dar lugar a varios transcritos distintos que a su vez pueden ser traducidos en cientos de especies proteicas diferentes dependiendo de las PTMs que experimenten. Existen además limitaciones de tipo técnico a la

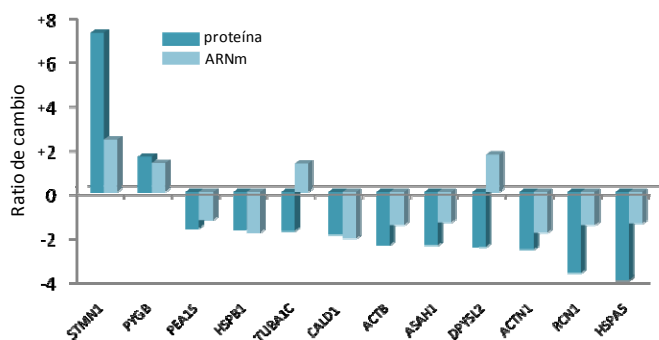


Figura 5.3. Correlación entre la expresión diferencial de genes y proteínas en las MSCs de pacientes con artrosis. Sólo se muestran los casos en los que la ratio de cambio de la proteína es > 1,5 veces y la del gen > 1,25 veces. Los símbolos "+" y "-" indican aumento o disminución, respectivamente, del nivel de expresión en artrosis en comparación con los controles. ARNm, ácido ribonucleico mensajero; MSC, célula madre mesenquimal.

hora de llevar a cabo una comparación global entre expresión génica y proteica, ya que, debido a las dificultades inherentes al análisis proteómico (Mann, 2009), en la actualidad ninguna plataforma de análisis proteómico es capaz de analizar un número de proteínas comparable con las decenas de miles de transcritos (ca. 40.000 en este trabajo) que simultáneamente son analizados en un único microarray (véase el Apartado 5.5.2.1)

5.5.2. Limitaciones del estudio

5.5.2.1. Limitaciones de las tecnologías empleadas

Dado que los defectos primarios que originan una determinada patología se reflejan en alteraciones de la expresión génica, las técnicas de genómica comparativa constituyen una interesante alternativa a los estudios genéticos clásicos, ya que en lugar de seleccionar *a priori* los genes objeto de estudio dichas técnicas tratan de identificar, entre la totalidad del genoma, aquellos genes cuya expresión difiere entre las distintas condiciones a estudiar. Sin embargo, no existe un único método estadístico aplicable a cualquier experimento basado en microarrays, por lo que éste habrá de ser elegido en función de factores como el diseño experimental y el número de réplicas técnicas y biológicas disponibles. Este hecho, unido a la diversidad de plataformas disponibles, dificulta enormemente la comparación de resultados obtenidos por distintos grupos de investigación. Respecto a la convención de considerar significativos los cambios de expresión superiores a dos veces, la cual se remonta a los primeros experimentos realizados con microarrays (DeRisi *et al.*, 1996), puede ocurrir que cambios por encima de este valor de corte en el nivel de expresión de un gen no resulten relevantes con respecto al fenotipo, mientras que genes que en efecto ejerzan una notable influencia en el fenotipo podrían pasar inadvertidos en el vasto conjunto de datos que proporcionan los ensayos basados en microarrays (Miklos y Maleszka, 2004).

Respecto al abordaje proteómico empleado en nuestro estudio, cabe señalar que, frente a los ca. 40.000 transcritos analizados en cada microarray, el número de proteínas detectables en un gel 2D no sobrepasa unos pocos miles (ca. 2.400 en este trabajo), cifra de la que quedan excluidas las proteínas con valores extremos de pI y MM. Asimismo, los gels 2D tienden a sobrerrepresentar las proteínas más abundantes de la muestra, que son además las más

fácilmente identificables mediante MS, en detrimento de proteínas poco abundantes que sin embargo podrían asumir importantes roles biológicos (*e.g.* factores de transcripción y quimiocinas). En las MSCs de médula ósea de pacientes con artrosis se encontraron 38 proteínas frente a *ca.* 1.200 genes regulados de manera significativa con una ratio de cambio > 1,5 veces, desequilibrio que dificulta enormemente la comparación integral de nuestro sistema. El empleo de abordajes proteómicos cuantitativos basados en la utilización conjunta de LC-MS y marcajes isotópicos, isobáricos o metabólicos (Walther y Mann, 2010) podría aliviar en cierta medida este problema, si bien todavía son necesarias mejoras sustanciales de las herramientas proteómicas, especialmente en lo que atañe a límites de detección e intervalos dinámicos de análisis (Mann, 2009).

5.5.2.2. Limitaciones derivadas del tipo de muestras y la patología

La utilización de muestras de origen humano plantea dificultades adicionales en el diseño y análisis estadístico de los ensayos basados en microarrays y geles 2D debido a la heterogeneidad genética de los individuos y al limitado número de muestras de las que normalmente se dispone. A ello hay que sumar los problemas asociados a la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas cuando el objeto de estudio es una enfermedad compleja como la artrosis.

Numerosos estudios apoyan la utilización de abordajes genómicos y proteómicos para la identificación de genes, proteínas y rutas bioquímicas alterados en estados patológicos. Sin embargo, el moderado tamaño muestral de nuestro estudio, derivado de la dificultad para obtener las muestras de médula ósea y cartílago de pacientes de artrosis y controles y a la limitada capacidad de procesamiento de las técnicas empleadas, ha podido restringir la capacidad de detección de diferencias significativas de expresión entre los dos grupos. Así mismo, no es posible concluir si la alteración de la expresión de algunos de los genes o proteínas descritos es causa o consecuencia de la patología.

En este trabajo se demuestra la existencia de cambios en el perfil génico y proteico de MSCs y condrocitos provenientes de pacientes con artrosis. Hemos podido evidenciar que en las MSCs de fenotipo artrósico se encuentran infraexpresados genes implicados en transducción de señal, desarrollo, diferenciación y proliferación, entre otros. La identificación de varias rutas biológicas alteradas sugiere además que ciertas quimiocinas, sus receptores y algunos genes de colágeno podrían jugar un papel en la fisiopatología de la artrosis. A nivel proteico las MSCs de fenotipo artrósico muestran alteraciones compatibles con una activación de estas células, posiblemente debido a señales enviadas por el hueso subcondral. Finalmente, el proteoma diferencial de condrocitos de pacientes con artrosis muestra alteraciones que podrían explicar algunos aspectos moleculares de la enfermedad. Cabe esperar que la posterior caracterización funcional de los genes, proteínas y rutas biológicas aquí identificados pueda contribuir a aumentar nuestro conocimiento acerca de la fisiopatología de la artrosis.

6. Conclusiones

1. Este trabajo describe por primera vez la existencia de cambios en la expresión de genes y proteínas en las MSCs de médula ósea de pacientes afectados por artrosis, poniendo de manifiesto alteraciones moleculares relacionadas con la fisiopatología de la enfermedad.
2. La aplicación de la técnica de microarrays ha revelado en las MSCs genes con diferencias significativas de expresión entre pacientes y controles que están implicados en procesos claves como la transducción de señal, el desarrollo y la diferenciación. Los resultados son compatibles con una disminución de la capacidad de las MSCs de fenotipo artrósico para generar un linaje funcional de condrocitos que mantenga la homeostasis del tejido musculoesquelético.
3. Se han identificado tres grupos de genes relacionados funcionalmente que se expresan de forma diferencial entre pacientes y controles en bloque: quimiocinas y sus receptores, genes reguladores de la interacción quimiocina-receptor y genes de colágeno. En particular, la marcada sobreexpresión del receptor *CCRL1* en el fenotipo artrósico está en consonancia con el incremento de la respuesta quimiotáctica observado en las MSCs de pacientes con artrosis, mientras que la disminución de *COL10A1* apoya la hipótesis de que las MSCs generan un hueso subcondral alterado o inestable.
4. La aplicación de la técnica 2D-DIGE en combinación con la espectrometría de masas MALDI ha puesto de manifiesto proteínas con diferencias significativas de expresión entre MSCs de pacientes y controles relacionadas con la reorganización del citoesqueleto, la motilidad celular y el metabolismo celular, entre otros. Los resultados son compatibles con el mencionado incremento de la capacidad migratoria de las MSCs y sugieren una activación de estas células en respuesta a señales posiblemente enviadas por el hueso subcondral.
5. La aplicación de la técnica 2D-DIGE en combinación con la espectrometría de masas MALDI ha puesto de manifiesto proteínas con diferencias significativas de expresión entre condrocitos de pacientes y controles relacionadas con el citoesqueleto, la unión de proteínas, la actividad hidrolasa, entre otros. Estas alteraciones podrían explicar algunos aspectos moleculares de la enfermedad.
6. Los genes y proteínas identificados en este trabajo constituyen nuevos potenciales candidatos para explicar la etiología de la artrosis, dejando abiertas numerosas hipótesis que habrán de ser confirmadas mediante los correspondientes ensayos funcionales.

Bibliografía

- A**bbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ (2004). Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 110: 3300-3305.
- Adams ME, Brandt KD (1991). Hypertrophic repair of canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *J Rheumatol* 18:428-435.
- Agilent Technologies (2004). Agilent G2567AA feature extraction software (v. 7.5) user manual.
- Agilent Technologies (2008). One-color microarray-based gene expression analysis (Quick Amp Labeling) protocol.
- Aigner T, Bartnik E, Sohler F, Zimmer R (2004). Functional genomics of osteoarthritis: on the way to evaluate disease hypotheses. *Clin Orthop Relat Res* 427 Suppl:S138-S143.
- Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T *et al.* (2006). Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 54:3533-3544.
- Alexopoulos LG, Setton LA, Guilak F (2005). The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *Acta Biomater* 1:317-325.
- Alfaro MP, Pagni M, Vincent A, Atkinson J, Hill MF, Cates J *et al.* (2008). The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18366-18371.
- Al-Shahrouf F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J (2005a). Discovering molecular functions significantly related to phenotypes by combining gene expression data and biological information. *Bioinformatics* 21:2988-2893.
- Al-Shahrouf F, Minguez P, Vaquerizas JM, Conde L, Dopazo J (2005b). BABELOMICS: a suite of web-tools for functional annotation and analysis of group of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res* 33:W460-W464.
- Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund LT (2008). Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 15:5220-5227.
- Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K *et al.* (1990). The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum* 33:1601-1610.
- Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR *et al.* (1995). The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 182:2097-2102.
- Aspden RM (2008). Osteoarthritis: a problem of growth not decay? *Rheumatology (Oxford)* 47:1452-1460.
- Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G (2007). Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56:1175-1186.
- Aydelotte MB, Kuettner KE (1988). Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res* 18:205-222.
- B**abbin BA, Lee WY, Parkos CA, Winfree LM, Akyildiz A, Perretti M *et al.* (2006). Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors. *J Biol Chem* 281:19588-19599.
- Baici A, Horler D, Lang A, Merlin C, Kissling R (1995). Cathepsin B in osteoarthritis: zonal variation of enzyme activity in human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* 54:281-288.
- Baksh D, Boland GM, Tuan RS (2007). Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. *J Cell Biochem* 101:1109-1124.
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A *et al.* (2003). Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108:863-868.
- Barcellos LF, May SL, Ramsay PP, Quach HL, Lane JA, Nithitham J *et al.* (2009). High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet* 5:e1000696.
- Bateman JF, Wilson R, Freddi S, Lamandé SR, Savarirayan R (2005). Mutations of COL10A1 in Schmid metaphyseal chondrodysplasia. *Hum Mutat* 25:525-534.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452-454.
- Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B (2005). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 64:1263-1267.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* 57:289-300.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H *et al.* (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235-242.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R *et al.* (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6:317-339.
- Boeuf S, Steck E, Pelttari K, Hennig T, Buneb A, Benz K *et al.* (2008). Subtractive gene expression profiling of articular cartilage and

- mesenchymal stem cells: serpins as cartilage-relevant differentiation markers. *Osteoarthritis Cartilage* 16:48-60.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Åstrand M, Speed TP (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19:185-193.
- Bowe EA, Murray RC, Jeffcott LB, Davies ME (2007). Do the matrix degrading enzymes cathepsins B and D increase following a high intensity exercise regime? *Osteoarthritis Cartilage* 3:343-349.
- Brandt KD, Braunstein EM, Visco DM, O'Connor B, Heck D, Albrecht M (1991). Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *J Rheumatol* 18:436-446.
- Brott BK, Sokol SY (2005). Frnd3 proteins: modulators of Wnt signaling in vertebrate development. *Differentiation* 73:323-329.
- Brunner E, Ahrens CH, Mohanty S, Baetschmann H, Loevenich S, Potthast f *et al.* (2007). A high-quality catalog of the *Drosophila melanogaster* proteome. *Nat Biotechnol* 25:576-583.
- Burnette WN (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
- Burr DB (1998). The importance of subchondral bone in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 10:256-262.
- C**amafeita E, Calvo E, López JA (2005). Customisable VBA applications for proteomic data retrieval. Póster presentado en el I Congress of the Spanish Proteomics Society, Córdoba, España, 14-17 febrero.
- Campàs M, Katakis I (2004). DNA biochip arraying, detection and amplification strategies. *TrAC Trends Anal Chem* 23:49-62.
- Campbell JJ, Blain EJ, Chowdhury TT, Knight MM (2007). Loading alters actin dynamics and up-regulates cofilin gene expression in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 361:329-334.
- Caplan AI (2005). Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11:1198-1211.
- Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol* 8:R3.
- Catterall JB, Rowan AD, Sarsfield S, Saklatvala J, Wait R, Cawston TE (2006). Development of a novel 2D proteomics approach for the identification of proteins secreted by primary chondrocytes after stimulation by IL-1 and oncostatin M. *Rheumatology* 45:1101-1109.
- Celli L, Ryckewaert JJ, Delachanal E, Duperray A (2006). Evidence of a functional role for interaction between ICAM-1 and nonmuscle alpha-actinins in leukocyte diapedesis. *J Immunol* 177:4113-4121.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25:2739-2749.
- Chambers JM (2008). *Software for Data Analysis: Programming with R*. Nueva York: Springer.
- Chapman K, Mustafa Z, Dowling B, Southam L, Carr A, Loughlin J (2002). Finer linkage mapping of primary hip osteoarthritis susceptibility on chromosome 11q in a cohort of affected female sibling pairs. *Arthritis Rheum* 46:1780-1783.
- Chen CT, Burton-Wurster N, Borden C, Hueffer K, Bloom SE, Lust G (2001). Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage. *J Orthop Res* 19:703-711.
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL *et al.* (2002). Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1:304-313.
- Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M *et al.* (2001). Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32:1005-1011.
- Chiellini C, Cochet O, Negroni L, Samson M, Poggi M, Ailhaud G *et al.* (2008). Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol* 9:26.
- Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* 20:16-24.
- Clauser KR, Baker PR, Burlingame AL (1999). Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem* 71:2871-2882.
- Clements KM, Price JS, Chambers MG, Visco DM, Poole AR, Mason RM (2003). Gene deletion of either interleukin-1beta, interleukin-1beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy. *Arthritis Rheum* 48:3452-3463.
- Clouet J, Vinatier C, Merceron C, Pot-vaucel M, Maugars Y, Weiss P, *et al.* (2009). From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drug Discov Today* 14:913-925.
- Coe BP, Chari R, Lockwood WW, Lam WL (2008). Evolving strategies for global gene expression analysis of cancer. *J Cell Physiol* 217:590-597.
- Colinge J, Masselot A, Giron M, Dessingy T, Magnin J (2003). OLAV: Towards high-throughput tandem mass spectrometry data identification. *Proteomics* 3:1454-1463.
- Cooper C, Snow S, McAlindon TE, Kellingray S, Stuart B, Coggon D *et al.* (2000). Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43:995-1000.
- Cotter RJ (1992). Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal Chem* 64:1027A-1039A.
- Cunnane G, FitzGerald O, Hummel KM, Youssef PP, Gay RE, Gay S *et al.* (2001). Synovial tissue protease gene expression and joint

- erosions in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44:1744-1753.
- Curmi PA, Gavet O, Charbaut E, Ozon S, Lachkar-Colmerauer S, Manceau V *et al.* (1999). Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell Struct Funct* 24:345-357.
- D**awson J, Linsell L, Zondervan K, Rose P, Randall T, Carr A *et al.* (2004). Epidemiology of hip and knee pain and its impact on overall health status in older adults. *Rheumatology (Oxford)* 43:497-504.
- Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8:739-750.
- De Ceuninck F, Dassencourt L, Anract P (2004). The inflammatory side of human chondrocytes unveiled by antibody microarrays. *Biochem Biophys Res Commun* 323: 960-969.
- Demissie S, Cupples LA, Myers R, Aliabadi P, Levy D, Felson DT (2002). Genome scan for quantity of hand osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 46:946-952.
- Derfus BA, Kurtin SM, Camacho NP, Kurup I, Ryan LM (1996). Comparison of matrix vesicles derived from normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Connect Tissue Res* 35:337-342.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M *et al.* (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14:457-460.
- Deutsch EW, Lam H, Aebersold R (2008). PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows. *EMBO Rep* 9:429-434.
- Dichmann S, Herouy Y, Purlis D, Rheinen H, Gebicke-Härter P, Norgauer J (2001). Fractalkine induces chemotaxis and actin polymerization in human dendritic cells. *Inflamm Res* 50:529-533.
- Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noël D, Jorgensen C (2009). Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 5:392-399.
- Djouad F, Delorme B, Maurice M, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P *et al.* (2007). Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 9:R33.
- Djouad F, Mrugala D, Noël D, Jorgensen C (2006). Engineered mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Regenerative Med* 1:529-537.
- Doerr A (2007). Focus on mass spectrometry in proteomics. *Nat Meth* 4:781.
- Dominguez-Soto A, Relloso M, Vega MA, Corbí AL, Puig-Kröger A (2005). RUNX3 regulates the activity of the CD11a and CD49d integrin gene promoters. *Immunobiology* 210:133-139.
- Domon B, Aebersold R (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312:212-217.
- Dray A, Read SJ (2007). Arthritis and pain. Future targets to control osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther* 9:212.
- Durany N, Joseph J, Cruz-Sanchez FF, Carreras J. (1997). Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase and creatine kinase activity and isoenzymes in human brain tumours. *Br J Cancer* 76:1139-1149.
- Durany N, Joseph J, Jimenez OM, Climent F, Fernandez PL, Rivera, F *et al.* (2000). Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase, creatine kinase and enolase activity and isoenzymes in breast carcinoma. *Br J Cancer* 82:20-27.
- E**dman P, Begg G (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1:80-91.
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR (1994). An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 5:976-989.
- Eriksson JE, He T, Trejo-Skalli AV, Härmälä-Braskén AS, Hellman J, Chou YH *et al.* (2004). Specific in vivo phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments. *J Cell Sci* 117:919-932.
- F**elson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM *et al.* (2000). Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med.* 133:635-646.
- Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF (1987). The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 30:914-918.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989). Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246:64-71.
- Fiedler J, Etzel N, Brenner RE (2004). To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. *J Cell Biochem* 93:990-998.
- Fiedler J, Röderer G, Günther KP, Brenner RE (2002). BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87:305-312.
- Flahiff CM, Kraus VB, Huebner JL, Setton LA (2004). Cartilage mechanics in the guinea pig model of osteoarthritis studied with an osmotic loading method. *Osteoarthritis Cartilage* 12:383-388.
- Forster T, Chapman K, Loughlin J (2004a). Common variants within the interleukin 4 receptor alpha gene (IL4R) are associated with susceptibility to osteoarthritis. *Hum Genet* 114:391-395.
- Forster T, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, Loughlin J (2004b). Finer linkage mapping of primary osteoarthritis susceptibility loci on chromosomes 4 and 16 in families with affected women. *Arthritis Rheum* 50:98-102.
- Foster LJ, Zeemann PA, Li C, Mann M, Jensen ON, Kassem M (2005). Differential expression profiling of membrane proteins by

- quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells* 23:1367-1377.
- Foulon T, Cadel S, Cohen P (1999). Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int J Biochem Cell Biol* 31:747-750.
- Freist W, Logan DT, Gauss DH (1996). Glycyl-tRNA synthetase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377: 343-356.
- Frenkel SR, Clancy RM, Ricci JL, Di Cesare PE, Rediske JJ, Abramson SB (1996). Effects of nitric oxide on chondrocyte migration, adhesion, and cytoskeletal assembly. *Arthritis Rheum* 39:1905-1112.
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA *et al.* (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2:83-92.
- Friedman MS, Oyserman SM, Hankenson KD (2009). Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. *J Biol Chem* 284:14117-14125.
- Fukui N, Miyamoto Y, Nakajima M, Ikeda Y, Hikita A, Furukawa H *et al.* (2008). Zonal gene expression of chondrocytes in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 58:3843-3853.
- Fytilli P, Giannatou E, Karachalios T, Malizos K, Tsezou A (2005). Interleukin-10G and interleukin-10R microsatellite polymorphisms and osteoarthritis of the knee. *Clin Exp Rheumatol* 23:621-627.
- Garcia** BA, Platt MD, Born TL, Shabanowitz J, Marcus NA, Hunt DF (2006). Protein profile of osteoarthritic human articular cartilage using tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:2999-3006.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3784-3788.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80.
- Geyer M, Grässel S, Straub RH, Schett G, Dinser R, Grifka J *et al.* (2009). Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage* 17:328-335.
- Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20:601-605.
- Giachelli CM, Steitz S (2000). Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol* 19:1615-19622.
- Gobeze R, Kho A, Krastins B, Sarracino DA, Thornhill TS, Chase M *et al.* (2007). High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 9:R36.
- Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C *et al.* (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev* 20:543-556.
- Godwin SL, Soltoff SP (1997). Extracellular calcium and platelet-derived growth factor promote receptor-mediated chemotaxis in osteoblasts through different signaling pathways. *J Biol Chem* 272:11307-11312.
- Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S *et al.* (2003). In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 288:51-59.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R *et al.* (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21:1037-1053.
- Görg A, Postel W, Günther S (1988). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9:531-546.
- Grass R, Müller M, Gasteiger E, Gay S, Binz PA, Bienvenut W *et al.* (1999). Improving protein identification from peptide mass fingerprinting through a parameterized multi-level scoring algorithm and an optimized peak detection. *Electrophoresis* 20:3535-3550.
- Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L *et al.* (2002). Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 1:323-333.
- Grodzinsky AJ, Levenston ME, Jin M, Frank EH (2000). Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. *Annu Rev Biomed Eng* 2:691-713.
- Grove JE, Bruscia E, Krause DS (2004). Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22:487-500.
- Guilak (1995). Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus. *J Biomech* 28:1529-1541.
- Guilak F, Ratcliffe A, Lane N, Rosenwasser MP, Mow VC (1994). Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res* 12:474-484.
- Guo D, Tan W, Wang F, Lv Z, Hu J, Lv T *et al.* (2008). Proteomic analysis of human articular cartilage: identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis. *J Bone Spine* 75:439-444.
- Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9390-9395.
- Handley** CJ, Mok MT, Ilic MZ, Adcocks C, Buttle DJ, Robinson HC (2001). Cathepsin D cleaves aggrecan at unique sites within the interglobular domain and chondroitin sulfate attachment regions that are also cleaved when cartilage is maintained at acid pH. *Matrix Biol* 20:543-553.
- Haq I, Murphy E, Dacre J (2003). Osteoarthritis. *Postgrad Med J* 79:377-383.

- Harrington ED, Jensen LJ, Bork P (2008). Predicting biological networks from genomic data. *FEBS Lett* 582:1251-1258.
- Hasharoni A, Zilberman Y, Turgeman G, Helm GA, Liebergall M, Gazit D (2005). Murine spinal fusion induced by engineered mesenchymal stem cells that conditionally express bone morphogenetic protein-2. *J Neurosurg Spine* 3:47-52.
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M (1998). Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41:1632-1638.
- Hattori A, Tsujimoto M (2004). Processing of antigenic peptides by aminopeptidases. *Biol Pharm Bull* 27:777-780.
- Ha-Vinh R, Alanay Y, Bank RA, Campos-Xavier AB, Zankl A, Superti-Furga A *et al.* (2004). Phenotypic and molecular characterization of Bruck syndrome (osteogenesis imperfecta with contractures of the large joints) caused by a recessive mutation in PLOD2. *Am J Med Genet A* 131:115-120.
- Hecht JT, Hayes E, Snuggs M, Decker G, Montufar-Solis D, Doege K *et al.* (2001). Calreticulin, PDI, Grp94 and BiP chaperone proteins are associated with retained COMP in pseudoachondroplasia chondrocytes. *Matrix Biol* 20:251-262.
- Hegmann TE, Schulte DL, Lin JL, Lin JJ (1991). Inhibition of intracellular granule movement by microinjection of monoclonal antibodies against caldesmon. *Cell Motil Cytoskeleton* 20:109-120.
- Heinzel K, Benz C, Bleul CC (2007). A silent chemokine receptor regulates steady-state leukocyte homing in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8421-8426.
- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C (1993). Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5011-5015.
- Hermansson M, Sawaji Y, Bolton M, Alexander S, Wallace A, Begum, S *et al.* (2004). Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 279: 43514-43521.
- Herrero J, Al-Shahrouf F, Diaz-Uriarte R, Mateos A, Vaquerizas JM, Santoyo J *et al.* (2003). Gepas: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3461-3467.
- Hershko A (2005). The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ* 12:1191-1197.
- Heukeshoven J, Dernick R (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6:103-112.
- Hochberg MC, Altman RD, Brandt KD, Clark BM, Dieppe PA, Griffin MR *et al.* (1995a). Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part I. Osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 38:1535-1540.
- Hochberg MC, Altman RD, Brandt KD, Clark BM, Dieppe PA, Griffin MR *et al.* (1995b). Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 38:1541-1546.
- Hoffmann R, Valencia A (2004). A Gene Network for Navigating the Literature. *Nat Genet* 36:664.
- Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ *et al.* (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2199-2204.
- Homandberg GA, Meyers R, Xie DL (1992). Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *J Biol Chem* 267:3597-3604.
- Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 24:1030-1041.
- Hopwood B, Tsykin A, Findlay DM, Fazzalari NL (2009). Gene expression profile of the bone microenvironment in human fragility fracture bone. *Bone* 44:87-101.
- Hotulainen P, Paunola E, Vartiainen MK, Lappalainen P (2005). Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell* 16:649-664.
- Hubbard MJ, Mkrtchian S, Sandalova T (2006). ERp29, an unusual redox-inactive member of the thioredoxin family. *Antioxid Redox Signal* 8:325-337.
- Hubert T, Van Impe K, Vandekerckhove J, Gettemans J (2009). The actin-capping protein CapG localizes to microtubule-dependent organelles during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 380:166-170.
- Hughes FJ, Aubin JE, Heersche JN (1992). Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. *Bone Miner* 19:63-74.
- Hughes SC, Fehon RG (2007). Understanding ERM proteins — the awesome power of genetics finally brought to bear. *Curr Opin Cell Biol* 19:51-56.
- Hunter DJ, Demissie S, Cupples LA, Aliabadi P, Felson DT (2004). A genome scan for joint-specific hand osteoarthritis susceptibility: The Framingham Study. *Arthritis Rheum* 50:2489-2496.
- deker** T, Thorsson V, Ranish JA, Christmas R, Buhler J, Eng JK *et al.* (2001). Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 292:929-934.
- Ito Y, Miyazono K (2003). RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* 13:43-47.
- Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signalling. *Exp Cell Res* 313:2050-2062.

- J**ames A, Jorgensen C (2010). Basic design of MRM assays for peptide quantification. *Methods Mol Biol* 658:167-185.
- Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J *et al.* (2009). STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 37:D412-D416.
- Johnson BJ, Le TT, Dobbin CA, Banovic T, Howard CB, Flores Fde M *et al.* (2005). Heat shock protein 10 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator production. *J Biol Chem* 280:4037-4047.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238:265-272.
- Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, Luta G, Dragomir AD, Woodard J *et al.* (2009). Prevalence of hip symptoms and radiographic and symptomatic hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol* 36:809-815.
- Josic D, Clifton JG (2007). Use of monolithic supports in proteomics technology. *J Chromatogr A* 1144:2-13.
- K**amphorst JJ, van der Heijden R, DeGroot J, Lafeber FP, Reijmers TH, van El B *et al.* (2007). Profiling of endogenous peptides in human synovial fluid by nanoLC-MS: method validation and peptide identification. *J Proteom Res* 6:4388-4396.
- Kanehisa M, Goto S (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27-30.
- Karas M, Hillenkamp F (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 Daltons. *Anal Chem* 60:2299-2301.
- Karlsson C, Dehne T, Lindahl A, Brittberg M, Pruss A, Sitterling M *et al.* (2010). Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 18:581-592.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW *et al.* (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557-563.
- Karp NA, Kreil DP, Lilley KS (2004). Determining a significant change in protein expression with DeCyder during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* 4:1421-1432.
- Keyszer G, Redlich A, Haupl T, Zacher J, Sparmann M, Enghthum U *et al.* (1998). Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Arthritis Rheum* 41:1378-1387.
- Kim HA, Blanco FJ (2007). Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets* 8:333-345.
- Kim KA, Wagle M, Tran K, Zhan X, Dixon MA, Liu S *et al.* (2008). R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol Biol Cell* 19:2588-2596.
- Kim MK, Min do S, Park YJ, Kim JH, Ryu SH, Bae YS (2007b). Expression and functional role of formyl peptide receptor in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FEBS Lett* 581:1917-1922.
- Kirsch T, Swoboda B, Nah H (2000). Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 8:294-302.
- Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S *et al.* (2009). Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum* 60:813-823.
- Kitteringham NR, Jenkins RE, Lane CS, Elliott VL, Park BK (2009). Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877:1229-1239.
- Kizawa H, Kou I, Iida A, Sudo A, Miyamoto Y, Fukuda A *et al.* (2005). An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 37:138-144.
- Knudsen S (2002). A biologist's guide to analysis of DNA microarray data. Nueva York: John Wiley & Sons.
- Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J *et al.* (2005). Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 52:128-135.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10711-10716.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R *et al.* (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377.
- Kroninck MN (2004). Creation of the whole human genome microarray. *Expert Rev Proteomics* 1:19-28.
- Kubota K, Wakabayashi K, Matsuoka T (2003). Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: Two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography. *Proteomics* 3:616-626.
- Kuettner KE (1992). Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 25:155-163.
- Kuettner KE, Goldberg VM (1995). Introduction. En: Kuettner KE, Goldberg VM, editores. *Osteoarthritic disorders*. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons, p. xxi-xxv.
- Kuster B, Schirle M, Mallick P, Aebersold R (2005). Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:577-583.

- L**aemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambrecht S, Verbruggen G, Verdonk PC, Elewaut D, Deforce D (2008). Differential proteome analysis of normal and osteoarthritic chondrocytes reveals distortion of vimentin network in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16:163-173.
- Lane NE, Nevitt MC (2002). Osteoarthritis, bone mass, and fractures: how are they related? *Arthritis Rheum* 46:1-4.
- Latterich M, Abramovitz M, Leyland-Jones B (2008). Proteomics: new technologies and clinical applications. *Eur J Cancer* 44:2737-2741.
- Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA *et al.* (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58:26-35.
- Learmonth ID, Young C, Rorabeck C (2007). The operation of the century: total hip replacement. *Lancet* 370:1508-1519.
- Lee HK, Lee BH, Park SA, Kim CW (2006). The proteomic analysis of an adipocyte differentiated from human mesenchymal stem cells using two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 6:1223-1229.
- Lementowski PW, Zelicof SB (2008). Obesity and osteoarthritis. *Am J Orthop* 37:148-151.
- Leppävuori J, Kujala U, Kinnunen J, Kaprio J, Nissilä M, Heliövaara M *et al.* (1999). Genome scan for predisposing loci for distal interphalangeal joint osteoarthritis: evidence for a locus on 2q. *Am J Hum Genet* 65:1060-1067.
- Li WW, Nemirovskiy O, Fountain S, Rodney Mathews W, Szekely-Klepser G (2007). Clinical validation of an immunoaffinity LC-MS/MS assay for the quantification of a collagen type II neoepitope peptide: A biomarker of matrix metalloproteinase activity and osteoarthritis in human urine. *Anal Biochem* 369:41-53.
- Li Y, Lin JL, Reiter RS, Daniels K, Soll DR, Lin JJ (2004). Caldesmon mutant defective in Ca(2+)-calmodulin binding interferes with assembly of stress fibers and affects cell morphology, growth and motility. *J Cell Sci* 117:3593-3604.
- Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R *et al.* (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 6:1282-1286.
- Liu A, Stadelmann C, Moscarello M, Bruck W, Sobel A, Mastronardi FG (2005). Expression of stathmin, a developmentally controlled cytoskeleton-regulating molecule, in demyelinating disorders. *J Neurosci* 25:737-747.
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS *et al.* (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14:1675-1680.
- Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B *et al.* (2000). Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 15:205-212.
- López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F *et al.* (2006). Cytokines, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 14:660-669.
- Loty S, Forest N, Boulekbache H, Sautier JM (1995). Cytochalasin D induces changes in cell shape and promotes in vitro chondrogenesis: a morphological study. *Biol Cell* 83:149-161.
- Loughlin J (2001). Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheum* 13:111-116.
- Loughlin J (2002). Genome studies and linkage in primary osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 28:95-109.
- Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L *et al.* (2004). Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9757-9762.
- Loughlin J, Dowling B, Mustafa Z, Southam L, Chapman K (2002a). Refined linkage mapping of a hip osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 2q. *Rheumatology (Oxford)* 41:955-956.
- Loughlin J, Mustafa Z, Dowling B, Southam L, Marcelline L, Rääinä SS, *et al.* (2002b). Finer linkage mapping of a primary hip osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 6. *Eur J Hum Genet* 10:562-568.
- Lucas AD, Bursill C, Guzik TJ, Sadowski J, Channon KM, Greaves DR (2003). Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation* 108:2498-2504.
- Luyten FP (2004). Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 16:599-603.
- M**ackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF *et al.* (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4:415-428.
- Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M (2003). Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 53:697-702.
- Mahr S, Burmester GR, Hilke D, Göbel U, Grützkau A, Häupl T *et al.* (2006). Cis- and trans-acting gene regulation is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 78:793-803.
- Maksymowych WP, Inman RD, Gladman DD, Reeve JP, Pope A, Rahman P (2009). Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 60:1317-1323.
- Mallick P, Schirle M, Chen SS, Flory MR, Lee H, Martin D *et al.* (2007). Computational prediction of proteotypic peptides for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* 25:125-31.
- Mann M (2009). Comparative analysis to guide quality improvements in proteomics. *Nat Methods* 6:717-719.

- Mann M, Jensen ON (2003). Proteomic analysis of posttranslational modifications. *Nat Biotechnol* 21:255–261.
- Maroudas A, Schneiderman R (1987). "Free" and "exchangeable" or "trapped" and "non-exchangeable" water in cartilage. *J Orthop Res* 5:133-138.
- Marshall KW, Zhang H, Yager TD, Nossova N, Dempsey A, Zheng R *et al.* (2005). Blood-based biomarkers for detecting mild osteoarthritis in the human knee. *Osteoarthritis Cartilage* 13:861-871.
- Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S *et al.* (1992). The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 35:530-540.
- McDevitt C, Gilbertson E, Muir H (1977). An experimental model of osteoarthritis; early morphological and biochemical changes. *J Bone Joint Surg Br* 59:24-35.
- McKusick VA (1998). Mendelian inheritance in man. A catalog of human genes and genetic disorders, 12 edición. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Medzihradsky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML *et al.* (2000). The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* 75:552-558.
- Mehraban F, Tindal MH, Proffitt MM, Moskowitz RW (1997). Temporal pattern of cysteine endopeptidase (cathepsin B) expression in cartilage and synovium from rabbit knees with experimental osteoarthritis: gene expression in chondrocytes in response to interleukin-1 and matrix depletion. *Ann Rheum Dis* 56:108-115.
- Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I *et al.* (1998). Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41:2165-2174.
- Meulenbelt I, Kloppenburg M, Kroon HM, Houwing-Duistermaat JJ, Garnero P, Heliö-Le Graverand MP *et al.* (2007). Clusters of biochemical markers are associated with radiographic subtypes of osteoarthritis (OA) in subject with familial OA at multiple sites. The GARP study. *Osteoarthritis Cartilage* 15:379-385.
- Meulenbelt I, Min JL, Bos S, Riyazi N, Houwing-Duistermaat JJ, van der Wijk HJ *et al.* (2008). Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet* 17:1867-1875.
- Meulenbelt I, Seymour AB, Nieuwland M, Huizinga TW, van Duijn CM, Slagboom PE (2004). Association of the interleukin-1 gene cluster with radiographic signs of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 50:1179-1186.
- Miklos GL, Maleszka R (2004). Microarray reality checks in the context of a complex disease. *Nat Biotechnol* 22, 615-621.
- Millward-Sadler SJ, Salter DM (2004). Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* 32:435-446.
- Minden JS, Dowd SR, Meyer HE, Stühler K (2009). Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis* 30:S156-S161.
- Mio F, Chiba K, Hirose Y, Kawaguchi Y, Mikami Y, Oya T, Mori M *et al.* (2007). A functional polymorphism in COL11A1, which encodes the alpha 1 chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. *Am J Hum Genet* 81:1271-1277.
- Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S *et al.* (2007). A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet* 39:529-533.
- Mohamed MM, Sloane BF (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:764-775.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J *et al.* (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are co-ordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34, 267-273.
- Morawietz L, Martinez-Gamboa L, Scheffler S, Hausdorf G, Dankof A, Kuckelkorn U *et al.* (2009). Expression of proteasomal immunosubunit beta1i is dysregulated in inflammatory infiltrates of minor salivary glands in Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 36:2694-2703.
- Mototani H, Mabuchi A, Saito S, Fujioka M, Iida A, Takatori Y *et al.* (2005). A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* 14:1009-1017.
- Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F (2002). Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46:704-713.
- Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP (2003). Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48:3464-3474.
- Murray RC, Zhu CF, Goodship AE, Lakhani KH, Agrawal CM, Athanasiou KA *et al.* (1999). Exercise affects the mechanical properties and histological appearance of equine articular cartilage. *J Orthop Res* 17:725-731.
- N**adon R, Shoemaker J (2002). Statistical issues with microarrays: processing and analysis. *Trends Genet* 18:265-271.
- Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J *et al.* (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 65:3307-3318.
- Nakase T, Kaneko M, Tomita T, Myoui A, Ariga K, Sugamoto K, *et al.* (2000). Immunohistochemical detection of cathepsin D, K, and L in the process of endochondral ossification in the human. *Histochem Cell Biol* 114:21-27.
- Nash R, Weng S, Hitz B, Balakrishnan R, Christie KR, Costanzo MC *et al.* (2007). Expanded protein information at SGD: new pages and proteome browser. *Nucleic Acids Res* 35:D468-D471.

- Nedjadi T, Kitteringham N, Campbell F, Jenkins RE, Park BK, Navarro P *et al.* (2009). S100A6 binds to annexin 2 in pancreatic cancer cells and promotes pancreatic cancer cell motility. *Br J Cancer* 101:1145-1154.
- Nelson F, Billingham RC, Pidoux I, Reiner A, Langworthy M, McDermott M *et al.* (2006). Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of the anterior cruciate ligament. *Osteoarthritis Cartilage* 14:114-119.
- Nemirovskiy OV, Dufield DR, Sunyer T, Aggarwal P, Welsch DJ, Mathews WR (2007). Discovery and development of a type II collagen neopeptide (TIINE) biomarker for matrix metalloproteinase activity: from in vitro to in vivo. *Anal Biochem* 361:93-101.
- Newman B, Wallis GA (2003). Skeletal dysplasias caused by a disruption of skeletal patterning and endochondral ossification. *Clin Genet* 63:241-251.
- Nishimura G, Manabe N, Kosaki K, Haga N, Ohashi H, Nakamura K *et al.* (2001). Spondylar dysplasia in type X collagenopathy. *Pediatr Radiol* 31:76-80.
- Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F *et al.* (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res* 37:W317-W322.
- Nurminskaya M, Linsenmayer TF (1996). Identification and characterization of up-regulated genes during chondrocyte hypertrophy. *Dev Dyn* 206:260-271.
- O**ettmeier R, Abendroth K (1989). Osteoarthritis and bone: osteologic types of osteoarthritis of the hip. *Skeletal Radiol* 18:165-174.
- O'Farrell PH (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021.
- Ogawara M, Inagaki N, Tsujimura K, Takai Y, Sekimata M, Ha MH *et al.* (1995). Differential targeting of protein kinase C and CaM kinase II signalings to vimentin. *J Cell Biol* 131:1055-1066.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B *et al.* (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705.
- P**aavilainen VO, Bertling E, Falck S, Lappalainen P (2004). Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol* 14:386-394.
- Pachner A, Narayan K, Price N, Hurd M, Dail D (2003). MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity. *Mol Diagn* 7:17-25.
- Papadopoulos EJ, Fitzhugh DJ, Tkaczyk C, Gilfillan AM, Sasseti C, Metcalfe DD *et al.* (2000). Mast cells migrate, but do not degranulate, in response to fractalkine, a membrane-bound chemokine expressed constitutively in diverse cells of the skin. *Eur J Immunol* 30:2355-2361.
- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3:327-332.
- Patterson SD (1998). Protein identification and characterization by mass spectrometry. En: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA *et al.*, editores. *Current Protocols in Molecular Biology*. Nueva York: Wiley, p. 10.22.1-10.22.24.
- Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD *et al.* (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4857-4861.
- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551-3567.
- Pfendner EG, Lucky AW (2006). Dystrophic epidermolysis bullosa. En: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editores. *GeneReviews* [Internet]. Seattle: University of Washington, Seattle, p. 1993-1999.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD *et al.* (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Pola E, Papaleo P, Pola R, Gaetani E, Tamburelli FC, Aulisa L *et al.* (2005). Interleukin-6 gene polymorphism and risk of osteoarthritis of the hip: a case-control study. *Osteoarthritis Cartilage* 13:1025-1028.
- Ponte AL, Marais E, Gally N, Langonné A, Delorme B, Héroult O *et al.* (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25:1737-1745.
- Poole AR (2005). Cartilage in health and disease. En: Koopman WJ, Moreland LW, editores. *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*, 3.a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 223-269.
- Poole AR, Guilak F, Abramson SB (2007). Etiopathogenesis of osteoarthritis. En: Moskowitz RW, Altman RW, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM, editores. *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management*, 4.a ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, p. 27-49.
- Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA *et al.* (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 14:13-29.
- R**amakrishnan R, Dorris D, Lublinsky A, Nguyen A, Domanus M, Prokhorova A *et al.* (2002). An assessment of motorola codelink microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic Acids Res* 30:e30.
- Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M (2007). A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 21:860-867.

- Rebholz-Schuhmann D, Kirsch H, Arregui M, Gaudan S, Riethoven M, Stoehr P (2007). EBIMed—text crunching to gather facts for proteins from Medline. *Bioinformatics* 23:E237-E244.
- Renault-Mihara F, Beuvon F, Iturrioz X, Canton B, De Bouard S, Léonard N *et al.* (2006). Phosphoprotein enriched in astrocytes-15 kDa expression inhibits astrocyte migration by a protein kinase C delta-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 17:5141-5152.
- Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR *et al.* (2007). Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem* 101:135-146.
- Robin NH, Moran RT, Warman M, Ala-Kokko L (2000). Stickler Syndrome. En: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editores. *GeneReviews* [Internet]. Seattle: University of Washington, Seattle, p. 1993-1998.
- Rockwood AL, Van Orden SL (1996). Ultrahigh-Speed Calculation of Isotope Distributions. *Anal Chem* 68:2027-2030.
- Rogers S, Girolami M, Kolch W, Waters KM, Liu T, Thrall B *et al.* (2008). Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. *Bioinformatics* 24:2894-2900.
- Roses AD (2008). Pharmacogenetics in drug discovery and development: a translational perspective. *Nat Rev Drug Discov* 7:807-817.
- Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martínez-Gomariz M, Fernández M *et al.* (2008a). Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: A decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics* 8:172-189.
- Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, Remeseiro S, López-Armada MJ, Blanco FJ (2008b). Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics* 8:495-507.
- Ruiz-Romero C, Lopez-Armada MJ, Blanco FJ (2005). Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: A novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* 5:3048-3059.
- Ruiz-Romero C, Lopez-Armada MJ, Blanco FJ (2006). Mitochondrial proteomic characterization of human normal chondrocytes. *Osteoarthr Cartil* 14:507-518.
- S**aeed, AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N *et al.* (2003). Tm4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34:374-348.
- Sánchez-Madrid F, del Pozo MA (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 18:501-511.
- Schäfer C, Clapp P, Welsh MJ, Benndorf R, Williams JA (1999). HSP27 expression regulates CCK-induced changes of the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells. *Am J Physiol* 277:C1032-C1043.
- Scharstuhl A, Schewe B, Benz K, Gaissmaier C, Buhning HJ, Stoop R (2007). Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology. *Stem Cells* 25:3244-3251.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.
- Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z *et al.* (2007). Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells* 25:245-251.
- Schiess R, Wollscheid B, Aebersold R (2009). Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol* 3:33-44.
- Schuerenberg Luebbert C, Eickhoff H, Kalkum M, Lehrach H, Nordhoff E (2000). Prestructured MALDI-MS sample supports. *Anal Chem* 72:3436-3442.
- Segev F, Héon E, Cole WG, Wenstrup RJ, Young F, Slomovic AR *et al.* (2006). Structural abnormalities of the cornea and lid resulting from collagen V mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:565-573.
- Setton LA, Mow VC, Müller FJ, Pita JC, Howell DS (1994). Mechanical properties of canine articular cartilage are significantly altered following transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 12:451-463.
- Shanske A, Bogdanow A, Shprintzen RJ, Marion RW (1998). Marshall syndrome and a defect at the COL11A1 locus. *Am J Hum Genet* 63:1558-1561.
- Shevchenko A, Tomas H, Vorm O, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1:2856-2860.
- Skrabaneck L, Saini HK, Bader GD, Enright AJ (2008). Computational prediction of protein-protein interactions. *Mol Biotechnol* 38:1-17.
- Slavotinek AM, Biesecker LG (2001). Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease. *Trends Genet* 17:528-535.
- Smith AJ, Gidley J, Sandy JR, Perry MJ, Elson CJ, Kirwan JR *et al.* (2005). Haplotypes of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene: are they a risk factor in osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 13:608-613.
- Smith RL, Carter DR, Schurman DJ (2004). Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review. *Clin Orthop Relat Res* 427 Suppl:S89-S95.
- Smyth GK (2005). Limma: linear models for microarray data. En: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W, editores. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Nueva York: Springer, p. 397-420.
- Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T *et al.* (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* 106:419-427.

- Soung do Y, Dong Y, Wang Y, Zuscik MJ, Schwarz EM, O'Keefe RJ *et al.* (2007). Runx3/AML2/Cbfa3 regulates early and late chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res* 22:1260-1270.
- Southam L, Dowling B, Ferreira A, Marcelline L, Mustafa Z, Chapman K *et al.* (2004). Microsatellite association mapping of a primary osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 6p12.3-q13. *Arthritis Rheum* 50:3910-3914.
- Spector TD, Reneland RH, Mah S, Valdes AM, Hart DJ, Kammerer S *et al.* (2006). Association between a variation in LRCH1 and knee osteoarthritis: a genome-wide single-nucleotide polymorphism association study using DNA pooling. *Arthritis Rheum* 54:524-532.
- Sperber SM, Dawid IB (2008). Barx1 is necessary for ectomesenchyme proliferation and osteochondroprogenitor condensation in the zebrafish pharyngeal arches. *Dev Biol* 321:101-110.
- Stahl-Zeng J, Lange V, Ossola R, Eckhardt K, Krek W, Aebersold R *et al.* (2007). High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. *Mol Cell Proteomics* 6:1809-1817.
- Stefánsson SE, Jónsson H, Ingvarsson T, Manolescu I, Jónsson HH, Olafsdóttir G *et al.* (2003). Genomewide scan for hand osteoarthritis: a novel mutation in matrilin-3. *Am J Hum Genet* 72:1448-1159.
- Steinbeck MJ, Nesti LJ, Sharkey PF, Parvizi J (2007). Myeloperoxidase and chlorinated peptides in osteoarthritis: potential biomarkers of the disease. *J Orthop Res* 25:1128-1135.
- Studený M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002 62:3603-3608.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545-15550.
- Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A (2003). A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal Bioanal Chem* 376:952-965.
- Sun HJ, Bahk YY, Choi YR, Shim JH, Han SH, Lee JW (2006). A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. *J Orthop Res* 24:2059-2571.
- T**amamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T *et al.* (2005). Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem* 280:19185-19195.
- Tashima S, Shimada S, Yamaguchi K, Tsuruta J, Ogawa M (2000). Expression of brain-type glycogen phosphorylase is a potentially novel early biomarker in the carcinogenesis of human colorectal carcinomas. *Am J Gastroenterol* 95:255-263.
- Tchetina EV, Squires G, Poole AR (2005). Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J Rheumatol* 32:876-886.
- The Gene Ontology Consortium (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genet* 25:25-29.
- Tian Q, Stepanians SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ *et al.* (2004). Integrated genomic and proteomic analyses mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3:960-969.
- Tuloup M, Hernandez C, Coro I, Hoogland C, Binz P-A, Appel RD (2003). Aldente and BioGraph: An improved peptide mass fingerprinting protein identification environment, Swiss Proteomics Society 2003 Congress: Understanding Biological Systems through Proteomics, Basilea, Suiza, 2-4 dic. 2003, Ed. FontisMedia, p. 174-176.
- U**nú M, Morgan ME, Minden JS (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18:2071-2077.
- V**aldes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV *et al.* (2004). Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 50:2497-2507.
- Valdes AM, Spector TD (2010). The genetic epidemiology of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 22:139-143.
- Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M *et al.* (2006). Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum* 54:533-539.
- Vanags D, Williams B, Johnson B, Hall S, Nash P, Taylor A *et al.* (2006). Therapeutic efficacy and safety of chaperonin 10 in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind randomised trial. *Lancet* 368:855-863.
- Vergnes L, Péterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K (2004). Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10428-10433.
- Vincourt JB, Lionneton F, Kratassiouk G, Guillemin F, Netter P, Mainard D. *et al.* (2006). Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage. *Mol Cell Proteomics* 5:1984-1995.
- Vincourt JB, Vignaud JM, Lionneton F, Sirveaux F, Kawaki H, Marchal S *et al.* (2008). Increased expression of matrilin-3 not only in osteoarthritic articular cartilage but also in cartilage-forming tumors, and down-regulation of SOX9 via epidermal growth factor domain 1-dependent signaling. *Arthritis Rheum* 58:2798-2808.
- Von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M *et al.* (2005). STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res* 33:D433-D437.
- W**agner W, Feldmann RE, Seckinger A, Maurer MH, Wein F, Blake J *et al.* (2006). The heterogeneity of human

- mesenchymal stem cell preparations—evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp Hematol* 34:536-548.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18:1417-1426.
- Wallis GA, Rash B, Sykes B, Bonaventure J, Maroteaux P, Zabel B *et al.* (1996). Mutations within the gene encoding the alpha 1 (X) chain of type X collagen (COL10A1) cause metaphyseal chondrodysplasia type Schmid but not several other forms of metaphyseal chondrodysplasia. *J Med Genet* 33:450-457.
- Walther TC, Mann M (2010). Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol* 190:491-500.
- Wang N, Butler JP, Ingber DE (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260:1124-1127.
- Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH (2004). Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12:963-973.
- Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J *et al.* (2006). Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* 7:59.
- Warren KS, Shutt DC, McDermott JP, Lin JL, Soll DR, Lin JJ (1996). Overexpression of microfilament-stabilizing human caldesmon fragment, CaD39, affects cell attachment, spreading, and cytokinesis. *Cell Motil Cytoskeleton* 34:215-229.
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR *et al.* (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16:1090-1094.
- Webb GR, Westacott CI, Elson CJ (1997). Chondrocyte tumor necrosis factor receptors and focal loss of cartilage in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 5:427-437.
- Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB (1985). Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* 57:675-679.
- Wilkins RJ, Browning JA, Urban JP (2000). Chondrocyte regulation by mechanical load. *Biorheology* 37:67-74.
- Wilson R, Belluocchio D, Little CB, Fosang AJ, Bateman JF (2008). Proteomic characterization of mouse cartilage degradation in vitro. *Arthritis Rheum* 58:3120-3131.
- Woodman PG (2003). p97, a protein coping with multiple identities. *J Cell Sci* 116:4283-4290.
- Woods A, Wang G, Beier F (2005). RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *J Biol Chem* 280:11626-11634.
- Wu GD, Nolte JA, Jin YS, Barr ML, Yu H, Starnes VA *et al.* (2003). Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 75:679-685.
- X**iang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K *et al.* (2004). Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: identification of triosephosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 50:1511-1521.
- Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Yudoh K *et al.* (2006). Fibulin-4 is a target of autoimmunity predominantly in patients with osteoarthritis. *J Immunol* 176:3196-3204.
- Y**amagiwa H, Sarkar G, Charlesworth MC, McCormick DJ, Bolander ME (2003). Two-dimensional gel electrophoresis of synovial fluid: method for detecting candidate protein markers for osteoarthritis. *J Orthop Sci* 8:482-490.
- Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH *et al.* (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21:3666-3672.
- Yang J, Zhou W, Zheng W, Ma Y, Lin L, Tang T *et al.* (2007). Effects of myocardial transplantation of marrow mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor for the improvement of heart function and angiogenesis after myocardial infarction. *Cardiology* 107:17-29.
- Yasuda T, Poole AR (2002). A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway. *Arthritis Rheum* 46:138-148.
- Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A (2009). Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 11:49-79.
- Yoshida CA, Komori T (2005). Role of Runx proteins in chondrogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 15:243-254.
- Yoshio T, Morita T, Kimura Y, Tsujii M, Hayashi N, Sobue K (2007). Caldesmon suppresses cancer cell invasion by regulating podosome/invadopodium formation. *FEBS Lett* 581:3777-3782.
- Yost RA, Enke CG (1978). Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *J Am Chem Soc* 100:2274-2275.
- Z**hang W y Chait BT (2000). ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal Chem* 72:2482-2489.
- Zhang Y, Niu J, Kelly-Hayes M, Chaisson CE, Aliabadi P, Felson DT (2002). Prevalence of symptomatic hand osteoarthritis and its impact on functional status among elderly: the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 156:1021-1027.
- Zhen EY, Brittain IJ, Laska DA, Mitchell PG, Sumer EU, Karsdal MA *et al.* (2008). Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 58:2420-2431.
- Zheng Q, Zhou G, Morello R, Chen Y, Garcia-Rojas X, Lee B (2003). Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol* 162:833-842.

Zhu M, Tang D, Wu Q, Hao S, Chen M, Xie C *et al.* (2009). Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J Bone Miner Res* 24:12-21.

Anexo: Publicaciones

Hasta el momento de entrega de esta memoria, el trabajo desarrollado durante la preparación de esta Tesis Doctoral forma parte de las siguientes publicaciones:

- Rollín R, Marco F, **Camafeita E**, Calvo E, López-Durán L, Jover JA, López JA, Fernández-Gutiérrez B (2008). Differential proteome of bone marrow mesenchymal stem cells from osteoarthritis patients. *Osteoarthritis Cartilage* 16:929-935.
- Rollín R, Tornero P, Marco F, **Camafeita E**, Calvo E, López-Durán L, Jover JA, López JA, Lamas JR, Fernández-Gutiérrez B (2008). Differential proteome of articular chondrocytes from patients with osteoarthritis. *J Proteomics Bioinformatics* 1:267-280.
- Lamas JR, Rodríguez-Rodríguez L, Vigo AG, Alvarez-Lafuente R, López-Romero P, Marco F, **Camafeita E**, Dopazo A, Callejas S, Villafuertes E, Hoyas JA, Tornero-Esteban MP, Urcelay E, Fernández-Gutiérrez B (2010). Large-scale gene expression in bone marrow mesenchymal stem cells: a putative role for *COL10A1* in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 69:1880-1885.
- **Camafeita E**, Lamas JR, Calvo E, López JA, Fernández-Gutiérrez B (2009). Proteomics: new insights into rheumatic diseases. *Proteomics Clin Appl* 3:226-241.

Del trabajo descrito en esta memoria, el estudio del proteoma diferencial de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea de pacientes con artrosis queda recogido en la primera referencia, mientras que en la segunda se describe el proteoma diferencial de condrocitos provenientes de cartilago de pacientes con artrosis. El estudio de la expresión génica diferencial de células madre mesenquimales se describe en la tercera publicación. La cuarta referencia constituye un artículo de revisión en el que se describe la contribución de los abordajes de tipo proteómico a la investigación de las enfermedades reumáticas. La carpeta "Artículos" del material complementario que se encuentra en el CD incluido en esta memoria contiene la versión electrónica de estos trabajos.

Anexo: Material Complementario

El material complementario que se encuentra en el CD incluido en esta memoria comprende:

- Versión electrónica de los artículos relacionados con el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral (carpeta "Artículos");
- Conjunto adicional de genes de colágeno empleados junto con los 249 conjuntos predefinidos de la base de datos Biocarta en el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (carpeta "Tabla Complementaria 1");
- Resultados del análisis del estudio de la expresión génica diferencial basado en microarrays realizado en esta Tesis Doctoral (carpeta "Tabla Complementaria 2");
- Información detallada en torno a las identificaciones de proteínas realizadas en esta Tesis Doctoral, basadas en la búsqueda en bases de datos a partir de espectros MALDI-MS y MS/MS (carpetas "Tabla Complementaria 3" y "Tabla Complementaria 4" para MSCs y condrocitos, respectivamente).