



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Verificación de potenciales biomarcadores proteicos de artrosis mediante técnicas proteómicas



Trabajo de Fin de Máster

Iván Pensado Méndez

Directoras: Cristina Ruiz Romero y Valentina Calamia

26 de junio de 2015

Agradecimientos

Deseo expresar mi sincero agradecimiento a mi tutora, Cristina Ruiz Romero, sin la cual no sería posible la realización de este trabajo. Muchas gracias por aceptarme como tu tutorado, por tu comprensión y sobre todo por darme la oportunidad de trabajar con un grupo tan maravilloso.

De la misma forma, agradezco a todos los integrantes del grupo de proteómica haberme tendido una mano en todo momento, haber compartido sus conocimientos conmigo y haber hecho las horas de laboratorio mucho más entretenidas. Debo mencionar especialmente a Valentina Calamia, Patricia Fernández, Lucía Lourido y Carolina Fernández.

Aprovecho para dar las gracias a todas esas personas que son un apoyo constante: a mis amigos y compañeros de facultad con los que he convivido este año, y sin los cuales nada hubiese sido lo mismo. Debo agradecer especialmente el apoyo de mi familia, ya que siempre estaban para darme fuerzas cuando era necesario.



**DRA. CRISTINA RUIZ ROMERO, COORDINADORA DEL GRUPO DE PROTEÓMICA DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE A CORUÑA**

INFORMA:

Que la presente memoria de Trabajo de Fin de Máster (TFM) titulado **“Verificación de potenciales biomarcadores proteicos de artrosis mediante técnicas proteómicas.”** presentada por **D. IVÁN PENSADO MÉNDEZ** ha sido realizada bajo mi dirección, y considerando que cumple con las condiciones exigidas autorizo su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en A Coruña, a 17 de junio de 2015.

Fdo. Cristina Ruiz Romero



ÍNDICE

Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 La artrosis y sus mecanismos moleculares	2
1.2 La proteómica	5
1.3 La proteómica en la búsqueda de biomarcadores de la OA	7
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	10
3. TRABAJO EXPERIMENTAL 1: Validación de biomarcadores proteicos de OA en el suero humano mediante MRM	11
3.1 Material y métodos	11
Muestras de sueros	11
Preparación de soluciones Stock de péptidos sintéticos	11
Acondicionamiento y digestión de las muestras de suero.....	11
Limpieza de sales en muestras digeridas con “stage stips”	12
Nano LC-QTRAP 5500 MRM (multiple reaction monitoring)	13
Análisis de los datos de MRM	14
Análisis estadístico	15
3.2 Resultados y discusión	15
4. TRABAJO EXPERIMENTAL 2: Validación mediante <i>western blot</i> de posibles biomarcadores proteicos de OA obtenidos según ensayos de iTRAQ.....	22
4.1 Material y métodos	22
Toma de muestras de pacientes y cultivo de los explantes.....	22
Digestión de proteínas y ensayos de iTRAQ.....	22
Comatografía líquida (LC).....	23
Análisis MS/MS.....	24
Análisis de los datos de MS.....	24
Western blot.....	24

4.2 Resultados y discusión	26
Proteína de la capa intermedia del cartílago 1 (CILP-1)	27
Proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP)	30
Activador de la proteinasa C de procolágeno (PCEP-1)	31
Condroadherina (CHAD)	33
YKL-39 (<i>chitinase 3 like protein 2</i>)	35
5. CONCLUSIONES	38
6. BIBLIOGRAFÍA	39

RESUMEN

La artrosis es una enfermedad que afecta a gran cantidad de personas, sobre todo a individuos de edad avanzada. Esta dolencia tiene un impacto económico importante, tanto a nivel de gasto sanitario como en términos de discapacidad laboral. Las causas de la enfermedad radican en la degradación de los componentes de la matriz extracelular del cartílago y la activación de rutas relacionadas de inflamación.

En los últimos años, en el ámbito clínico se están buscando biomarcadores de artrosis para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Existen diversas metodologías, siendo las técnicas proteómicas las más ventajosas, ya que permiten el estudio de las proteínas, sus interacciones y sus modificaciones postraduccionales.

El objetivo de este trabajo fue intentar validar los resultados de experimentos previos que mostraban que una serie de proteínas parecían estar moduladas diferencialmente durante la artrosis. Para ello se emplearon técnicas de espectrometría de masas (MRM, *multiple reaction monitoring*) y técnicas de *western blot*.

En la búsqueda de biomarcadores en el suero humano, la proteína amiloide P del suero (SAP) y la vasorina (VSN) aparecieron moduladas diferencialmente de forma significativa en las muestras de pacientes con artrosis con respecto a individuos sanos. Mediante los ensayos de *western blot* se observó que la proteína de la capa intermedia del cartílago 1 (CILP-1) se encuentra aumentada en la zona no dañada del cartílago artrósico de cadera. Por otro lado, en los estudios realizados con líquido sinovial procedente de la articulación de la rodilla, la proteína YKL-39 parece aumentar en las muestras de pacientes con artrosis respecto a controles sanos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La artrosis y sus mecanismos moleculares

La artrosis (OA) es una enfermedad articular degenerativa que se manifiesta preferentemente en individuos de edad avanzada. Se caracteriza por la degradación de la matriz extracelular iniciada por micro-lesiones que activan respuestas de reparación, incluyendo rutas pro-inflamatorias del sistema inmunitario innato (Kraus *et al.*, 2015). Esta dolencia es una de las causas principales de problemas físicos, que conllevan a una reducción en la calidad de vida del individuo. La OA suele desarrollarse a partir de los 45 años, incrementando su frecuencia con la edad y afectando aproximadamente al 10% de la población. Además, existen diversos factores que pueden estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad, como la obesidad o la debilidad muscular. En el primer caso se ha observado que diversos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados a la enfermedad también están relacionados con el gen de la obesidad (FTO). Además, diversos investigadores han relacionado la hipertensión, la diabetes y el sobrepeso con un mayor riesgo de desarrollo de OA (Yoshimura *et al.*, 2012). La debilidad muscular, por otro lado, está asociada con el dolor y la disfuncionalidad de las articulaciones para soportar la carga a la que están sometidas, y es otro de los posibles mecanismos implicados en el desarrollo de la OA que se ha estudiado en los últimos años (Sattler *et al.*, 2012).

La OA provoca un impacto económico importante, ya que es la causa principal de bajas laborales, y se estima que los costes en sanidad se van a doblar en las próximas décadas. En EEUU se gastan 60 billones de dólares al año debido a esta enfermedad, y se calcula que un 25% de la población estadounidense la padecerá en el año 2030 (Issa y Sharma, 2006). En España, la incidencia de la OA en la población es del 4% en el caso de la cadera y 10% en la de rodilla, estimándose los costes de la enfermedad en 4.7 billones de euros por año (Loza *et al.* 2007).

Los principales factores que participan en la patogénesis de la OA provocan la degradación del cartílago articular. En condiciones normales, los condrocitos (el único tipo celular presente en el cartílago maduro) mantienen un equilibrio dinámico entre la degradación y la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (ECM), como el colágeno tipo II y el agregano, que son las proteínas más comunes en el tejido. Durante el avance de la OA, la disrupción de este equilibrio provoca la pérdida progresiva de la ECM, la inducción de estrés oxidativo de las células, y de forma menos común, la apoptosis celular (Bauer *et al.*, 2006).

La alteración del metabolismo de los condrocitos se debe a la producción de citoquinas inflamatorias y enzimas degradadoras de la matriz, que conllevan a la destrucción de la ECM y al daño del cartílago. El estrés oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) distorsiona la homeostasis de los condrocitos y promueve el catabolismo mediante la inducción de la muerte celular, la degradación de los componentes de la matriz, la activación de enzimas degradadoras latentes, la inhibición de la síntesis de matriz y la oxidación de moléculas tanto intracelulares como extracelulares (Goldring *et al.*, 2004). En el ámbito clínico, la degradación de la matriz provoca una discapacidad gradual del cartílago articular, acompañada a menudo de dolor. Además los cambios en el cartílago provocan una remodelación en el hueso subcondral, normalmente en forma de esclerosis y formación de osteofitos.

Se conocen diversos mediadores tanto catabólicos como anabólicos que juegan papeles fundamentales en la homeostasis del cartílago y en el desarrollo de la OA (Figura 1). La activación de procesos catabólicos y la inhibición de los anabólicos provocan la pérdida de equilibrio en la matriz y la degradación del cartílago articular.

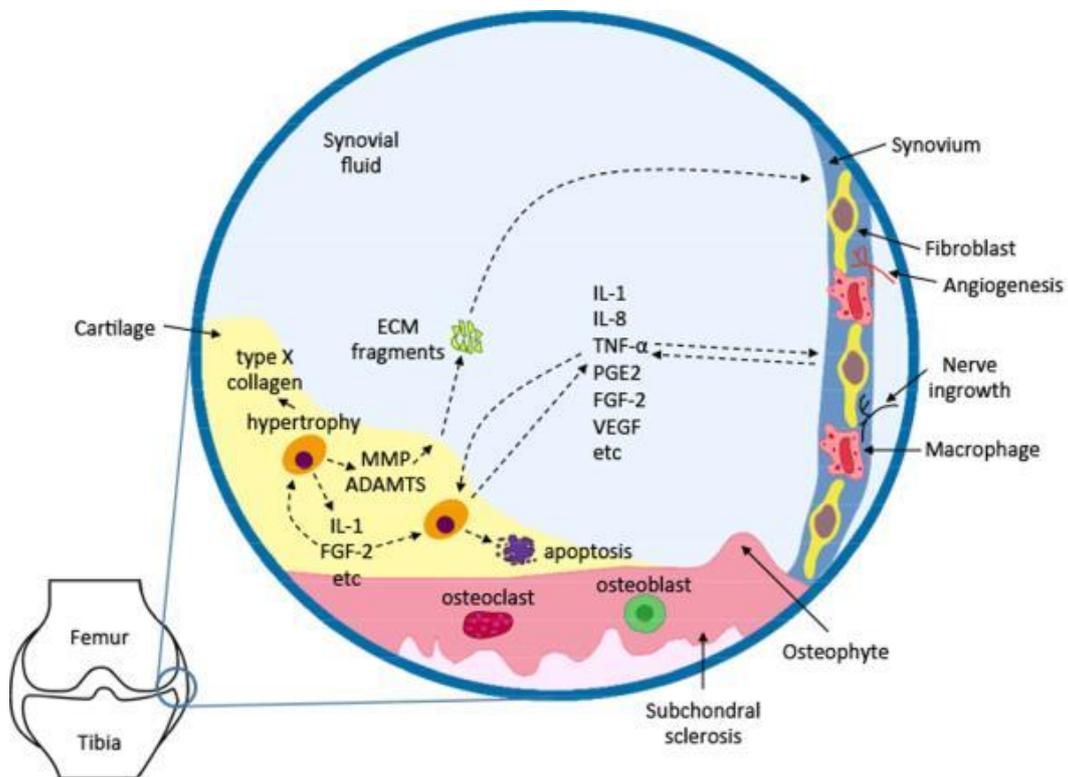


Figura 1: Interacciones moleculares en la articulación sinovial durante la OA (tomada de Lee *et al.* 2013).

Uno de los mediadores de la patogénesis de la OA mejor caracterizados es la interleucina-1 (IL-1). Esta citoquina reprime la expresión de diversos componentes de la ECM y promueve su degradación mediante la inducción de diferentes enzimas proteolíticas como colagenasas (MMP-1, MMP-13) y agreganasas (ADAMTS-4), tanto en los condrocitos del cartílago como en los fibroblastos sinoviales. La IL-1 β también induce la síntesis de otras citoquinas como IL-6 e IL-8, que tienen un efecto sinérgico en la cascada catabólica. Además, la IL-1 β activa directamente receptores del dolor mediante la activación de quinasas, e indirectamente a través de la producción de prostanooides (Sommer, 2003).

Por su parte, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) también tiene un potente efecto en la patofisiología de la OA, y además activa neuronas sensoriales directamente mediante los receptores TNFR1 y TNFR2, iniciando una cascada de reacciones inflamatorias a través de la producción de IL-1, IL-6 e ILK-8. Durante los estadios proinflamatorios en el cartílago articular las enzimas ciclooxigenasas (COX) producen numerosos prostanooides, como PGE2, PGD2, PGF2A, tromboxanos y PGI2 (Read, 2007). La activación de enzimas como COX-1 o COX-2 incrementa la producción de MMP-3, inhibe la síntesis de proteoglicanos (PG) y estimula la apoptosis de los condrocitos.

De los mediadores antes citados, el PGE2 está considerado como el mayor responsable del dolor inflamatorio durante la OA. El PGE2 utiliza los receptores EP2 y EP4 para inducir su efecto catabólico, además de mediar las rutas de señalización del dolor estimulando la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la producción del factor IL-6 (Brenn *et al.*, 2007). La activación de los receptores EP provoca gran variedad de efectos, desde aumento de calcio intracelular a la síntesis de AMPc. Este segundo mensajero provoca la sensibilización de los receptores del dolor debido a la fosforilación de los canales de sodio en los nervios periféricos (England *et al.* 1996).

Por último, cabe destacar que los últimos estudios han mostrado que el factor de crecimiento de fibroblastos FGF-2 actúa como mediador molecular de la OA en el cartílago. Este factor es liberado en grandes cantidades durante la carga o el daño de la matriz del cartílago articular, activando múltiples cascadas de transducción de señales. (MAPK, ERK, p38, etc). Estas quinasas fosforilan diferentes factores de transcripción, lo que produce un cambio en la regulación génica, provocando una mayor expresión de enzimas degradadoras (MMP-13) e inhibiendo la síntesis de PG de la matriz extracelular (Li *et al.*, 2012). Esto último supone que actúan de forma antagónica a factores de crecimiento como IGF-1 (factor de crecimiento de insulina), jugando por tanto un papel anti-anabólico.

1.2 La proteómica

La proteómica se centra en el estudio del conjunto de proteínas expresadas por un genoma, célula o tejido. Gracias a esta rama de la biología podemos estudiar a gran escala la estructura de las proteínas, sus funciones y sus interacciones. Al contrario que el genoma, el proteoma es muy dinámico, pudiendo variar según cambios ambientales, condiciones de estrés, patologías, administración de fármacos, etc. Estos factores incrementan la complejidad del proteoma, debido a la activación o inhibición de la expresión génica, alteraciones en la interacción entre proteínas o cambios en las modificaciones postraduccionales (PTMs), pudiendo influir todos ellos en la función de las proteínas (Ruiz-Romero y Blanco, 2010).

Cualquier ensayo proteómico comienza con el aislamiento de las proteínas a partir de la muestra de estudio y su posterior separación, que es un paso crítico. Los primeros métodos que se llevaban a cabo en proteómica se basan en geles de electroforesis bidimensional (2-DE), en los que las proteínas se separan según su punto isoeléctrico (en tiras de gradiente de pH inmovilizado, o IPG) y después según su peso molecular (en geles SDS-PAGE). A continuación los geles son teñidos para visualizar las proteínas y se toman imágenes digitales para su análisis informático. Por último, las proteínas de interés son tomadas del gel para llevar a cabo su identificación por espectrometría de masas (MS). La 2-DE tiene la ventaja principal de que se realiza con proteínas intactas y permite detectar las PTMs de las proteínas, pero es poco automatizable, tiene poca capacidad para el análisis de múltiples muestras y su rango dinámico depende de la tinción (que a su vez puede interferir en el análisis de MS).

Por otro lado, los métodos de separación mediante cromatografía líquida (LC) están adquiriendo gran importancia actualmente, ya que permiten que el proceso sea fácilmente automatizable, pudiendo analizar más cantidad de muestras e incrementando la posibilidad de detectar proteínas poco abundantes. Normalmente estos métodos de separación requieren la digestión de las proteínas antes del análisis, fragmentándose éstas en péptidos.

Tras la separación de las proteínas por LC, generalmente se usan técnicas de MS para identificar los péptidos. La identificación mediante MS se realiza gracias a la ionización de los péptidos, la separación de los iones correspondientes y su detección mediante diversos sistemas. La ionización de los péptidos puede tener lugar en estado sólido mediante desorción por láser asistida por matriz (MALDI), o en solución gracias a un sistema de tipo electrospray (ESI) (Figura 2). Este último sistema se basa en que la muestra en la fase móvil forme un spray, debido a la diferencia de presión que experimenta al salir de un capilar y encontrarse a presión atmosférica. A continuación se aplica un alto voltaje que provoca la ionización de los péptidos

en las gotas formadas de la fase móvil, y debido al fenómeno de explosión de Coulomb se produce la individualización y separación de los iones en gotas más pequeñas. La aplicación de gas a presión (como nitrógeno) favorece que se evapore la fase móvil y que los iones penetren en el sistema de espectrometría de masas.

Los iones producidos a partir de la muestra son a continuación separados de forma acorde a su relación masa carga (m/z), normalmente mediante un analizador de tiempo de vuelo (TOF), un cuadrupolo o una trampa iónica (Ruiz-Romero y Blanco, 2010). En este trabajo utilizamos el sistema de triple cuadrupolo, que son varillas metálicas en las que se aplica un campo eléctrico y permiten dirigir los iones resonantes hacia el detector (Figura 2). Las masas de los iones se miden en el detector para proporcionar un espectro de masas que refleja la abundancia de cada péptido y su valor de m/z , que es usado para la identificación de las proteínas.

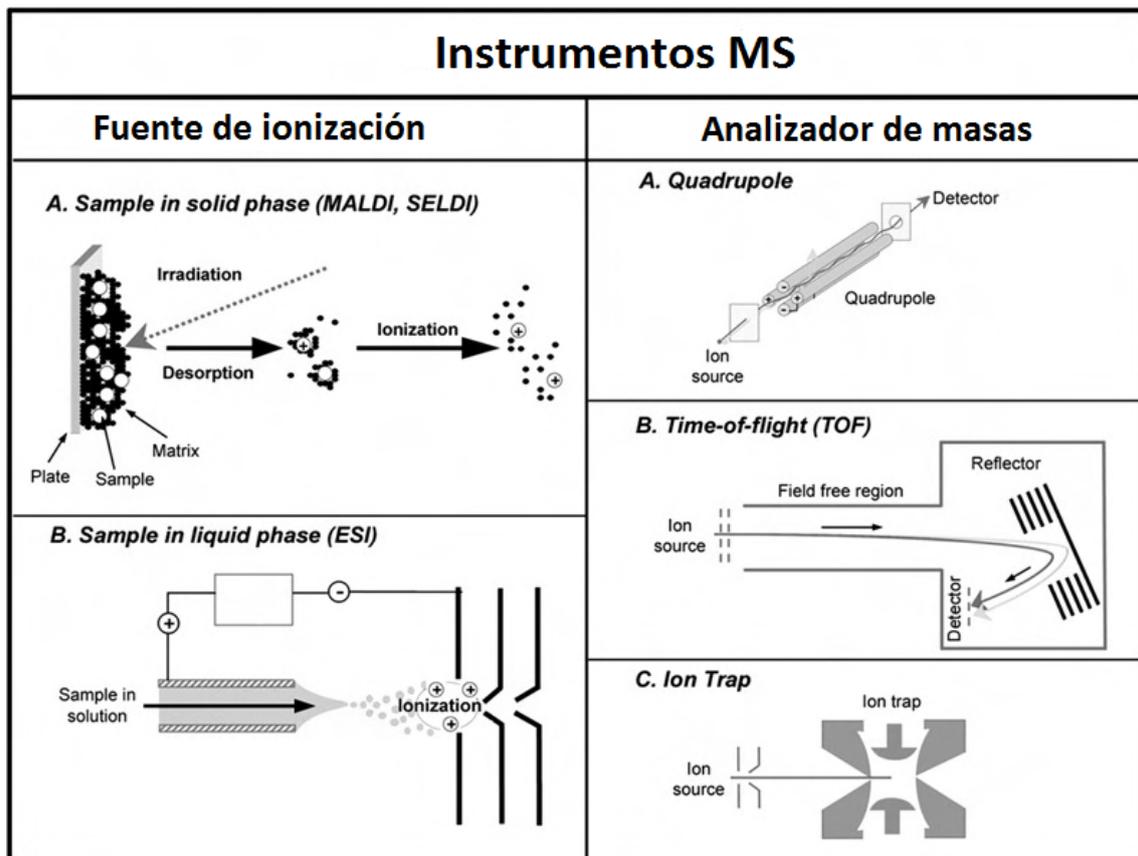


Figura 2: procedimientos para el análisis mediante espectrometría de masas (MS) en proteómica.

Los estudios de proteómica también persiguen la cuantificación de las proteínas, buscando mejorar la precisión a la hora de comparar el perfil peptídico de muestras diferentes.

Existen técnicas de cuantificación basadas en electroforesis bidimensional, como la electroforesis diferencial en gel (DIGE), en las que las muestras son etiquetadas con diferentes fluoróforos y se corren en el mismo gel con una mezcla de ambas como estándar interno. Sin embargo, esta técnica es poco automatizable y presenta desventajas para detectar proteínas poco abundantes, por lo que en la actualidad se emplean más las técnicas de cuantificación mediante LC-MS.

Para la cuantificación precisa mediante LC-MS es conveniente marcar las muestras diferencialmente antes de analizarlas, con el fin de disminuir la variabilidad experimental y aumentar la robustez de la cuantificación. Existen diversos métodos de marcaje *in vitro*, como el isotope coded affinity tag (ICAT) o los marcajes isobáricos para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ). Además, otros procesos permiten el marcaje *in vivo* mediante el cultivo de células en un medio con un aminoácido “pesado” (N15 o C13), para después compararlas con células cultivadas en un medio con un aminoácido normal o “ligero” (método SILAC). Sea cual sea el método de marcaje, la cuantificación se lleva a cabo mediante la comparación de las intensidades de los picos obtenidos en el análisis por MS de los péptidos “pesados” y los “ligeros”, proporcionando la diferencia en la abundancia entre las muestras.

Las técnicas anteriores permiten solamente una cuantificación relativa. En el caso de que se quiera conocer la cantidad de proteínas de forma absoluta, se necesitan métodos en los cuales se introduce un péptido característico de una proteína específica, proporcionando un estándar externo de concentración conocida para poder medir la concentración en la muestra de interés. Un ejemplo de este método es la técnica AQUA, en el que se sintetizan péptidos que incorporan isótopos estables para proporcionar una masa de referencia que se usa como estándar interno (Gerber *et al.*, 2003).

1.3 La proteómica en la búsqueda de biomarcadores de la OA

El uso de la proteómica como herramienta para identificar y validar perfiles proteicos ha producido una gran expectación, debida principalmente al gran potencial que presenta como método para descubrir posibles biomarcadores de diagnóstico de diversas enfermedades. Existen dos enfoques generales en la búsqueda de biomarcadores; la proteómica dirigida (*targeted proteomics*) o la global/no específica (*shotgun proteomics*). En el primer caso se usan frecuentemente anticuerpos para identificar proteínas específicas por *western blot*, ELISA o *arrays*, y son muy útiles para estudios clínicos y de validación.

Sin embargo, la proteómica no dirigida tiene un mayor potencial para el descubrimiento de biomarcadores, ya que no se discrimina ninguna proteína presente en la muestra, analizando todo su conjunto. Para obtener el perfil de proteínas sin identificar pueden usarse técnicas de ESI-Q-TOF, ESI-Orbitrap MALDI-TOF-MS. Tras un primer análisis se suele realizar la fragmentación de los picos obtenidos proporcionando unos perfiles peptídicos (MS/MS) que pueden ser empleados para compararlos con bases de datos específicas e identificar las proteínas.

Se espera que la sangre (el plasma y/o el suero) y otros fluidos corporales sean unos recursos excelentes como fuente de biomarcadores proteicos, ya que están en contacto con la mayor parte de los tejidos, llevando proteínas secretadas por éstos (Zhang *et al.*, 2007). Una de las mayores ventajas de usar plasma o suero es que son fácilmente obtenibles y que se encuentran en amplias cohortes almacenadas en biobancos. Sin embargo, su desventaja es que las proteínas específicas de los tejidos se pueden encontrar muy diluidas en este tipo de muestras, siendo entonces prácticamente indetectables. Por ello, existe un gran interés en el análisis de los fluidos corporales “proximales”, que contactan con sólo uno o unos pocos tejidos, por lo que las proteínas específicas estarían menos diluidas.

El plasma y el suero han demostrado ser el proteoma humano más complejo, con un rango dinámico extraordinario de concentraciones de proteínas. Se ha demostrado, además, que existen variaciones a nivel individual en la concentración y el tipo de modificaciones de algunas proteínas del plasma (Nedlekov *et al.*, 2005), creando requisitos específicos para analizar diferentes muestras de un amplio número de individuos para mayor precisión estadística. Los biomarcadores de enfermedad normalmente aparecen en bajas concentraciones en el plasma, lo que los hace difícil de detectar debido a la presencia de otras proteínas más abundantes. Algo muy común es usar resinas que contienen anticuerpos específicos con afinidad por las 20 proteínas más abundantes del plasma sanguíneo, eliminando de esta forma las proteínas probablemente no informativas e incrementando la sensibilidad para identificar proteínas en menor concentración. Las desventajas principales son que este paso incluye problemas de reproducibilidad cuando se analiza un gran número de muestras, y que algunas proteínas de interés pueden ser deplecionadas de forma no específica por interacciones con otras proteínas (como la albúmina).

Por otro lado, recurrir al líquido sinovial de la articulación proporciona una gran ventaja en la búsqueda de biomarcadores de OA, ya que funciona como lugar de intercambio de proteínas entre el cartílago y el sistema circulatorio. Muchas estrategias proteómicas se basan en identificar biomarcadores en el líquido sinovial y validarlas posteriormente en el

suero (Ruiz-Romero y Blanco, 2010). El problema principal de utilizar este recurso es que para obtener el líquido sinovial son necesarias técnicas invasivas, y las muestras deben ser centrifugadas para eliminar células contaminantes. Además, es recomendable un tratamiento digestivo con hialuronidasa para facilitar el análisis proteómico.

Por último, un recurso con mucho potencial para el descubrimiento de nuevos biomarcadores es el estudio del secretoma del cartílago. Este término se refiere a todo el conjunto de proteínas secretadas por una célula o tejido. Numerosos trabajos han identificado proteínas a partir de este tipo de muestras (ya sea secretomas de tejido o de células) con un posible rol en la OA (Lourido *et al.*, 2014).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los ensayos realizados en este trabajo se basan en estudios anteriores realizados por el grupo de proteómica del Inibic. En el trabajo realizado por Fernández-Puente y colaboradores se llevaron a cabo diversos ensayos basados en marcaje iTRAQ con sueros deplecionados de pacientes normales y artrósicos tanto de grado II como de grado IV, analizando 50 muestras de cada grupo. Tras realizar el análisis MS/MS en un MALDI-TOF-TOF se observó que existían proteínas que se encontraban en una concentración diferencial en los casos de artrosis con respecto a los controles sin patología articular. Entre las proteínas que aparecían aumentadas en las muestras de pacientes con OA respecto a los controles estaban, entre otras, la proteína oligomérica de matriz del cartílago (COMP), el componente del complemento 6 (C6), el C9 y el lumican. Otras proteínas en cambio aparecían disminuidas en las muestras de OA con respecto a los controles, como la apolipoproteína B (APOB) o el subcomponente C1S del complemento C1 (Fernández-Puente *et al.*, 2011).

Por su parte, en los trabajos de iTRAQ realizados por Lourido y colaboradores se identificaron 76 proteínas características del cartílago. En este caso se compararon secretomas de zonas normales y zonas dañadas de cartílago artrósico con secretomas de cartílago normal, obteniendo resultados diferenciales en la cantidad de diversas proteínas durante la OA. Entre las que se encuentran aumentadas en cartílagos con OA se encontraban la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), la proteína de la capa intermedia del cartílago (CILP) o la proteína YKL-40 (Lourido *et al.*, 2014).

En este trabajo de fin de Máster se han planteado los siguientes objetivos:

- I) Verificar si las proteínas observadas en el suero pueden ser biomarcadores de uso en diagnóstico clínico, comprobando si los patrones diferenciales observados en los ensayos anteriores (Fernández-Puente *et al.*, 2011) se pueden detectar con éxito en muestras de suero sin deplecionar.
- II) Validar los resultados obtenidos en los ensayos de iTRAQ para corroborar la diferencia en la abundancia de proteínas que puedan ser posibles biomarcadores diferenciales de OA en cadera y rodilla analizando muestras de secretomas de cartílago.

3. TRABAJO EXPERIMENTAL 1: Validación de biomarcadores proteicos de OA en el suero humano mediante MRM

3.1 MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de sueros

Las muestras de sueros fueron obtenidas de pacientes anónimos del complejo hospitalario universitario de A Coruña. Se dividieron en muestras de pacientes normales y con OA, incluyéndolos en este grupo según el colegio americano de reumatología (ACR). La OA que presentaban los pacientes fue clasificada según el sistema de Kellgren y Lawrence (K/L) en grado II o grado IV.

Preparación de soluciones stock de péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos se compraron en JPT (Frickenhausen, Alemania) separados individualmente en 27 pocillos, en los cuales hay aproximadamente 16 nmol de cada péptido. Son péptidos que están marcados isotópicamente con C13 en los aminoácidos lisina y arginina y se denominan péptidos “pesados” porque pesan más que los péptido endógenos o “ligeros” propios de la muestra. Cada péptido se disuelve en una solución 80% NH₄OH 0.1M y 20% acetonitrilo (ACN), hasta obtener una concentración de 160 pmol/μL de cada péptido. Se toman 10 μL de cada péptido y se mezclan en un eppendorf para constituir la solución *Stock*, en la que cada péptido estará en una concentración de 5.9 pmol/μL. A partir del *Stock* inicial preparamos un segundo *Stock* (*Stock 2*), tomando un volumen determinado y diluyéndolo en una solución de acetonitrilo (ACN) 2% y ácido fórmico (FA) 0,1% de forma que la concentración aproximada final sea de 100 fmol/μL.

Acondicionamiento y digestión de las muestras de suero

Primeramente se descongelan las muestras almacenadas a -80 °C en hielo. Tras la descongelación, se agitaron las muestras y se sometieron a una sonicación, de forma que quede homogenizada. Tras ello, las muestras se centrifugaron para posibilitar que se pueda medir de forma más efectiva la concentración de proteínas en el Nanodrop. Una vez conocida la concentración de cada muestra, se calculó el volumen de Urea/tiourea que hay que añadir para conseguir una cantidad final de proteína de 100 μg. Añadimos Urea 6M/Thiourea 2M

hasta un volumen de 20 μL para tener una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína en el suero.

A continuación, en un eppendorf de baja afinidad por proteínas (Protein LoBind) se añadieron 2 μL de muestra diluida (10 μg de proteínas), 3 μL de Bicarbonato amónico (BA) 25 mM y 1 μL de ditioneitol (DTT) 50 mM. La concentración final en el momento de la reducción con DTT es de 10 mM. Tras ello se incubaron en una estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante una hora, y transcurrido ese tiempo se añadieron 2.5 μL de iodoacetamida (IA) 100 mM, de forma que en la disolución final la concentración es de 50 mM.

La disolución obtenida se incubó durante 45 minutos en oscuridad, y finalmente se añadió BA 25 mM hasta conseguir un volumen final de 25 μL , de forma que la concentración final de Urea 6 M esté por debajo de 1 M. Mediante un papel indicador de pH se comprobó que la disolución sea básica (en torno a 8) ya que es fundamental para la actividad óptima de la enzima.

A continuación se preparó una solución empleando la tripsina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y H₂O de LC-MS, en relación 1:3. De esa solución se añadieron 2 μL a cada muestra anteriormente preparada, obteniendo así en cada eppendorf una relación enzima-sustrato de 1:20. Tras ello se realizó una centrifugación y se incubaron las muestras toda la noche a 37 $^{\circ}\text{C}$; transcurrido este tiempo se detuvo la reacción enzimática acidificando la muestra mediante la adición de 1 μL de ácido trifluoroacético (TFA).

Finalmente se añadieron 2 μL de péptidos sintéticos de la disolución Stock 2 de aproximadamente 100 fmol/ μL de las proteínas a estudiar, previamente preparada. Se agitaron las muestras durante 5-10 minutos y tras ello se sonicaron unos 3-5 minutos. Después se realizó una centrifugación y las muestras fueron sometidas a la limpieza de sales con "stage stips".

Limpieza de sales en las muestras digeridas

Para limpiar las sales se utilizaron filtros Empore disk-C18 47 MM introducidos en el interior de puntas de pipeta de 100 μL . Se pasaron los reactivos a través de los filtros gracias a una centrifugación durante 4 minutos a una velocidad de 3rpm.

Primeramente se activaron los filtros, mediante lavados de 50 μL con reactivos en el siguiente orden: 2 lavados con Metanol, 2 lavados con una disolución de ACN 80% + TFA 0.5% y 3 lavados con TFA 0.5 %. Una vez activados se pasa la muestra (35 μL), y tras la primera

centrifugación se recogió la muestra filtrada y se filtró de nuevo. Una vez realizado, se desecharon las muestras.

A continuación se lavaron los filtros mediante 1 lavado con TFA 0.5 % y 2 lavados con FA 0.5 %. Finalmente se realizaron 2 eluciones con una disolución de ACN 80% + FA 0.5% usando un volumen 35 μ L en cada una (el mismo que la muestra filtrada). Las eluciones de cada muestra se recogieron en un tubo eppendorf protein LoBind y se secaron en una Speed Vac (Thermo Scientific). Posteriormente las muestras fueron resuspendidas en 10 μ L en 2% ACN, 0,1% FA y se analizaron mediante el sistema de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas tipo 5500-QTrap (AbSciex).

Nano LC-QTRAP 5500 MRM (multiple reaction monitoring)

El sistema empleado para este análisis consta de un sistema de cromatografía líquida, nano-LC (Tempo, AbSciex) en el que se produce la separación de los péptidos mediante cromatografía en fase reversa con elución en gradiente. La mezcla de péptidos es inyectada en una precolumna (C18, 5 μ m, 300A, 100 μ m*2cm, Acclaim PepMap, Thermo Scientific, USA) a un flujo de 3 μ L/min durante 10 minutos para su concentración y desalado. De la precolumna son eluidos a la nanocolumna de fase reversa C18 (75 μ m id, 15 cm, 3 μ m) (Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific, USA) a un flujo de 300 nL/min y utilizando una gradiente especificado en la Tabla 1. Este paso permite la separación de los péptidos según sus polaridades, eluyendo a un tiempo determinado desde el momento en el que se inyectó la muestra (tiempo de retención: RT). A medida que se van separando los péptidos en el sistema nano-LC serán detectados con un espectrómetro de masas según su relación masa/carga (m/z).

El método de ionización de la 5500 Qtrap es de tipo ESI, Se aplicó un voltaje de 2600 V. El modo de trabajo empleado fue el MRM (*multiple reaction monitoring*), mediante el que se seleccionan los parámetros para analizar sólo los péptidos de proteínas concretas. El cuadrupolo Q0 permite la entrada de los iones (*entrance potential* = 10), mientras que el Q1 permite seleccionar los péptidos de una m/z determinada que queremos cuantificar (iones precursores), eliminando o neutralizando el resto (iones no resonantes). La relación m/z de los péptidos que se seleccionan es ya conocida por análisis de espectrometría de masas de trabajos anteriores (Fernández-Puente et al. 2011). En el Q2 los péptidos seleccionados se disocian gracias a la energía recibida (*collision energy*, CE) por el choque con un gas (en este caso Nitrógeno) y los fragmentos iónicos producidos entran a la Q3 para ser detectados. Sólo aquellos iones que tengan una relación m/z determinada serán atrapados por Q3 y podrán

llegar al detector. En este caso también se seleccionan los productos de una m/z determinada, obteniendo pares de iones precursores con sus fragmentos producidos correspondientes, lo que constituyen las denominadas transiciones (Q1/Q3). De esta forma se pueden comparar la intensidad los picos de los péptidos pesados (sintéticos) y de los péptidos ligeros (los que están presentes en la propia muestra). La intensidad del péptido pesado nos sirve como un estándar de referencia para normalizar los datos obtenidos de intensidad de cada pico, empleando para ello la proporción entre las intensidades de los picos del péptido pesado y del ligero. Además, el péptido pesado nos permite identificar el pico que corresponde a cada péptido de interés ya que los dos péptidos deben coeluir cromatográficamente, coincidiendo los picos de intensidades a un mismo tiempo de retención (RT). El *declustering potential* del sistema se fijó en 92 V y el *collision cell exit potential* (CXP) en 15 V.

Tabla 1: Parámetros del gradiente cromatográfico utilizado.

Tiempo (min)	% A (ACN 2% y TFA 0.1%)	% B (ACN 95% TFA 0.1%)
0	95	5
3	95	5
45	65	35
46	5	95
56	5	95
57	95	5
70	95	5

Análisis de los datos de MRM

Una vez que se analizaron las muestras en el espectrómetro, los datos obtenidos se procesaron mediante el programa Skyline 3.1 de Mac Coss Lab. El método de análisis del programa toma como base de datos el Human Peptide Atlas, y se estableció un mínimo de 2 péptidos para identificar a una proteína, descartando los péptidos con cisteína en sus extremos y sólo teniendo en cuenta péptidos entre 7 y 25 aminoácidos. El programa permite realizar el análisis de los picos de intensidades obtenidos de cada péptido integrando el área de cada campana de Gauss correspondiente gracias a su altura y anchura. El área obtenida

para cada péptido ligero es normalizada comparándola con el área de los picos pesados correspondientes, para así evitar problemas de diferencias de cantidad de proteínas en las muestras. Estos datos normalizados fueron utilizados para comparar las muestras de pacientes que padecen OA con las muestras control de pacientes normales para conocer en que proporción se diferencian entre ellas. El número total de muestras analizadas fue de 17 muestras control (C), 20 muestras de OA de grado II (GII) y 20 de OA de grado IV (GIV).

Análisis estadístico

Para analizar los datos se usó el programa informático Prism 6.05. Para estudiar la normalidad de los datos se empleó el test de Kolmogorov-Smirnoff, comprobando que no seguían una distribución normal. Se utilizó el test de Kruskal-Wallis para analizar las medias de los tres tipos de muestras comprobando que no son iguales. Finalmente se empleó el test de Mann-Whitney para estudiar en cada péptido las diferencias entre muestras de pacientes con OA de GII y GIV con los controles, así como las diferencias entre las muestras de GIV con las de GII.

3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4, en donde se ilustran las proporciones de las intensidades entre las variantes ligera/pesada de los mejores péptidos escogidos para cada proteína. Según los parámetros utilizados, se asume que 2 péptidos son suficientes para confirmar la presencia de una determinada proteína. Los análisis de tipo MRM realizados confirman que las proteínas que aparecen en la tabla 2 sí están presentes en las muestras de suero, pero sólo la proteína amiloide-P del suero (SAP) y la vasorina (VSN) mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para su uso como potenciales biomarcadores de la OA (Figura 4).

En la OA se producen procesos inflamatorios diversos iniciados por diferentes citoquinas, que van a provocar la inhibición de la producción de matriz extracelular y el aumento de la actividad de enzimas degradadoras. El sistema del complemento interviene en el mecanismo de inmunidad innata de defensa a patógenos y en la protección frente al daño en los tejidos, involucrando a más de 30 proteínas, inhibidores y receptores celulares (Morgan 2000). La activación de la cascada puede producirse por la ruta clásica, la alternativa o mediada por lectina e inicia la fagocitosis de patógenos, incrementa la permeabilidad vascular,

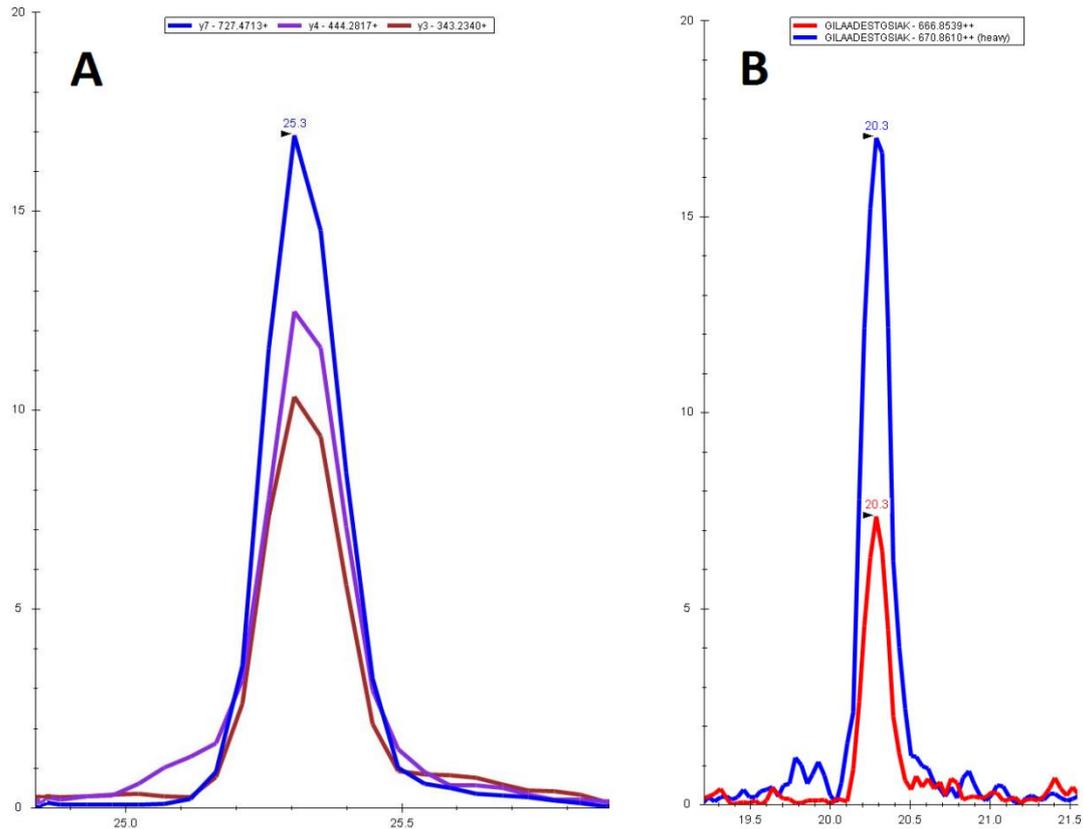


Figura 3: Gráficas representativas de: A) transiciones MRM de un péptido B) picos que muestran cómo coeluyen las variantes pesada (azul) y ligera (rojo) de un péptido. El eje y representa la intensidad de la señal MS mientras que el eje x representa el tiempo de retención (RT).

activa las células-B y finalmente provoca la lisis celular por formación de poros en la membrana. La ruta clásica comienza con la unión de anticuerpos al componente C1q del complemento C1. Las citoquinas como IL-1 β o TNF- α en los procesos inflamatorios de la OA van a favorecer la síntesis de la proteína C1s, que forma parte de este primer componente del sistema y es necesario para la activación de la ruta clásica. Por tanto esta síntesis está correlacionada con alteraciones hipertróficas de los condrocitos, ya que normalmente sólo se produce en el centro de osificación secundario (Sakiyama *et al.*, 1997). Según esto, el C1s se encuentra de forma diferencial en el cartílago durante la OA, aunque en el caso de suero no parece existir ninguna diferencia significativa según nuestros resultados (Tabla 2), por lo que no parece ser un buen candidato como biomarcador en este tipo de muestras.

Por su parte, la ruta alternativa de complementos es activada por el factor B y la proteína C3b, aunque puede ser activada continuamente como un método de defensa constitutiva. En condiciones normales, los inhibidores de los complementos (como el factor H,

CRPs, etc) y proteínas reguladoras de la superficie celular controlan este proceso, pero en el tejido dañado su balance puede estar distorsionado (Morgan *et al.*, 2005).

Las tres rutas anteriormente explicadas convergen en el complemento C3, que es activado debido a su corte por diferentes convertasas. Esto produce la formación de productos como el C3b, que actúa como una opsonina al unirse a la superficie de los patógenos; y el C3a, implicado en la quimiotaxis de las células del sistema inmune. El corte del complemento C5 por sus convertasas específicas forma el C5a (muy importante en la respuesta inflamatoria) y el producto C5b, que se une a las proteínas C6, C7, C8 y C9. Esto inicia la ruta final que provoca la formación del complejo de ataque de la membrana (MAC), el cual se ha mostrado como un factor importante en el daño del cartílago en la OA (Wang *et al.*, 2012). Se ha observado que durante la OA los fragmentos de la matriz extracelular (proteoglicanos, SRLPs) pueden activar la ruta alternativa o la clásica uniéndose a los complementos, mientras que otros proteoglicanos con motivos de lectina pueden activar la ruta correspondiente y provocar la in-

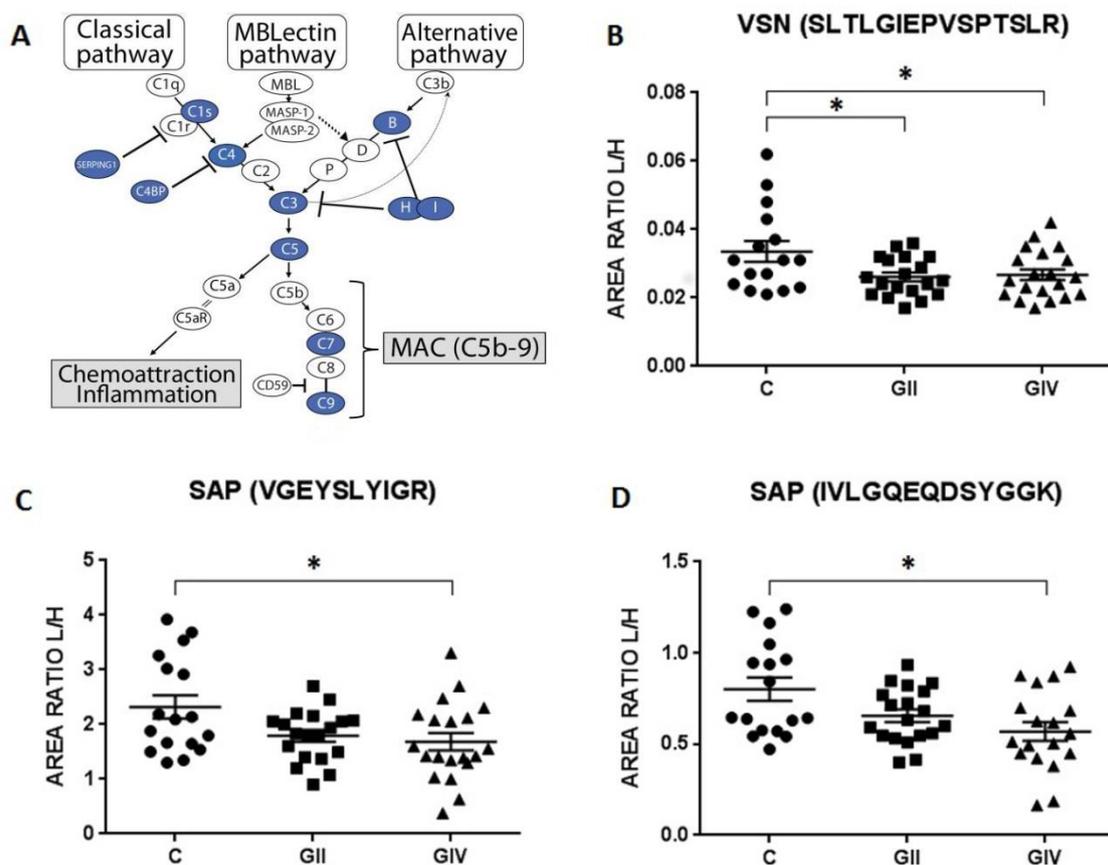


Figura 4: A) sistema de complementos característico en los procesos de la OA (adaptado de Lee *et al.* 2012); B,C, D) intensidades de las transiciones de cada péptido en las diferentes muestras control, OA grado II y OA grado IV (*p-valor < 0.05 en el test de Mann-Whitney, las barras muestran la media y su error estándar).

inflamación de la articulación (Day *et al.*, 2004). La deposición excesiva del MAC provoca la lisis celular y la necrosis de los condrocitos, mientras que concentraciones inferiores activan las rutas de síntesis de las moléculas proinflamatorias y de enzimas degradativas. En la patogénesis de la OA la mayor parte de condrocitos están intactos morfológicamente, y se ha corroborado que la MAC provoca en estas células un incremento de expresión de citoquinas (CCL2, CSF1, CCL5), enzimas degradativas (MMPS, ADAMTSs) y de ciclo-oxigenasas (Wang *et al.*, 2012). Se sabe que los complementos también entran en el cartílago a través del líquido sinovial provenientes de su síntesis por las células del epitelio sinovial, provocando una acción sinérgica junto a los complementos sintetizados por los condrocitos (John *et al.*, 2007).

El factor D del complemento (CFAD) también interviene en la activación de la ruta de los complementos. El corte de un enlace peptídico en la cadena alfa del tercer componente del complemento C3 es esencial para la ruta, en una reacción llevada a cabo por dos C3-convertasas. La formación de estas enzimas es catalizada por el CFAD (Volanakis *et al.*, 1996). El CFAD produce la hidrólisis del factor B unido al C3b, produciéndose la formación del C3bBb, que es la convertasa de la propia C3 en la ruta alternativa.

El último integrante del sistema de complementos cuya alteración hemos estudiado en el suero es el complemento 6 (C6). Es una proteína de 913 aminoácidos que contiene 2 dominios, un N-terminal (C6a) que está destinado a la interacción con C8 y C9, y un dominio C-terminal que presenta homología con el factor H y el factor I. Esta proteína también se ha analizado como un posible biomarcador, aunque según nuestros resultados no parece aumentar en el suero en el caso de los pacientes OA con respecto a los controles (Tabla 2). Los tests estadísticos realizados demuestran que los resultados obtenidos no son significativos.

Según todos los datos experimentales obtenidos (Tabla 2), el sistema de complementos no se ve aumentado en los pacientes con OA con respecto a los normales. Esto no parece concordar con los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Fernández-Puente *et al.*, 2011), si bien el número de muestras empleadas fue mucho menor en nuestro caso. Además, las muestras de suero no fueron sometidas a un tratamiento de depleción, con lo cual es mucho más difícil la cuantificación de los péptidos debido a posibles interferencias de proteínas presentes en mucha mayor cantidad. Según diversos estudios, se ha observado que la actividad de los complementos en la OA es mayor en las fases iniciales inflamatorias (Lotz, 2001). Los resultados obtenidos en nuestro caso podrían ser explicados debido a esta circunstancia, ya que los pacientes podrían presentar una OA en etapas avanzadas en la que la expresión de estas proteínas no es mucho mayor que en el tejido normal (Wang *et al.*, 2012).

Además de proteínas relacionadas con el complemento, también analizamos proteínas típicas de la ECM, como el lumican. Esta proteína pertenece al grupo de las SLRPs, caracterizadas por contener un número variable de repeticiones en tándem ricas en leucina (LRRs) que ocupan el dominio central de la proteína. Cada LRR tiene el motivo conservado LXXLXLXXNxL (L: Leucina, valina o aminoácidos hidrofóbicos; X: cualquier aminoácido). Esta región forma una estructura en solenoide flanqueada por 2 dominios ricos en cisteínas, la cual parece ser esencial para la capacidad de unión a ligando (Bengtsson *et al.*, 1995). El lumican presente en el cartílago suele contener cadenas de glucosaminoglicanos (GAGs), muy importantes para la unión a citoquinas, la hidratación y el ensamblaje de la matriz extracelular (Funderburgh *et al.*, 1991).

El lumican junto a otros SLRPs es esencial en la deposición de las fibrillas de colágeno. Las moléculas de procolágeno son sintetizadas a partir de 3 polipéptidos y modificadas en el retículo endoplasmático. Una vez que se secretan al exterior celular se eliminan los extremos N y C terminales, y las moléculas de colágeno son ensambladas en protofibrillas mediante la interacción con los colágenos de tipo V o XI sobre la superficie celular (Chen y Birk, 2013). En la deposición de las protofibrillas intervienen los SRLPs estabilizando a las moléculas de colágeno mediante interacciones directas. El lumican, que es un SRLP de clase II, se une a las fibrillas de colágeno en las bandas “a” y “c”, y colabora en la estabilización de las protofibrillas durante las etapas de desarrollo, siendo sustituido o perdiéndose a medida que el tejido evoluciona hacia la etapa adulta (Neame *et al.*, 2000).

Según diversos estudios, se ha observado que el lumican junto a otros SLRPs son degradados por proteólisis en tejidos con OA (Melrose *et al.*, 2008), provocando cambios estructurales en la matriz que a su vez conllevan a deficiencias en las propiedades mecánicas del tejido. Estos péptidos formados son liberados a los fluidos corporales (como el suero), con lo que tienen un enorme potencial como forma de diagnóstico de enfermedad (Flannery, 2006). Se ha visto además que algunos SRLPs pueden interactuar con la proteína C1q del complejo C1, llevando a la activación de la ruta y guardando algún tipo de relación en el desarrollo de OA (Sjöberg *et al.*, 2009).

A la luz de nuestros resultados, se observa que el lumican disminuye en los pacientes con OA comparados con los pacientes control. Según trabajos anteriores, el lumican aparece aumentado en pacientes con OA respecto a los controles (Fernández-Puente *et al.*, 2011). Otros estudios realizados en ratones con OA inducida por ser deficientes en la síntesis de fibromodulina también mostraron una mayor cantidad de lumican en el cartílago con respecto a controles normales (Gill *et al.*, 2002) En nuestro caso, esta disminución no parece lógica ya

que como se ha explicado anteriormente, parece que en la OA la fragmentación del lumican puede producir un aumento de los péptidos en el suero. Los resultados no son significativos estadísticamente, y sería necesario aumentar el número de muestras analizadas para sacar conclusiones definitivas. Además, hay que tener en cuenta que el suero sin deplecionar es una muestra mucho más compleja, y la gran cantidad de proteínas diferentes en él puede afectar a la resolución de la técnica.

Tabla 2: cuantificaciones realizadas mediante MRM.

Proteína	Péptidos	C	GII	GIV	GII/C	Pval	GIV/C	Pval	GIV/GII	Pval
		\bar{X} L/H	\bar{X} L/H	\bar{X} L/H						
Lumican	SLEYLDLSFNQIAR	0,871	0,633	0,641	0,727	0,246	0,736	0,247	1,013	0,859
	ISNIPDEYFK	0,670	0,505	0,539	0,754	0,174	0,805	0,446	1,067	0,267
	FNALQYLR	0,231	0,175	0,183	0,755	0,108	0,791	0,170	1,048	0,632
Vasorina	NLHDLVDVSDNQLER	0,088	0,073	0,076	0,836	0,254	0,865	0,353	1,034	0,884
	SLTLGIEPVSPSTSLR	0,036	0,026	0,027	0,725	0,045*	0,741	0,047*	1,023	0,917
	YLGSSVQLR	0,035	0,024	0,021	0,698	0,614	0,593	0,454	0,849	0,829
CFAD	ATLGPAVRPLPWQR	0,406	0,409	0,302	1,008	0,358	0,745	0,522	0,739	0,474
	RPDSLQHVLLPVLDLDR	0,180	0,156	0,155	0,865	0,384	0,861	0,723	0,995	0,500
CO6	DLHLSDVFLK	0,403	0,349	0,344	0,864	0,466	0,853	0,502	0,987	0,776
	ALNHLPLEYNSALYSR	0,506	0,446	0,422	0,883	0,970	0,835	0,724	0,946	0,509
C1S	TNFDNDIALVR	1,281	1,015	0,979	0,793	0,343	0,764	0,217	0,964	0,723
SAP	VGEYSLYIGR	2,321	1,795	1,685	0,773	0,121	0,726	0,030*	0,939	0,564
	IVLGQEQDSYGGK	0,802	0,655	0,641	0,817	0,106	0,799	0,008*	0,978	0,219
CO9	TSNFNAAISLK	0,150	0,109	0,107	0,730	0,456	0,715	0,464	0,979	0,862
	TEHYEEQIEAFK	0,629	0,498	0,491	0,792	0,589	0,781	0,483	0,986	0,906
	LSPYINLVPVK	0,954	0,724	0,727	0,759	0,578	0,762	0,614	1,004	0,828

\bar{X} L/H: Media de las intensidades entre los péptidos ligero y pesado, además de las proporciones obtenidas al comparar las muestras de pacientes artrósicos de grado II y grado IV entre si (GIV/GII) y con las muestras control (GII/C y GIV/C). Los valores p que se muestran son los obtenidos según el test de Mann-Whitney (* p-valor significativo < 0.05).

Otro posible biomarcador que hemos analizado en el suero es la vasorina (VSN), una proteína que posee una región extracelular compuesta de 10 LRR en tándem, un dominio con homología a EGF y un dominio con homología a fibronectina tipo III. Se ha observado que esta proteína tiene capacidad de unión al TGF- β , un factor que funciona tanto estimulando la síntesis de metaloproteasas en los condrocitos como una citoquina antiinflamatoria (Ikeda *et*

al., 2004). Esta unión se produce mediante los mismos dominios en los que el TGF- β se une a diversos proteoglicanos como la decorina. Existen diversos estudios en los que se ha identificado a esta proteína como parte del proteoma existente en el líquido sinovial de pacientes con OA (Balakrishnan *et al.*, 2014), por lo que puede ser de gran interés como posible biomarcador de la enfermedad. Según nuestros resultados, la vasorina se encuentra disminuída en las muestras de suero de pacientes con OA con respecto a las muestras control (tabla 2), lo que parece concordar con la función inhibidora de la vasorina de la ruta de señalización de TGF- β (Balakrishnan *et al.*, 2014). La menor cantidad de vasorina en la OA puede derivar en una menor inhibición de TGF- β , por lo que los condrocitos se activan sintetizando proteasas. Esta reducción es significativa tanto en el GII como en el GIV, pero sólo en el péptido SLTLGIEPVSTSLR (tabla 2). Éste se encuentra más reducido con respecto a las muestras normales en OA de GIV que en OA de GII, pudiéndose observar que las diferencias entre las muestras de GII y las muestras de GIV no son significativas. Por todas estas características, podríamos definirlo como un potencial biomarcador de progresión de la OA.

Por último, nuestros resultados demuestran que la proteína P amiloide del suero (SAP) puede ser detectada en suero mediante MRM. La SAP es una glicoproteína del plasma compuesta por 10 subunidades unidas de forma no covalente, cada una con una masa de 23-25 kDa. Esta proteína tiene capacidad de unión con el heparán sulfato y el dermatán sulfato, siendo ésta dependiente de Ca^{2+} (Hamazaki, 1987). Según nuestros resultados, la proteína SAP sí aparece disminuída de forma significativa en OA de GIV con respecto al control, en los dos péptidos de la proteína de los que se han obtenido transiciones satisfactorias. Ambos péptidos han mostrado diferencias significativas con las muestras control en los sueros de pacientes con OA de GIV. Las muestras de OA de GII no poseen unas diferencias estadísticamente significativas con las muestras control, aunque sí parecen estar disminuídas según las proporciones obtenidas (Tabla 2).

En diversos trabajos se ha identificado a esta proteína como parte del proteoma del cartílago en pacientes con OA (De Ceuninck *et al.*, 2005). La SAP es un componente muy común del material amiloide depositado extracelularmente durante el desarrollo de amiloidosis, que parece ser característica de algunos casos de OA (Hawkins *et al.* 1993), por lo que el comportamiento esperado sería el aumento de la proteína a mayor grado de enfermedad, lo que no se corresponde con nuestros resultados. Sería necesario el análisis de más muestras debido a todas las dificultades de análisis del suero, pero parece que la SAP es una proteína con grandes posibilidades de poder confirmarse como biomarcador de OA.

4. TRABAJO EXPERIMENTAL 2: Validación de posibles biomarcadores proteicos de OA obtenidos según datos de iTRAQ mediante *western blot*

4.1 MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestras de pacientes y cultivo de los explantes

Se emplearon muestras de pacientes normales (N) y pacientes con OA diagnosticados según el criterio del Colegio Americano de Reumatología. Las muestras de cartílago articular fueron obtenidas de la cabeza femoral o de los cóndilos de diferentes donantes, proporcionadas por el banco de tejidos y el servicio de autopsia del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC).

Se tomaron explantes mediante la disección del cartílago de los tejidos N y OA. En las muestras OA se diferenciaron las zonas artrósicas (ZL) de las zonas adyacentes a la lesión que no estaban deterioradas (ZN). Las muestras de cartílago fueron cortadas en discos de 6 mm de diámetro usando un punch de biopsia estéril. Después de diversos lavados con tampón PBS, 5 se introdujeron 5 discos de cada donante en placas de 96 pocillos (1 disco en cada pocillo) con 200 μ L de suero DMEM con 100 unidades/mL de penicilina y 100 μ g de estreptomina. Las placas se incubaron a 37^o toda la noche.

Los medios de cada pocillo fueron recolectados tras 1 y 3 días, reemplazándose con medio nuevo. Al sexto día tanto el medio como el disco de cartílago fueron recuperados, añadiéndose al medio fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) y un cóctel de inhibidores de proteasas en proporción 1:1000. Posteriormente se mezclaron las muestras del mismo donante, zona y día en un solo tubo ependorff y fueron almacenadas a -80 $^{\circ}$ C. Para el análisis proteómico, se tomó 1 mL de muestra de cada condición (N, ZN y ZL) y se hizo una centrifugación usando filtros para centrífuga Amicon (10 kDa MWCO, Millipore, Billerica, MA, USA) las proteínas. Finalmente se limpiaron mediante precipitación con acetona y se almacenaron a -80 $^{\circ}$ C.

Digestión de proteínas y ensayos de iTRAQ

La digestión de las proteínas con tripsina y el marcaje de los péptidos con los reactivos de iTRAQ fueron realizados de forma acorde a las instrucciones del fabricante (ABSciex, Foster City, CA, USA). Se utilizó una muestra de cada condición (N, ZN y ZL) tanto de cadera como de rodilla. Las proteínas procedentes de cada condición fueron resuspendidas en 25 μ L de

solución tampón. A continuación las muestras fueron desnaturalizadas con SDS en bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 0.5 M (ABSciex, Foster City, CA, USA), tras lo que fueron reducidas con tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) durante 1 h a 60 °C y se bloquearon la formación de puentes disulfuro empleando metilmetanotiosulfonato 200 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras estos pasos las muestras fueron digeridas con tripsina (Gold Mass, Promega, Madison, WI, USA) a una concentración 1:20 tripsina/proteínas durante 14 horas a 37 °C. Cada solución de péptidos fue marcada con los reactivos de iTRAQ reconstituídos previamente en 70 µL de etanol, siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras fueron marcadas con los reactivos de la siguiente forma: N, 114; ZN, 115; ZL, 116. La reacción se paró añadiendo agua desionizada, y las diferentes muestras marcadas fueron combinadas de acuerdo a su origen (cadera o rodilla). Finalmente se realizó un desalado de esta mezcla usando una columna de fase reversa (Pierce C18 Spin Columns) antes de realizar un análisis mediante LC-MS.

Comatografía líquida (LC)

La mezcla de péptidos se separó por cromatografía líquida en fase reversa a pH 10. Los péptidos marcados secos fueron resuspendidos en 140 µL de tampón A (10 mM hidróxido de amonio, 5% acetonitrilo) y se inyectaron 130 µL en un sistema HP 1200 (Agilent). La separación se realizó en una columna de fase reversa C18 (Zorbax extend C18, 100 × 2.1 mm id, 3.5 µm, 300 Å; Agilent), con un flujo de 0.2 mL/min. El cromatograma se obtuvo usando un detector UV a 214 nm. Se recogieron 60 fracciones cada 90 s usando un colector Gilson FC203B (Gilson, Middleton, WI, USA), y muchas fueron agrupadas basándose en el pico de intensidad de la señal de UV. Cada fracción se secó en una centrifuga de vacío y almacenadas a -20°C hasta el siguiente paso de análisis. Para la separación en segunda dimensión, las fracciones fueron disueltas en TFA 0.1% y ACN 2%, y 5 µL de esta muestra se inyectaron en un nano-LC (0.5 × 2 mm, Michrom Bioresources, Auburn, CA, USA) a un flujo de 15 µL/min. Se realizó un proceso de desalado durante 10 min de los péptidos y se cargaron en una columna C18 (Integratit C18, Proteopep II, 75 µm id, 10.2 cm, 5 µm, 300 Å; New Objective) para realizar la separación usando una concentración creciente de ACN en tampón B. La fracciones de fase reversa fueron recolectadas y mezcladas con una matriz a una concentración de 3 mg/mL de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma-Aldrich) en 0.1% TFA en 70% ACN con un flujo de 1.2 µL/min, usando un Sun Collect MALDI Spotter/Micro Collector (SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Alemania). Las fracciones obtenidas cada 15 s fueron depositadas en una placa de ionización por láser asistida por matriz (MALDI) para el análisis mediante MS.

Análisis MS/MS

La adquisición de los datos se realizó en modo de ión positivo usando un analizador MALDI 4800 (ABSciex) equipado con un detector de tiempo de vuelo (TOF), siendo procesados mediante el programa 4000 Series Explorer 3.5.1 (ABSciex). Se obtuvieron los espectros de MS de m/z entre 800–4000 para cada fracción mediante 1500 disparos de láser realizados con calibración interna. Se usó como estándar interno ($m/z = 1046.50$) 3 fmol/spot de angiotensina diluída en la matriz, con una intensidad de láser en torno a 3800. Después de analizar las fracciones de la muestra de la placa LC-MALDI en modo reflector positivo, se realizó la fragmentación de los iones precursores seleccionados automáticamente con una CE de 1 kV con gas CID (aire). Para la adquisición del espectro MS/MS se seleccionaron como precursores los iones con las señales más intensas (12 o más) con una proporción señal/ruído (S/N) mayor de 80, excluyendo los picos de señal de la tripsina y de la matriz. Se realizaron 1800 disparos para el espectro MS/MS, y la intensidad del láser se fijó en 4700. Se realizó un segundo ensayo MS/MS excluyendo los iones precursores seleccionados en el ensayo anterior, y se seleccionaron aquellos con una $S/N > 30$, para identificar proteínas que no se vieron en el ensayo anterior.

Análisis de los datos de MS

Se llevó a cabo la identificación de las proteínas mediante el programa ProteinPilot 3.0 (ABSciex). Para ello se empleó el algoritmo de Paragon que viene predeterminado en el programa, especificando la tripsina como el agente de digestión y MMTS como modificación fija de cisteína. Se realizó la búsqueda de cada espectro MS/MS en la base de datos Uniprot/Swissprot para la especie *Homo sapiens*. Sólo se tuvieron en cuenta las proteínas identificadas con una confianza de 95% o un Prot Score de al menos 1.3. Mientras que este programa acepta todos los péptidos con un nivel de identificación $>1\%$, sólo se tuvieron en cuenta las proteínas con al menos un péptido con un nivel de confianza del 95%.

Western blot

Para realizar la cuantificación inicial de la cantidad de proteínas en las muestras, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm mediante el aparato NanoDrop 1000 spectrophotometer de Thermo Fisher Scientific Inc., empleando el programa NanoDrop 1000 3.7. Una vez medida la concentración, se procede a cargar las muestras en un gel de poliacrila-

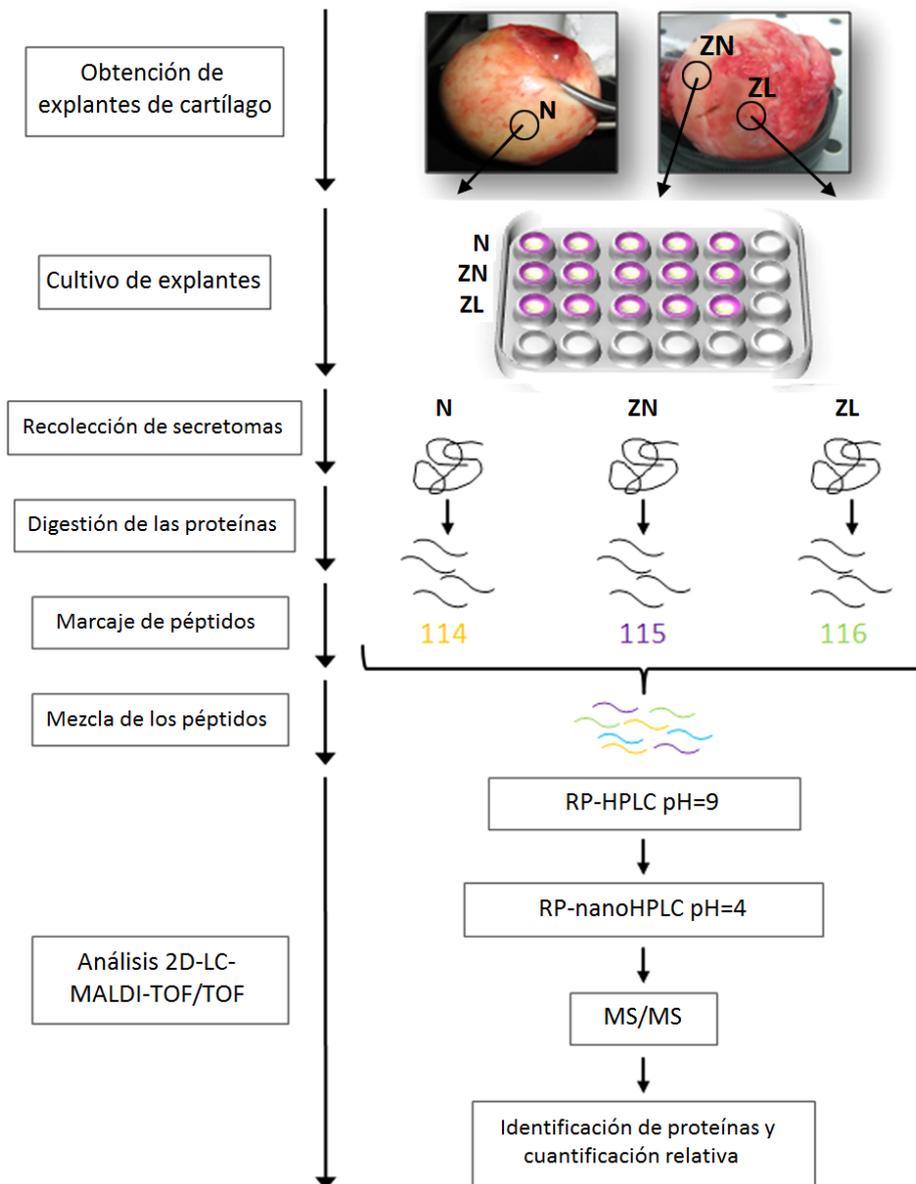


Figura 5: flujo de trabajo que se ha seguido para analizar el proteoma de los explantes de cartílago (adaptado de Lourido *et al.*, 2014).

mida al 10%. Se cargaron 2 μg de proteínas en cada pocillo en los gels destinados a la tinción con nitrato de plata, mientras que para los gels de *western blot* se cargaron 20 μg de proteínas en cada pocillo. La electroforesis se realizó a 80 V en el gel concentrador y a 120 V una vez que el frente llega al gel separador.

Para realizar los *western blot*, primero se cortaron las membranas de PVDF de BioRad con medidas de 8x6 cm. Inicialmente se activó la membrana con lavados de metanol, agua y metanol de 5 minutos cada uno. Tras ello se dejó la membrana durante 15 minutos a 4°C en

tampón de transferencia con 15% de metanol y 10% de tampón de transferencia 10x (12.1 g de trizma base 2mM y 14.6 g de NaI 120mM en 500 mL de agua destilada).

Una vez transcurridos los 15 minutos en frío, se hibridó la membrana durante 2 horas a un voltaje de 20 V. Tanto los papeles de transferencia como el gel fueron lavados en TTBS 1x (10% de TTBS 10x y 500 μ L de TWEEN 20) antes de realizar la hibridación. El TTBS 10x fue preparado anteriormente añadiendo 58 g de trizma base, 29 g de glicina y 3.7 g de SDS en 500 mL de agua destilada.

Tras la hibridación, se lavó la membrana durante una hora con una disolución preparada con 2.5 g de leche Sigma en 50 mL de tampón TTBS 1x. Transcurrido ese tiempo se preparó una solución con el anticuerpo primario en tampón TTBS 1x en una proporción específica para cada proteína (YKL-39 y CILP-1 1:500; CHAD y COMP 1:200; PCEP-1 1:1000). Se realizó la incubación de la membrana con la solución durante toda la noche en una cámara frigorífica a 4 °C.

Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón TTBS 1x. La membrana se incubó de nuevo durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución de anticuerpo secundario en tampón TTBS 1x y 1,6% de leche, en proporción 1:1000 o 1:2000. Los anticuerpos secundarios utilizados varían en función del anticuerpo primario utilizado (α -rabbit o α -mouse).

Una vez terminada la incubación se lavó la membrana con 3 lavados de 10 minutos con tampón TTBS 1x. Tras ello los cuales se utilizó el kit de detección para *western blot* (Amersham ECL, GE Healthcare), y tras incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto se reveló disponiendo la membrana en una cámara acondicionada a -28°C conectada a un CCD, usando el programa LAS-3000 para el procesamiento de las imágenes.

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gracias a los ensayos de iTRAQ realizados, se obtuvieron datos de diversas proteínas que se identificaron mediante MS. De este conjunto se filtraron los datos fijando un umbral de 2 péptidos como mínimo identificados (>95%) y un *score* ≥ 2 . Se calcularon las proporciones de los resultados iTRAQ en las zonas dañadas (ZL) o normales (ZN) del cartílago artrósico comparándolas con el cartílago normal (N) usando el programa del Protein Pilot.

De todo el conjunto, se seleccionaron aquellas que mostraban una modulación significativa en una proporción ≥ 1.8 o ≤ 0.55 , según los tests realizados por el programa. Estas

proteínas fueron la proteína de la capa intermedia del cartílago 1 (CILP-1), la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), el activador de la proteinasa C de procolágeno (PCEP-1), la condroaderina (CHAD) y la proteína YKL-39 (chitinase 3 like protein 2).

Proteína de la capa intermedia del cartílago 1 (CILP-1)

La proteína de la capa intermedia del cartílago 1 (CILP-1), es una proteína monomérica de 91.5 KDa. Su mRNA codifica una forma precursora con 2 dominios, de los cuales la porción C-terminal tiene una gran homología con la pirofosfohidrolasa de nucleótidos porcina (NTPPHasa) (Lorenzo *et al.*, 1998). Normalmente la proteína precursora se procesa en las células a una sola cadena polipeptídica de 78.5 Kda de naturaleza básica, con 6 regiones susceptibles de sufrir N-glicosilaciones necesarias para la maduración en la proteína funcional. También contiene 30 residuos de cisteína distribuidos a lo largo de la región N-terminal, que van a determinar la formación de puentes disulfuro entre los residuos de la propia cadena polipeptídica. El dominio N-terminal de CILP-1 contiene repeticiones tipo I similares a las de la trombospondina, así como residuos de cisteína asociados a una región hidrofóbica que va desde los aminoácidos 130 al 225. Tras ellos existe una región expuesta y a continuación otro dominio con puentes disulfuro entre los aminoácidos 354 y 445.

La función de CILP-1 parece estar relacionada con la modulación estructural de la matriz extracelular del cartílago, y se distribuye preferentemente en mayor cantidad en la capa intermedia. Se ha demostrado que esta proteína es secretada desde los condrocitos articulares y es depositada en la matriz extracelular del cartílago, y su expresión aumenta en los estados iniciales de la artrosis (Lorenzo *et al.*, 1998). Diversos ensayos han mostrado que CILP-1 contiene regiones a las que se van a unir diferentes anticuerpos dándose una respuesta autoinmune, que parece tener algún tipo de papel en los procesos inflamatorios que se producen debido a la destrucción del cartílago en la OA (Tsuruha *et al.*, 2001). En estos procesos los condrocitos presentan de forma anormal la proteína CILP-1 a los linfocitos, ya que se ha visto que estas células expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Davies *et al.*, 1994). También es posible que CILP-1 se reconozca como un antígeno debido al incremento de producción de la proteína por parte de los condrocitos durante el envejecimiento.

Los resultados que se obtuvieron en el ensayo de iTRAQ realizado muestran que la cantidad de CILP-1 parece aumentar en una proporción mayor en la zona del cartílago

artrósico de cadera que no está dañada (Tabla 3). En las otras zonas de rodilla también muestran un aumento, pero mucho más leve y poco significativo.

Tabla 3: Cuantificación de CILP-1 en el estudio iTRAQ.

CILP-1	ZN/N	PVal	ZL/N	PVal
Cadera	2,2652	0,0000*	1,0233	0,8314
Rodilla	1,2662	0,0045*	1,057	0,4550

Proporciones entre los péptidos de las muestras con OA en la zona no lesionada con respecto al control (ZN/N) y las de zona lesionada con respecto al control (ZL/N), tanto de cadera como de rodilla (* p-valor < 0.05 en el test t de Student).

En los datos obtenidos tras realizar los ensayos de *western blot* se confirma la tendencia observada en los experimentos anteriores (Figura 6). Se observa que el tejido de cartílago artrósico de rodilla parece secretar menor cantidad de CILP-1 que el tejido normal (ZN/N = 0,67; ZL/N = 0,97), aunque la diferencia no es significativa. Sin embargo, parece confirmarse que el cartílago artrósico de cadera secreta mayor cantidad de CILP-1 que el tejido normal (Figura 6), en una proporción mayor en el caso de la ZN (ZN/N = 16,34) que en la ZL (ZL/N = 5,73). Se sabe que la expresión de CILP-1 aumenta en pacientes con OA y parece que tiene una influencia en el desarrollo de la enfermedad (Tsuruha *et al.*, 2001). En articulaciones con OA el TGF- β que actúa en los condrocitos provoca el aumento del pirofosfato (PPi) extracelular que promueve la deposición de cristales de calcio. El IGF-1 antagoniza este proceso en condiciones normales, pero durante la OA se genera un bloqueo de la acción de IGF-1. Durante la OA CILP-1 se localiza tanto en la matriz como en zonas de la periferia celular y en zonas intracelulares, y parece ser que a través del dominio N-terminal inhibe a IGF-1, atenuando su señalización e interfiriendo con su capacidad de disminuir el PPi extracelular y de favorecer la síntesis de proteoglicanos (Johnson *et al.*, 2003). Este efecto puede ser directo a través de la unión al receptor de IGF-1, o de forma indirecta por su interacción con otras proteínas. Esta interacción puede desencadenar el incremento de las proteínas del complejo IGFBP que inhiben a IGF-1, o bien provocar un aumento en la síntesis de óxido nítrico que inhibe la fosforilación del receptor de IGF-1 impidiendo su activación (Loeser *et al.*, 2000).

Por tanto, comparando todos los resultados obtenidos en los ensayos de iTRAQ como en los *western blot*, existen evidencias de que la proteína CILP-1 aumenta en el tejido no dañado del cartílago con OA en cadera en una gran proporción (Figura 6). En la ZL de las

muestras de cadera no se observa apenas diferencias en el iTRAQ, pero en la densitometría de los *western blot* parece que existe un aumento respecto al cartílago normal, aunque en mucho menor proporción que la ZN. Por todo ello, no se pueden sacar conclusiones definitivas en las diferencias en la cantidad de proteína con respecto a la rodilla, pero sí parece estar claro que es un buen candidato como biomarcador diferencial de OA de cadera, sobre todo de la zona no dañada del cartílago artrósico (ZN).

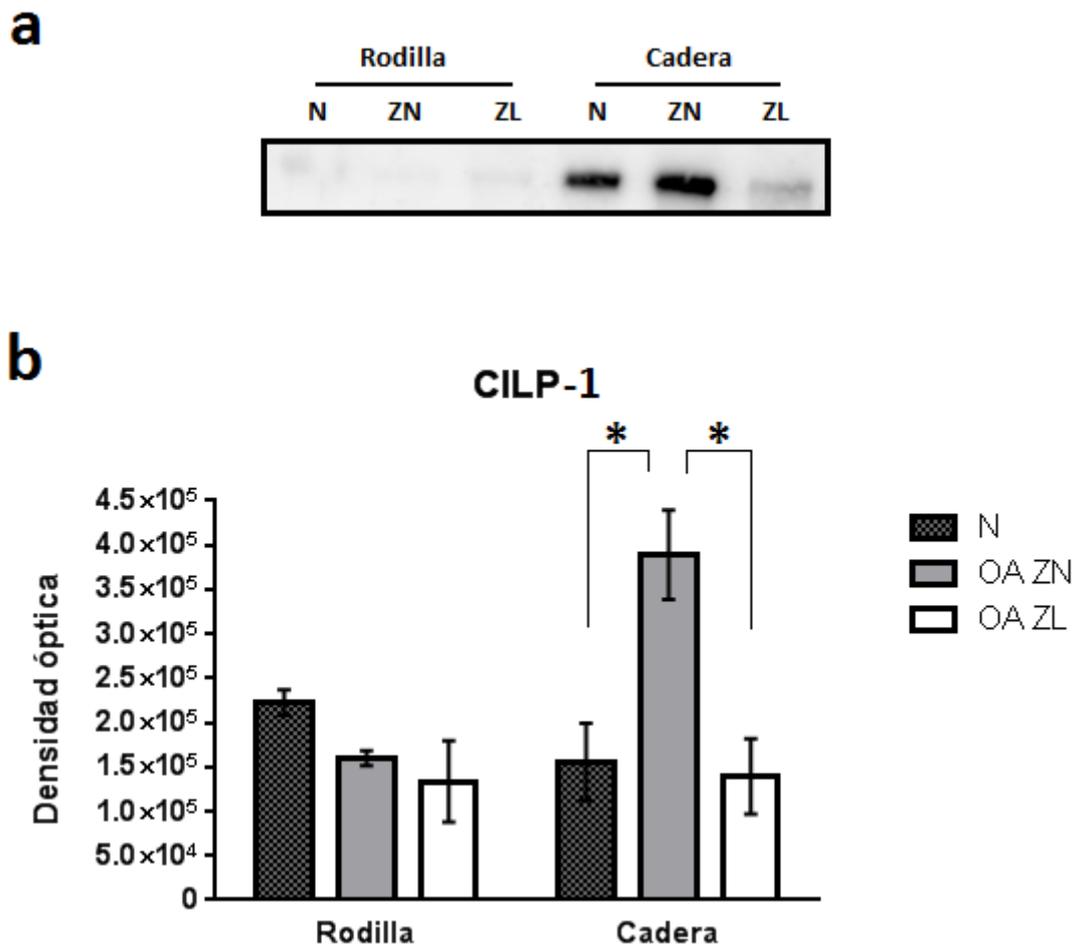


Figura 6: Cuantificación de CILP-1. (a) bandas representativas obtenidas en el ensayo de *western blot* según el tipo de muestra y el tipo de tejido del cartílago. (b) media y error estándar de la densitometría de las muestras normales y OA según las zonas del cartílago, tanto de rodilla como de cadera (n=3, * p-valor < 0.05 en el test t de Student).

Este patrón diferencial de la proteína parece tener relación con la distribución de la misma en el cartílago. Como se ha mencionado anteriormente, CILP-1 se localiza principalmente en la capa intermedia del tejido del cartílago, con una función claramente estructural. Su mayor cantidad en tejidos con OA parece indicar un intento en la reparación del

tejido reestructurando la matriz, aunque sólo se observa mayor cantidad en regiones artrósicas sin daño (ZN, primeros estadíos) que en las zonas ya dañadas (ZL) donde apenas existe tejido y la síntesis de CILP-1 se encuentra reducida.

Proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP)

La proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP) es una glicoproteína pentamérica no colagénica de la matriz extracelular (ECM) que pertenece a la familia de las trombospondinas (Recklies *et al.*, 1998). La COMP es producida por los condrocitos y puede unirse al colágeno tipo I, II y IX; facilitando las interacciones entre moléculas de colágeno y la formación de microfibrillas.

Gracias a los ensayos de iTRAQ realizados, se puede observar un aumento significativo de la cantidad de proteína en la ZN y la ZL del cartílago artrósico con respecto al tejido normal, mientras que en rodilla apenas existen diferencias (Tabla 4). Diversos estudios han mostrado que la abundancia de la COMP en el suero y en líquido sinovial de la articulación se encuentra relacionado con el daño del cartílago durante la OA. Existen evidencias de que la concentración de la COMP está incrementada en el tejido durante la OA de rodilla, sobre todo en las etapas iniciales de la enfermedad (Hoch *et al.*, 2011).

Tabla 4: Cuantificación de COMP en el estudio iTRAQ.

COMP	ZN/N	PVal	ZL/N	PVal
Cadera	2,2160	0,0000*	1,8525	0,0035*
Rodilla	1,1245	0,3076	0,9167	0,7629

Proporciones entre los péptidos de las muestras con OA en la zona no lesionada con respecto al control (ZN/N) y las de zona lesionada con respecto al control (ZL/N), tanto de cadera como de rodilla (* p-valor < 0.05 en el test t de Student).

Sin embargo los resultados de los ensayos de *western blot* no permiten validar estos datos, ya que no se obtuvieron unas señales relevantes en la densitometría. Se sabe que existe un aumento de los fragmentos de la proteína por su liberación en el líquido sinovial, debido a los procesos catabólicos que existen en la matriz durante la OA. Los condrocitos aumentan la síntesis de esta proteína para intentar reparar la degradación de los proteoglicanos en el desarrollo de la enfermedad, pero a su vez también se produce la degradación de otras

moléculas de la matriz extracelular como la COMP (Lohmander *et al.*, 1994), produciéndose un fallo en el intento de reparación del cartílago. Diversos trabajos han demostrado que que la COMP es susceptible a la proteólisis por parte de metaloproteasas como ADAMTS-4, constituyendo un buen candidato como biomarcador de OA (Zhen *et al.*, 2008). Además, se ha observado que las concentraciones de COMP son mayores en las etapas tempranas de la OA, reduciendo progresivamente su liberación al líquido sinovial a medida que avanza la enfermedad (Verma y Dalal, 2013). Debido a estos fenómenos, es posible que la COMP de las muestras usadas para western blot contasen con una OA de grado avanzado en la que gran cantidad de matriz ya ha sido degradada, produciéndose la pérdida progresiva del tejido por destrucción de la matriz. Por tanto en los *western blot* observamos muy poca cantidad de proteína, ya que la COMP en el tejido ya habría sufrido el ataque de proteasas y habría sido liberada al líquido sinovial (ZN), o bien apenas existiría una cantidad suficiente de matriz susceptible de degradación (ZL).

Activador de la proteinasa C de procolágeno (PCEP-1)

El activador de la proteinasa C de procolágeno (PCEP-1) es una proteína que favorece la acción de la proteinasa pCP, que interviene en el corte del propéptido C de las moléculas de procolágeno, paso esencial para la asociación posterior en fibrillas. PCEP-1 se une específicamente al propéptido del procolágeno C tipo I y al telopéptido C, induciendo un cambio conformacional que hace susceptible al procolágeno al corte por parte de la pCP (Moali *et al.*, 2005). La proteína PCEP-1 contiene tres dominios principales, 2 dominios CUB y un dominio NTR C-terminal. Los dominios CUB (*complement-Uegf-BMP1*) intervienen en interacciones con proteínas que están involucradas en el desarrollo, mientras que el motivo NTR (NETRIN) tiene homología con componentes C3, C4 y C5 del sistema del complemento.

Tabla 5: Cuantificación de PCEP-1 en el estudio iTRAQ.

PCEP-1	ZN/N	PVal	ZL/N	PVal
Cadera	1,4132	0,2090	1,4115	0,2342
Rodilla	2,0557	0,0000	2,1797	0,0000

Proporciones entre los péptidos de las muestras con OA en la zona no lesionada con respecto al control (ZN/N) y las de zona lesionada con respecto al control (ZL/N), tanto de cadera como de rodilla (* p-valor < 0.05 en el test t de Student).

Además, se ha observado que este motivo presenta homología con ciertos inhibidores de proteinasas (Mott *et al.*, 2000), por lo que esta proteína va a intervenir favoreciendo la formación de matriz fibrosa, ya sea potenciando la fibrilógenesis o inhibiendo las proteinasas degradadoras.

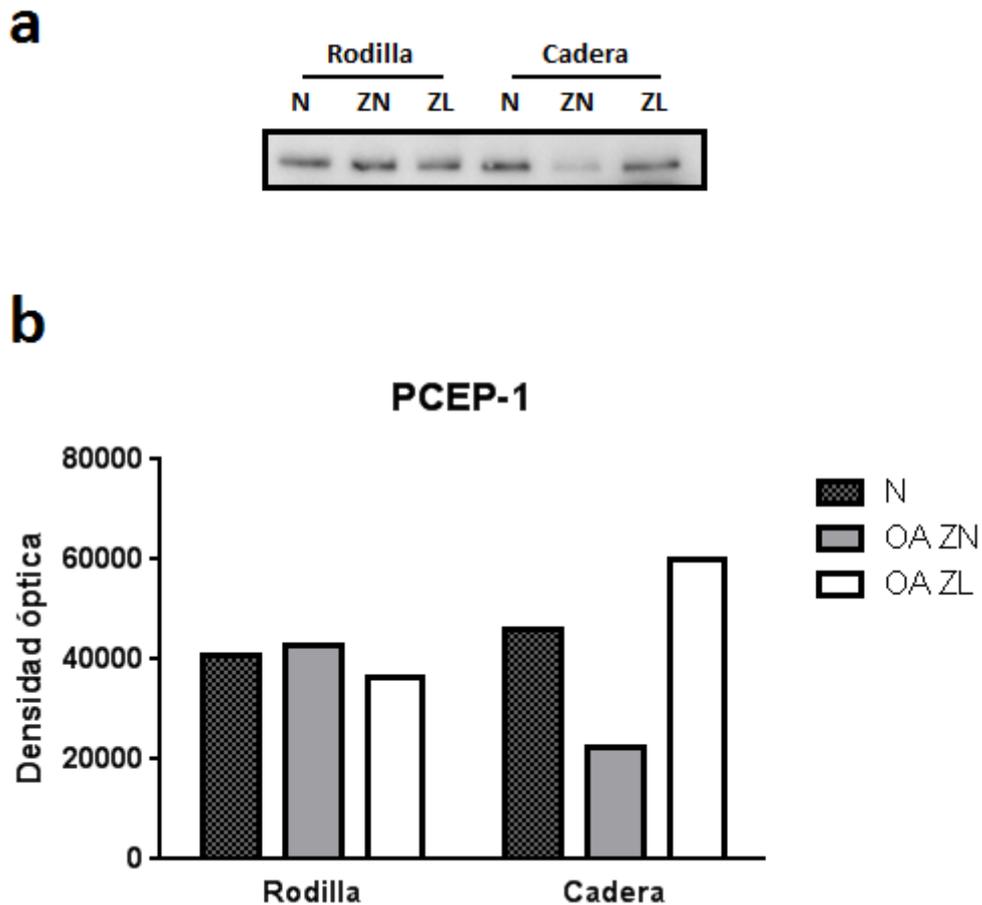


Figura 7: Cuantificación de PCEP-1. (a) bandas obtenidas en el ensayo de *western blot* según el tipo de muestra y el tipo de tejido del cartílago. (b) densitometría de las muestras normales y OA según las zonas del cartílago, tanto de rodilla como de cadera.

Según los ensayos preliminares de iTRAQ se puede comprobar que la PCEP-1 se encuentra aumentada en rodilla tanto en la ZN como en la ZL del cartílago OA con respecto a los controles normales. En la cadera también parece aumentar siguiendo el mismo patrón, pero en mucho menor grado que en el caso anterior (Tabla 5). Diversos trabajos han identificado la presencia de esta proteína tanto en suero (Ritter *et al.*, 2014) como en secretoma de cartílago de rodilla de pacientes con OA (Calamia *et al.*, 2012). Los datos obtenidos mediante *western blot* no confirman estos patrones (Figura 7), ya que parece disminuir en la zona normal de cadera ($ZN/N=0.49$, $ZL/N = 1.31$), mientras que en rodilla no

parecen existir diferencias significativas con respecto al tejido normal (ZN/N=1.05, ZL/N=0.89). Se analizó tan sólo una muestra de cada zona del cartílago, por lo que estos resultados no son realmente concluyentes, y se necesitan realizar más ensayos para conocer el tipo de modulación de esta proteína durante la OA. Por todo ello, no se puede confirmar su utilidad como biomarcador de diagnóstico de la enfermedad.

Condroadarina (CHAD)

La condroadarina (CHAD) es una proteína SLRP de clase IV que posee un tamaño de 38 kDa y contiene 11 repeticiones LRR. Esta proteína posee dos puentes disulfuro que forma dos bucles en el extremo C-terminal, y se localiza preferentemente en la matriz territorial y pericelular del cartílago maduro. En el cartílago la CHAD interviene en la señalización entre los condrocitos y la ECM mediante la unión a las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y a los proteoglicanos de la superficie celular (Haglund *et al.*, 2011). La CHAD también se une al colágeno de tipo II e interacciona con con los extremos N y C-terminal de los dominios globulares del colágeno tipo VI.

Tabla 3: Cuantificación de CHAD en el estudio iTRAQ.

CHAD	ZN/N	PVal	ZL/N	PVal
Cadera	0,5920	0,0024*	0,6382	0,0301*
Rodilla	2,3718	0,0003*	1,5119	0,0277*

Proporciones entre los péptidos de las muestras con OA en la zona no lesionada con respecto al control (ZN/N) y las de zona lesionada con respecto al control (ZL/N), tanto de cadera como de rodilla (* p-valor < 0.05 en el test t de Student).

Según los datos obtenidos en los ensayos de iTRAQ previos, la CHAD se encuentra aumentada de forma significativa en la ZN y la ZL de la rodilla con respecto al control, mientras que en las muestras de cadera aparece disminuída en ambas zonas del cartílago artrósico respecto al control (Tabla 6). Los ensayos de *western blot* realizados para validar estos resultados muestran sin embargo una tendencia inversa, según los datos de densitometría obtenidos a partir de 2 muestras diferentes de cada tejido (Figura 8). La proporción ZN/N y ZL/N parece aumentar para la CHAD en la cadera, mientras que en la rodilla disminuye en ambas zonas con respecto al control.

En diversos trabajos se ha visto que esta proteína interviene en el ensamblaje de las fibras de colágeno de la ECM. Mediante experimentos con ratones se ha visto que una delección del gen CHAD provoca alteraciones en la permeabilidad del agregado, dándose una diferencia importante en las propiedades biomecánicas de la capa superficial del cartílago, con variaciones en el espesor y disminución de dureza del tejido (Batista *et al.*, 2014). Sin embargo parece ser que la capa intermedia y profunda no presentan diferencias mecánicas en el tejido, por lo que se cree que la deficiencia en la CHAD no es un factor crucial que provoque el inicio

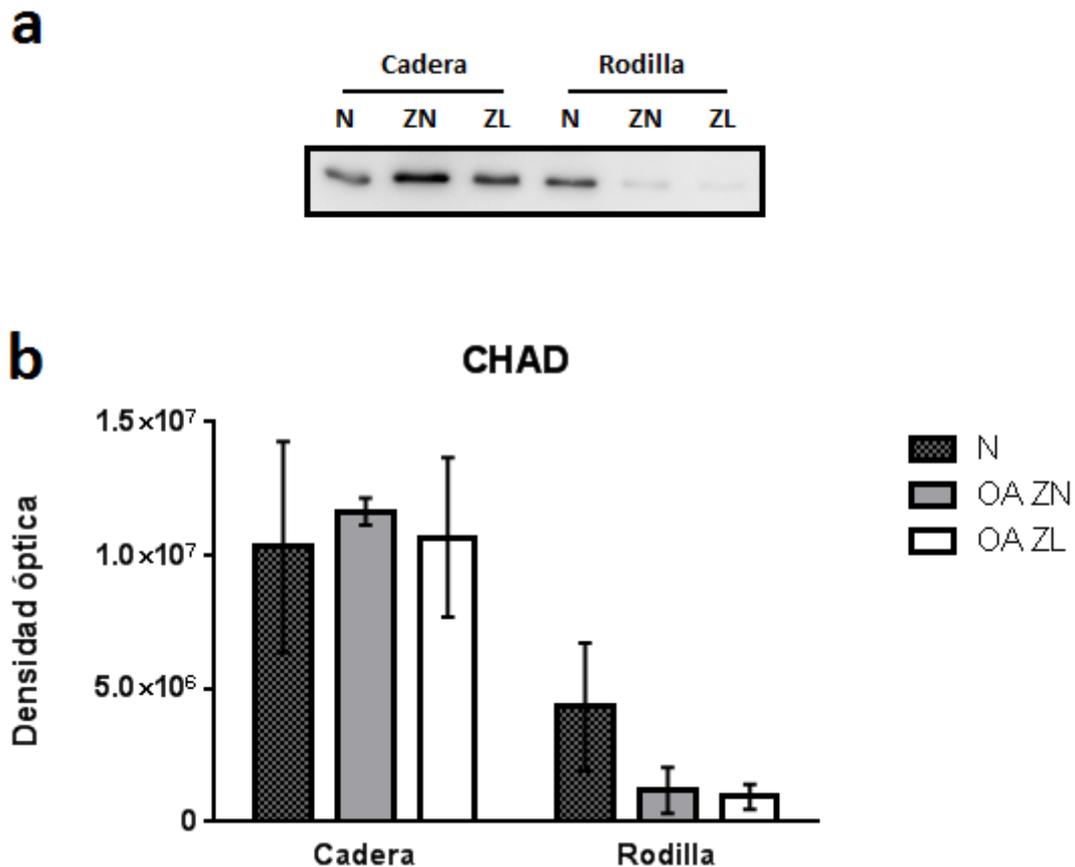


Figura 8: Cuantificación de CHAD. (a) bandas obtenidas en el ensayo de *western blot* según el tipo de muestra y el tipo de tejido del cartílago. (b) media y error estándar de la densitometría de las muestras normales y OA según las zonas del cartílago, tanto de rodilla como de cadera (n=2, * p-valor < 0.05 en el test t de Student).

de la OA. Esto contrasta con otros SLRPs, de los cuales su deficiencia provoca el desarrollo de un mayor grado de OA; probablemente debido a sus diferentes propiedades, estructura molecular y localización en el cartílago (Kalamajski y Oldberg, 2010). Uno de los puntos claves en los que pueden radicar estas diferencias es que la CHAD, a diferencia de otros SLRPs, no

contiene cadenas de GAGs. Todas estas características permiten explicar los resultados no concluyentes que hemos obtenido en nuestros ensayos, ya que es posible que la CHAD no esté modulada de forma diferencial en la OA, por lo que no se podría utilizar como biomarcador de la enfermedad. Es necesario aumentar el número de muestras analizadas y realizar nuevos ensayos para corroborar todas estas premisas.

YKL-39 (*chitinase 3 like protein 2*)

La proteína YKL-39 (*chitinase 3 like protein 2*) pertenece a la familia especial de las lectinas similares a quitinasas (*chitinase-like lectins*). Los miembros de esta familia están relacionados con diversas glicohidrolasas y quitinasas que cortan el enlace β -1,4 de los residuos de N-acetilglucosamina de la quitina. La proteína YKL-39 está relacionada de forma cercana con la YKL-40, y tienen una gran homología de secuencia (53% aproximadamente). Las siglas de sus nombres se refieren a los 3 aminoácidos que se encuentran en el extremo N-terminal en la proteína madura (Areshkov y Kavsan, 2010). A pesar de estar relacionados con las quitinasas, carecen de esta función debido al cambio de un residuo de ácido glutámico por un aminoácido hidrofóbico en el motivo DxxDxDxE del sitio activo (Schimpl *et al.*, 2012). En diferentes trabajos se ha visto que esta proteína tiene afinidad de unión a quito-oligosacáridos aunque no presente actividad quitinasa (Knorr *et al.*, 2003).

En nuestros ensayos de *western blot* no obtuvimos resultados relevantes en los secretomas analizados, sin embargo sí se han obtenido resultados interesantes en los experimentos realizados con líquido sinovial (Figura 9). Comparando la media de la densitometría de las muestras, se puede observar que la proteína YKL-39 se encuentra en mayor cantidad en pacientes con OA de grado III-IV que en los pacientes con una OA de menor grado (GII o GI). Existe evidencias estadísticas de que este aumento de la proteína es realmente significativo en las muestras de GIII-IV con respecto a las muestras de GII (GIII-IV/GII = 12.84), aunque no respecto al GI (GIII-IV/GI = 6.34). Paradójicamente en las muestras de GII la proteína disminuye respecto al GI (GII/GI = 0.49), pero en una proporción mucho menor que el aumento en el GIII descrito anteriormente y sin un valor estadístico relevante. Aunque se desconoce el rol exacto de YKL-39 en la OA, se ha visto en diversos trabajos que esta proteína es sintetizada en mayor medida por los condrocitos durante el desarrollo de la enfermedad (Knorr *et al.*, 2003). Por tanto los resultados de nuestros ensayos concuerdan con esta premisa, sugiriendo que esta proteína puede ser un buen candidato como biomarcador de OA.

Durante la OA, monocitos y macrófagos son reclutados a las zonas de inflamación, estando expuestos a altos niveles de TGF- β e IL-4. Diversos autores han mostrado evidencias de que las diferentes citoquinas tienen un efecto tanto sobre los macrófagos como sobre los condrocitos del cartílago y los fibroblastos de la membrana sinovial; provocando en ellos el aumento de la expresión de YKL-39 (Gratchev *et al.*, 2008). La IFN γ es una citoquina que con frecuencia predomina en los tejidos de cartílago con OA, y se sabe que tiene un efecto inhibitor en la expresión de YKL-39 inducida por TGF- β en los macrófagos, por lo que se piensa que los mayores niveles de YKL-39 en la OA son debidos principalmente a su expresión por los

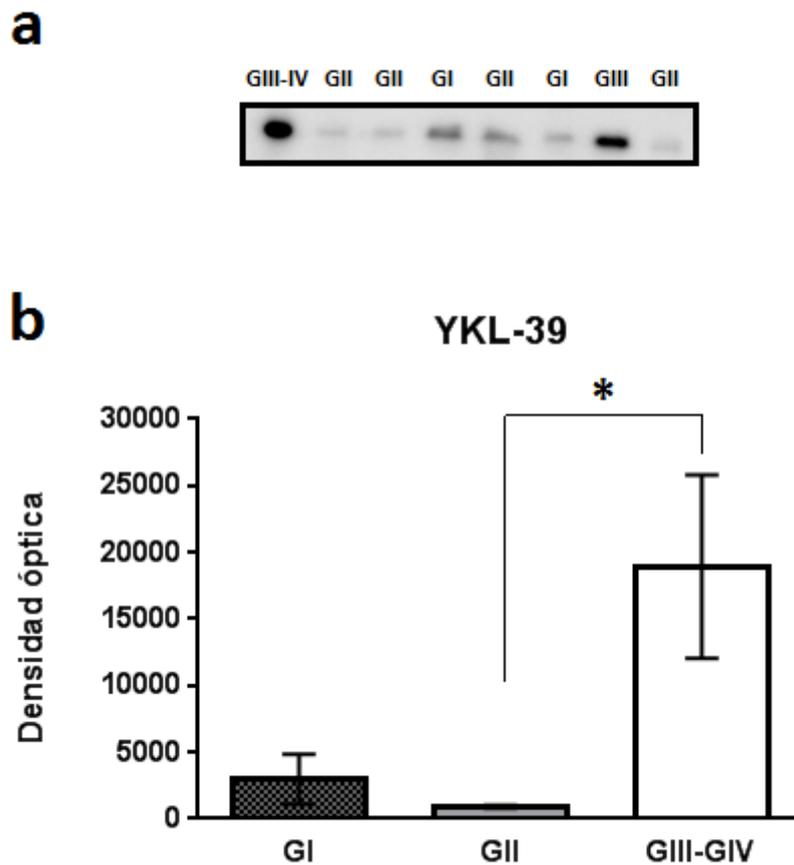


Figura 9: Cuantificación de YKL-39. (a) bandas obtenidas en el ensayo de *western blot* de líquido sinovial de rodilla. (b) media y el error estándar de las densitometrías de las muestras de líquido sinovial según el grado de enfermedad (GIII-IV n=2, GII n=3, GI n=2) (* p-valor < 0.05 en el test t de Student).

fibroblastos sinoviales (Steck *et al.*, 2002). Por todo ello, aunque aún no se ha determinado la función clara de YKL-39, parece que puede intervenir en la inducción de una respuesta autoinmune y en la remodelación del tejido articular. Los datos que hemos obtenido en nuestros ensayos coinciden con estos supuestos, ya que en estadíos más avanzados de la

enfermedad se producen respuestas inflamatorias de mayor grado, relacionadas en parte con una mayor expresión de YKL-39 en este caso. Diferentes trabajos han mostrado evidencias de que la proteína YKL-39 es reconocida como antígeno en enfermedades como la artritis reumatoide (Sekine *et al.*, 2001), pudiendo también producirse este fenómeno en los casos de OA. Por todas estas características, y aunque sería recomendable analizar un mayor número de muestras, se puede decir que la proteína YKL-39 en el líquido sinovial parece ser un biomarcador diferencial de estadios avanzados de OA.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La proteína amiloide P del suero (SAP) se encuentra reducida en el suero de pacientes con OA, siendo esta reducción significativa en el caso de OA de GIV en los dos péptidos que permitieron identificar la proteína (VGEYSLYIGR y IVLGQEQDSYGGK).
2. La vasorina se muestra disminuída en el suero de pacientes con OA respecto a los controles, siendo esta reducción significativa tanto en los casos de GII como en los de GIV.
3. La secreción de la proteína de la capa intermedia del cartílago 1 (CILP-1) se encuentra aumentada significativamente en la zona no lesionada del cartílago artrósico de cadera respecto a la zona lesionada y al cartílago normal.
4. La proteína YKL-39 se encuentra aumentada en líquido sinovial de rodilla con OA de GII-IV, con respecto a las muestras de menor grado de enfermedad.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Areshkov P.A. y Kavsan. V.M. (2010). Chitinase 3-like protein 2 (CHI3L2, YKL-39) activates phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases ERK1/ERK2 in human embryonic kidney (HEK293) and human glioblastoma (U87 MG) cells. *Cytology and Genetics*. Volume 44, (1), 1-6.
- Balakrishnan L., Nirujogi R.S., Ahmad S., Battacharjee M., Manda S.S., Renuse S., Kelkar D.S., Subbannayya Y., Raju R., Goel R., Thomas J.K., Kaur N., Dhillon M., Tankala S.G., Jois R., Vasdev V., Ramachandra Y.L., Sahasrabudhe N.A., Prasad T.S.K., Mohan S., Gowda H., Shankar S. y Pandey A. (2014) Proteomic analysis of human osteoarthritis synovial fluid. *Clin. Proteom.* 11, (6), 1-13.
- Batista M.A., Nia H.T., Önnarfjord P., Cox K.A., Ortiz C., Grodzinsky A.J., Heinegård D. Y Han L. (2014). Nanomechanical phenotype of chondroadherin-null murine articular cartilage. *Matrix Bio.* 38, 84-90.
- Bauer D.C., Hunter D.J., Abramson S.B., Attur M., Corr M., Felson D., Heinegård D., Jordan J.M., Kepler T.B., Lane N.E., Saxne T., Tyree B. y Kraus V.B. (2006). Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoart. Cart.* 14, (8), 723-727.
- Bengtsson E., Neame P.J., Heinegard D., Sommarin Y. (1995). The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. *J. Biol. Chem.* 270, (43), 25639–25644.
- Brenn D., Richter F. y Schaible H. (2007). Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin- 6 in the rat: An inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum.* 56, (1), 351-359.
- Calamia V., Lourido L., Fernández-Puente P., Mateos J., Rocha B., Montell E., Vergés J., Ruiz-Romero C. Y Blanco F.J. (2012). Secretome analysis of chondroitin sulfate-treated chondrocytes reveals anti-angiogenic, antiinflammatory and anti-catabolic properties. *Arthritis Res. Ther.* 14, 202-214.
- Chen S. y Birk D.E. (2013) The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular assembly. *FEBS J.* 280, (10), 2120-2137.
- Davies M.E., Horner A., Franz B. (1994) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and MHC class II on chondrocytes in arthritic joints from pigs experimentally infected with *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (4), 265–72.
- Day J.M., Olins A.I., Murdoch A.D., Canfield A., Sasaki T., Timpl R., Hardingham T.E. y Aspberg A. (2004). Alternative splicing in the aggrecan G3 domain influences binding interactions with tenascin-C and other extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 279, (13), 12511-12518.

- De Ceuninck F., Marcheteau E., Berger S., Caliez A., Dumont V., Raes M., Anract P., Leclerc G., Boutin J.A. y Ferry G. (2005). Assessment of some tools for the characterization of the human osteoarthritic cartilage proteome. *J. Biomol. Tech.* 16, (3), 256-265.
- England S., Bevan S., Docherty R.J. (1996). PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiology.* 495, (2), 429-440.
- Fernández-Puente P., Mateos J., Fernández-Costa C., Oreiro N., Fernández-López C., Ruiz-Romero C. y Blanco F.J. (2011). Identification of a panel of novel serum osteoarthritis biomarkers. *J. Proteome Res.* 10, 5095-5101.
- Flannery C.R. (2006) MMPs and ADAMTSs: functional studies. *Front. Biosci.* 11, 544-569.
- Funderburgh J.L., Funderburgh M.L., Mann M.M. y Conrad G.W. (1991) Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulfate proteoglycan from bovine aorta. *J Biol Chem.* 266, 24773-24777.
- Gerber S.A., Rush J., Stemman O., Kirschner M.W. y Gygi S.P. (2003). Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, (12), 6940-6945.
- Gill M.R., Oldberg A. y Reinholt F.P. (2002). Fibromodulin-null murine knee joints display increased incidences of osteoarthritis and alterations in tissue biochemistry. *Osteoar. Cart.* 10, (10), 751-757.
- Goldring M.B. y Berenbaum F. (2004). The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 427, 37-46.
- Gratchev A., Schumuttermaier C., Mamidi S., Gooi L., Goerdts S. y Kzhyshkowska J. (2008). Expression of osteoarthritis marker YKL-39 is stimulated by transforming growth factor beta (TGF-beta) and IL-4 in differentiating macrophages. *Biomark. Ins.* 3, 39-44.
- Haglund, L., Tillgren, V., Addis, L., Wenglén, C., Recklies, A., Heinegård, D. (2011). Identification and characterization of the integrin $\alpha 2\beta 1$ binding motif in chondroadherinmediating cell attachment. *J. Biol. Chem.* 286, (5), 3925-3934.
- Hamazaki H. (1987). Ca^{2+} -mediated Association of Human Serum Amyloid P Component with Heparan Sulfate and Dermatan Sulfate. *J. Bio. Chem.* 262, (4), 1456-1460.
- Hawkins P.N., Richardson S., Vigushin D.M. (1993) Serum amyloid P component scintigraphy and turnover studies for diagnosis and quantitative monitoring of AA amyloidosis in juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 36, (6), 842-851.
- Hoch J.M., Mattacola C.G., Medina McKeon J.M., Howard J.S. y Latterman C. (2011) Serum cartilage oligomeric matrix protein (sCOMP) is elevated in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoar. Cart.* 19, (12), 1396-1404.

- Ikeda Y., Imai Y., Kumagai H., Nosaka T., Morikawa Y., Hisaoka T., Manabe I., Maemura K., Nakaoka T., Imamura T., Miyazono K., Komuro I., Nagai R. y Kitamura T. (2004). Vasin, a transforming growth factor β -binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. *PNAS*. 101, (29), 10732-10737.
- Issa S.N. y Sharma L. (2006). Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr. Rheumatol. Rep.* 8, (1), 7–15.
- John T., Stahel P.F., Morgan S.J. y Schulze-Tanzil G. (2007). Impact of the complement cascade on posttraumatic cartilage inflammation and degradation. *Histol. Histopathol.* 22, (7), 781-790.
- Johnson K., Farley D., Hu S. Y Terkeltaub R. (2003). One of two chondrocyte-expressed isoforms of cartilage intermediate-layer protein functions as an insulin-like growth factor 1 antagonist. *Arthritis Rheum.* 48, (5), 1302-1314.
- Kalamajski, S. y Oldberg, Å., (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol.* 29, (4), 248–253.
- Kraus V.B., Blanco F.J., Englund M., Karsdal M.A. y Lohmander L.S. (2015) Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoar. Cart.*
- Lee A., Ellman M.B., Yan D., Kroin J.S., Cole B.J., Van Wijnen A.J. e Im H. (2013) A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene.* 527, (2), 440-447.
- Li X., Ellman M.B., Kroin J.S., Chen D., Yan D., Mikecz K. y Ranjan K.C (2012) Species-specific biological effects of FGF-2 in articular cartilage: Implication for distinct roles within the FGF receptor family. *J. Cel. Biochem.* 113, (7), 2532–2542.
- Loeser R.F., Shanker G., Carlson C.S., Gardin J.F., Shelton B.J., Sonntag W.E. (2000). Reduction in the chondrocyte response to insulinlike growth factor 1 in aging and osteoarthritis: studies in a non-human primate model of naturally occurring disease. *Arthritis Rheum.* 43, (9), 2110–2120.
- Lohmander L.S., Saxne T. y Heinegård, D. (1994). Release of cartilage oligomeric protein (COMP) into joint fluid after knee injury and osteoarthritis. *Arthritis Rheum. Dis.* 53, (1), 8-13.
- Lorenzo P., Neame P., Sommarin Y. y Heinegård D. (1998). Cloning and deduced amino acid sequence of a novel cartilage protein (CILP) identifies a proform including a nucleotide pyrophosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 273, (36), 23469–23475.
- Lotz M. (2001). Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 391, 108-115.
- Lourido L., Calamia V., Mateos J., Fernández-Puente P., Fernández-Tajes J., Blanco F.J. y Ruiz-Romero C. (2014). Quantitative proteomic profiling of human articular cartilage degradation in osteoarthritis. *J. Proteome Res.* 13, (12), 6096-6106.

- Loza E., López-Gómez J.M., Abasolo L., Maese J., Carmona L. y Batlle-Gualda E. (2009). Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. *Arthritis Rheum.* 61, (2), 158–165.
- Melrose J., Fuller E.S., Roughley P.J., Smith M.M., Kerr B., Hughes C.E., Caterson B. y Little C.B. (2008). Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratocan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues. *Arthritis Res. & Ther.* 10, (4), 1-10.
- Moali C., Font B., Ruggiero F., Eichenberger D., Rousselle P., Francois V., Oldberg A., Bruckner-Tuderman L. y Hulmes D.J.S. (2005). Substratespecific modulation of a multisubstrate proteinase. *J. Biol. Chem.* 280, (25), 24188–24194.
- Morgan B.P. (2000). The complement system: an overview. *Methods Mol. Biol.* 150, 1-13.
- Morgan B.P., Marchbank K.J., Longhi M.P., Harris C.L. y Gallimore A.M. (2005). Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol. Lett.* 97, (2), 171-179.
- Mott, J.D., Thomas C.L., Rosenbach M.T., Takahara K., Greenspan D.S. y Banda M.J. (2000). Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.* 275, (2), 1384–1390.
- Neame P.J., Kay C.J., McQuillan D.J., Beales M.P. y Hassell J.R. (2000). Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, (5), 859–863.
- Nedelkov D., Kiernan U.A., Niederkofler E.E., Tubbs K.A., Nelson R.W. (2005). Investigating diversity in human plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, (31), 10852–10857.
- Ritter S.Y., Collins J., Krastins B., Sarracino D., Lopez M., Losina E. Y Aliprantis A.O. (2014). Mass spectrometry assays of plasma biomarkers to predict radiographic progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 16, (5), 456-464.
- Read S. (2007). Future targets to control osteoarthritis pain. *Arthritis Res. Ther.* 9, (3), 212.
- Recklies A.D., Baillargeon L. y White C. (1998). Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 41, (6), 997–1006.
- Sakiyama H., Nakagawa K., Kuriwa K., Imai K., Okada Y., Tsuchida T., Moriya H. y Imajoh-Ohmi S. (1997). Complement C1s, a classical enzyme with novel functions at the endochondral ossification center: immunohistochemical staining of activated C1s with a neoantigen-specific antibody. *Cell. Tissue Res.* 288, (3), 557-565.
- Sattler M., Dannhauer T., Hudelmaier M., Wirth W., Sanger A.M., Kwok C.K. (2012). Side differences of thigh muscle cross-sectional areas and maximal isometric muscle force in bilateral knees with the same radiographic disease stage, but unilateral frequent pain - data from the osteoarthritis initiative. *Osteoart. Cart.* 20, (6), 532-540.

- Sekine T., Masuko-Hongo K., Matsui T., Asahara H., Takigawa M., Nishioka K. y Kato T. (2001). Recognition of YKL-39, a human cartilage related protein, as a target antigen in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 60, (1), 49-54.
- Schimpl M., Rush C.L., Betou M., Eggleston I.M., Reclies A.D. y Van Aalten M.F. (2012) Human YKL-39 is a pseudo-chitinase with retained chitooligosaccharide-binding properties. *Biochem. J.* 446, (1), 149-157.
- Steck, E., Breit, S., Breusch, S.J. (2002). Enhanced expression of the human chitinase 3-like 2 gene (YKL-39) but not chitinase 3-like 1 gene (YKL-40) in osteoarthritic cartilage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, (1), 109–115.
- Sjöberg A.P., Manderson G.A., Mörgelin M., Heinegård D. y Blom A.M. (2009). Short leucine-rich glycoproteins of the extracellular matrix display diverse patterns of complement interaction and activation. *Mol. Immunol.* 46, (5), 830–839.
- Sommer C. (2004). Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci. Lett.* 361, (1-3), 184-187.
- Tsuruha J., Masuko-Hongo K., Kato T., Sakata M., Nakamura H., Nishioka K. (2001). Implication of cartilage intermediate layer protein in cartilage destruction in subsets of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44, (4), 838–845.
- Verma P. y Dalal K. (2013). Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker. *Ortho. Res. Soc.* 31, (1), 999-1006.
- Volanakis J.E. y Narayana S. (1996). Complement factor D, a novel serine protease. *Protein Sci.* 5, (4), 553-564.
- Wang Q., Rozelle A.L., Lepus C.M., Scanzello C.R., Song J.J., Larsen D.M., Crish J.F., Bebek G., Ritter S.Y., Lindstrom T.M., Hwan I., Wong H.H., Punzi L., Encarnacion A., Shamloo M., Goodman S.B., Wyss-Coray T., Goldring S.R., Banda N.K., Thurman J.M., Gobeze R., Crow M.K., Holers V.M., Lee D.M. y Robinson W.H. (2012). Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nat. Med.* 17, (12), 1674-1679.
- Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Tanaka S, Kawaguchi H, Nakamura K. (2012). Accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidaemia, and impaired glucose tolerance raises the risk of occurrence and progression of knee osteoarthritis: a 3-year follow up of the ROAD study. *Osteoart. Cart.* 20, (11), 1217-1226.
- Zhang H., Liu A.Y., Loriaux P., Wollscheid B., Zhou Y., Watts J.D. (2007). Mass spectrometric detection of tissue proteins in plasma. *Mol. Cell. Proteomics.* 6, (1), 64–71.
- Zhen E.Y., Brittain I.J., Laska D.A., Mitchell P.G., Sumer E.U., Karsdal M.A. y Duffin K.L. (2008). Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 58, (8), 2420-2431.