



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**FACULTAD DE BIOLOGÍA
MÁSTER EN BIOLOGÍA CELULAR, MOLECULAR Y GENÉTICA.**

Curso académico 2019-2020

TRABAJO FIN DE MASTER

**Validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y
seguimiento de la artrosis de mano erosiva**

**Validation of protein biomarkers for the diagnosis and
monitoring of erosive hand osteoarthritis**

**Validación de biomarcadores proteicos para o
diagnóstico e seguimento da artrose de mans erosiva**

Directora del trabajo: Valentina Calamia

Co-directora del trabajo: Cristina Ruiz Romero

Tutor del trabajo: Francisco J. Blanco García

Alumna: Andrea Macías Cedeño

Fecha de presentación del trabajo: 26 de junio de 2020

*validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de
mano erosiva*

Contenido

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
1.- ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA	11
1.1.- La Artrosis.....	11
1.1.2.- Mediadores de la inflamación implicados en la OA.....	12
1.2.- La OA y su afectación a las manos	12
1.2.1.- Diagnóstico diferencial de OA de mano.....	14
1.2.2.- Fenotipos de OAm: Artrosis Erosiva o Inflamatoria (OAE).....	14
1.3.- Biomarcadores.....	15
1.3.1 Clasificación de los biomarcadores	17
1.3.2 Biomarcadores en OA de mano	18
1.4.- Estrategias proteómicas para la identificación de biomarcadores de OA	19
1.4.1.- Técnicas proteómicas basadas en <i>arrays</i> de proteínas	20
1.4.1.1.- Clasificación de los arrays de proteínas	22
1.4.1.2.- Aportación de la Proteómica a la OA.....	24
2.- HIPÓTESIS	25
3.- OBJETIVOS	26
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	27
a) Diseño de estudio	27
b) Ámbito de estudio	27
c) Período de estudio	27
d) Tamaño de la muestra	27
e) Selección de la muestra	28
4.1.- Procedimientos.....	29
4.1.1.- Constitución del grupo de trabajo.....	29
4.1.2.- Reunión informativa con los jefes de servicio y plataformas.....	29
4.1.3.- Selección de los participantes y firma de consentimiento informado	29
4.2.- Variables.....	30
4.3.- Desarrollo de las técnicas Proteómicas	30
4.3.1.- Tecnología Luminex XMAP	30
4.3.2.- Instrumento para la lectura	32
4.3.3.- Mecanismo de detección de señal	33

4.3.4.- Protocolos para ejecución de las técnicas.....	33
4.3.5.- Activación de las microesferas	34
4.3.6.- Acoplar el anticuerpo de captura a una población de microesferas.	35
4.3.7.- Verificar el acoplamiento	35
4.3.8.- Inmunoensayo de tipo sándwich.....	36
4.4.- Limitaciones del estudio.....	37
4.5.- Análisis de datos.....	37
5.- PLAN DE TRABAJO.....	38
6.- ASPECTOS ÉTICOS.....	38
7.- APLICABILIDAD.....	39
8.- DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
8.1.- Colectivos de interés	40
8.2.- Estrategias de difusión	40
9.- FINANCIACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	41
9.1.- Infraestructura necesaria	41
9.2.- Fungibles necesarios	42
9.4 Presupuesto.....	43
10.- BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

OA	Artrosis (osteoartrosis u osteoartritis)
2-DE	Electroforesis bidimensional
AACP	Anticuerpo anti-péptido citrulinado
ACR	American College of Rheumatology
BSA	Suero bovino fetal
CMC	Articulación metacarpiana
DIGE	Electroforesis diferencial en gel
EDC	1 Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiamida
EM	Espectrometría de masas
EOA	Artrosis erosiva
ESI	Ionización por electrospray
FR	Factor Reumatoide
IEF	Isoelectroenfoque
IFD	Articulación Interfalángica distal
IFP	Articulación Interfalángica proximal
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleucina
µg	Microgramo
IT	Trampa iónica
iTRAQ	Marcaje isotópico para cuantificación relativa y absoluta
JCR	Journal Citation Reports 2018
LC	Cromatografía líquida
LTB4	Leucotrieno B4
m/z	Masa/carga
MALDI	Desorción/Ionización mediante láser asistida por matriz
MCF	Articulación Metacarpofalángica
MES	Morfilo etanosulfónico
MFI	Intensidad de fluorescencia media
MRM	Monitorización de reacciones múltiples
nm	Nanómetros

OAE	Artrosis de mano erosiva
OAm	Artrosis de mano
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PE	Ficoeritrina
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial de hidrógeno
PROCOAC	Cohorte Prospectiva Española para el estudio de la Osteoartritis
PTMs	Modificaciones Post-traduccionales
SAPE	Estreptavidina/ficoeritrina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SER	Sociedad Española de Reumatología
SILAC	Marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivo celular
Sulfo-NHS	Sulfo-N-hidroxisuccinamida
TGFB	Factor transformador de crecimiento beta
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TOF	Tiempo de vuelo
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Criterios de diagnóstico propuestos para la artrosis erosiva.....	15
Tabla II. Requisitos fundamentales de un biomarcador ideal.	16
Tabla III. Clasificación de biomarcadores según niveles de calificación	17
Tabla IV. Clasificación de biomarcadores, BIPEDS	18
Tabla V. Ventajas y desventajas de los arrays de proteínas.....	21
Tabla VI. Plan de trabajo previsto.....	38
Tabla VII. Difusión de resultados a través de revistas científicas y cuartil JCR	40
Tabla VIII. Difusión de resultados a través de congresos científicos.	41
Tabla IX. Presupuesto del proyecto de investigación.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la articulación diartroïdal humana	12
Figura 2. Tipos de nódulos y articulaciones.....	13
Figura 3. Biomarcadores en OA de mano	19
Figura 4. Formatos principales de arrays de anticuerpos	24
Figura 5. Tecnología Luminex xMAP.	30
Figura 6. Composición de las microesferas	31
Figura 7. Principio de las esferas en un ensayo inmunológico	31
Figura 8. Esquematización de la confirmación del acoplamiento del anticuerpo de captura a la superficie de la esfera.....	32
Figura 9. Representación del sistema de detección del equipo MAGPIX	33
Figura 10. Soportes imantados.....	34

RESUMEN

La Artrosis u Osteoartritis (OA) es la enfermedad reumática más frecuente e incapacitante a nivel mundial, caracterizada por la degradación progresiva del cartílago articular, cambios en el hueso subcondral e inflamación de la membrana sinovial. La OA puede tener lugar en diversas articulaciones, encontrándose las de las manos entre las más comúnmente afectadas. Una variante de la artrosis de mano clásica es la Artrosis de mano erosiva, un fenotipo que se caracteriza por episodios agudos de inflamación y graves deformidades que afectan fundamentalmente a las articulaciones interfalángicas.

El diagnóstico de la OA se ha basado tradicionalmente en la evaluación de síntomas y radiografías. Sin embargo, a nivel radiográfico los cambios son sólo detectables cuando ya hay daño severo en la articulación, lo que hace especialmente importante encontrar biomarcadores de OA que faciliten su diagnóstico y monitorización. Los biomarcadores moleculares tienen el potencial de proporcionar una advertencia temprana sobre el inicio de la descomposición de la matriz, que podría posibilitar un tratamiento precoz para prevenir la destrucción del cartílago y el hueso.

El presente proyecto está encaminado a la *“Validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva”*, empleando técnicas proteómicas basadas en *arrays de proteínas* para la validación de potenciales biomarcadores. Con este objetivo se realizará un estudio observacional de casos y controles empleando muestras de suero de pacientes pertenecientes a la cohorte PROCOAC, del Hospital Universitario de A Coruña, sobre las que se analizará un panel de citoquinas inflamatorias relacionadas con el proceso artrósico. La definición de un perfil de estas proteínas que esté asociado al fenotipo erosivo de OAm permitirá mejorar el diagnóstico y el manejo de esta enfermedad en clínica.

SUMMARY

Osteoarthritis or Osteoarthrosis (OA) is the most common and disabling rheumatism worldwide, characterized by the progressive degradation of articular cartilage, changes in the subchondral bone and inflammation of the synovial membrane. OA can take place in various joints, with those of the hands being among the most commonly affected. A variant of the classic hand OA is the erosive phenotype, characterized by acute episodes of inflammation and severe deformities that mainly affect the interphalangeal joints.

The diagnosis of OA has traditionally been based on the evaluation of symptoms and radiographs. However, at the radiographic level, the changes are only detectable when there is already severe damage in the joint. This makes it especially important to find OA biomarkers that facilitate its diagnosis and monitoring. Molecular biomarkers have the potential to provide an early warning about the onset of matrix decomposition, which could enable an early treatment to prevent destruction of cartilage and bone.

The present project aims the "*Validation of protein biomarkers for the diagnosis and monitoring of erosive hand osteoarthritis*" using proteomic techniques based on protein arrays for the validation of potential biomarkers of this disease phenotype. To attain this objective, a case-control study will be carried out on sera from patients belonging to the PROCOAC cohort, from the University Hospital of A Coruña. A panel of inflammatory cytokines related with the OA process will be quantified on these samples. The characterization of a profile of cytokines associated with the erosive phenotype of OAm will help to improve the diagnosis and management of this disease in the clinic.

RESUMO

A Artrose ou Osteoartritis (OA) é o reumatismo máis común e inhabilitante en todo o mundo, caracterizado pola progresiva degradación da cartilaxe articular, cambios no óso subcondral e inflamación da membrana sinovial. A OA pode ter lugar en varias articulacións, sendo a das mans unha das máis afectadas. Unha variante da artrose clásica da man é o fenotipo erosivo, caracterizado por episodios agudos de inflamación e deformidades graves que afectan principalmente ás articulacións interfalaxianas.

O diagnóstico da OA baseouse tradicionalmente na avaliación de síntomas e radiografías. Con todo, a nivel radiográfico os cambios son só detectables cando xa hai dano severo na articulación, o que fai especialmente importante atopar biomarcadores de OA que faciliten o seu diagnóstico e monitorización. Os biomarcadores moleculares teñen o potencial de proporcionar unha advertencia temperá sobre o inicio da descomposición da matriz, que podería posibilitar un tratamento precoz para previr a destrución da cartilaxe e o óso.

O presente proxecto está dirixido á “*Validación de biomarcadores de proteínas para o diagnóstico e seguimento da artrose de man erosivas*”, empregando técnicas proteómicas baseadas en matrices de proteínas para a validación de potenciais biomarcadores. Con este obxectivo, realizarase un estudo observacional de casos e controis empregando mostras de soro de pacientes pertencentes á cohorte PROCOAC, do Hospital Universitario da Coruña, sobre as que se analizará un panel de citoquinas inflamatorias relacionadas co proceso artrósico. A definición dun perfil destas proteínas que estea asociado ao fenotipo erosivo de OAm permitirá mellorar o diagnóstico e o manexo desta enfermidade en clínica.

1.- ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1.1.- La Artrosis

La Artrosis (OA), también denominada osteoartrosis u osteoartritis, es la enfermedad crónica de las articulaciones más común y potencialmente irreversible (Wojdasiewicz, Poniatowski, & Szukiewicz, 2014). Se trata de la patología articular más frecuente a nivel mundial y en la actualidad es una de las 10 enfermedades más incapacitantes en países desarrollados, con afectación a ambos sexos y una prevalencia del 9.6% en hombres y 18.0% en mujeres, respectivamente (Ruiz-Romero, Fernández-Puente, Calamia, & Blanco, 2015). En España, la prevalencia es del 29.35%, porcentaje que se ve incrementado con la edad, alcanzando un 52.6% en los mayores de 80 años de edad y siendo más frecuente en mujeres a partir de los 60 años de edad (Blanco & et al., 2020). La OA provoca más discapacidad en las personas mayores que cualquier otra enfermedad, disminuyendo significativamente su calidad de vida (Blanco F. J., 2018).

La OA es una enfermedad de las articulaciones que se caracteriza por la degradación del cartílago articular hialino (Belmonte-Serrano, Beltrán-Fabregat, & Lerma-Garrido, 2005). El cartílago articular hialino es un tejido que cubre el hueso y que amortigua las fuerzas que ejercen presión sobre las articulaciones, tal como se observa en la **figura 1**. Por su parte, los ligamentos y tendones permiten el deslizamiento de las superficies articulares y ayudan a estabilizar el movimiento (SER, 2010). Se trata de una enfermedad compleja que se origina como consecuencia de un grupo heterogéneo de procesos que provocan una afectación global de todos los componentes de la articulación (Loeser, Goldring, Scanzello, & Goldring, 2012), y está asociada fuertemente con el envejecimiento del organismo. Una característica importante de la OA es una lenta progresión, de tal modo que la incapacidad articular se podrá detectar solo con los años de evolución de la enfermedad (López-Armada, Carames, Cillero-Pastor, & Blanco-García, 2004). En su fase final, la OA refleja una insuficiencia de los procesos de reparación del cartílago, lo que conduce a la degradación de la matriz extracelular, la muerte de los condrocitos (células del cartílago) y la pérdida total de la integridad de este tejido (Blanco, Vázquez-Martul, De Toro, Galdo, & Guitian, 1998).

A día de hoy se conoce que la artrosis es una enfermedad multifactorial, con aspectos comunes y diferenciales entre los individuos afectados que conducen a manifestaciones clínicas similares o a pronósticos variables en los pacientes. Existen diversos factores de riesgo que afectan la

incidencia y progresión de la artrosis, que pueden ser sistémicos o mecánicos (Busija, y otros, 2010). Entre los factores sistémicos se encuentran la edad, género, factores genéticos y nutricionales; mientras que los factores mecánicos incluyen obesidad, densidad ósea, actividad física y traumatismos, morfología y alineamiento de la articulación (Arden & Nevitt, 2006).

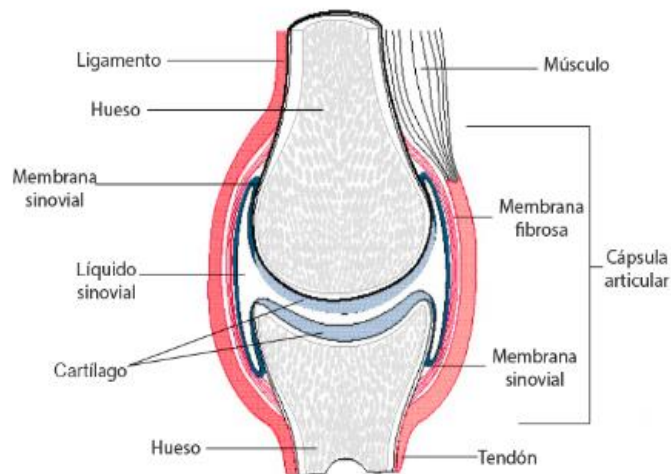


Figura 1. Estructura de la articulación diartroïdal humana (Rúa-Figueroa, 2014).

1.1.2.- Mediadores de la inflamación implicados en la OA

Los condrocitos presentan la capacidad de producir gran variedad de mediadores de inflamación: proteasas (colagenasas, estromelisin, agreganasas), citoquinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-17, IL-18, MCP-1, RANTES), citoquinas antiinflamatorias y antagonistas (IL-4, IL-10 e IL-13), factores de crecimiento (IGF, TGF β), radicales libres (NO) y mediadores lipídicos (PGE2, LTB4) (López-Armada, Carames, Cillero-Pastor, & Blanco-García, 2004). Todas estas moléculas pueden representar valiosos biomarcadores para el diagnóstico y monitorización de la enfermedad.

1.2.- [La OA y su afectación a las manos](#)

La OA puede tener lugar en diversas articulaciones, encontrándose las de las manos entre las más comúnmente afectadas (**Figura 2**) (Wolski, Podsiadlo, Stachowiak, Englund, & Haugen, 2018). El proceso artrósico conlleva diferentes cambios articulares, incluidas anomalías óseas tales como osteofitos, erosiones y daños en el cartilago que describen diferentes manifestaciones clínicas (Glimm, Werner, Burmester, Backhaus, & Ohrndorf, 2016). Entre las

validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva

manifestaciones más frecuentes se encuentran el dolor, la rigidez, la inflamación, los nódulos y la sensación de malestar por la apariencia estética (Neuprez, y otros, 2015). Los síntomas se dirigen a sitios característicos: articulaciones IFD, articulaciones IFP, base del pulgar, índice y articulaciones MCF, que comúnmente están presentes de manera intermitente (Zhang, y otros, 2009).

La OAm es una enfermedad que comienza en la mediana edad, con una mayor prevalencia en los ancianos. Se encuentra en aproximadamente el 13% de los hombres y el 26% de las mujeres mayores de 70 años, con una prevalencia relativamente estable a partir de entonces. Las articulaciones más comúnmente afectadas son la interfalángica distal y la interfalángica proximal, seguidas de la base de la articulación del pulgar. En prácticamente todas las articulaciones de la mano, la prevalencia de la OA sintomática es mayor en las mujeres que en los hombres, con una relación de probabilidad general de tres a uno en términos del número total de articulaciones involucradas, lo que implica una influencia hormonal en la prevalencia de OA de mano (Zhang, y otros, 2002). Las ampliaciones óseas como los ganglios de Bouchard en las articulaciones IFP y los ganglios de Heberden en las articulaciones IFD, se encuentran comúnmente en la OAm, como se observa en la **figura 2**.

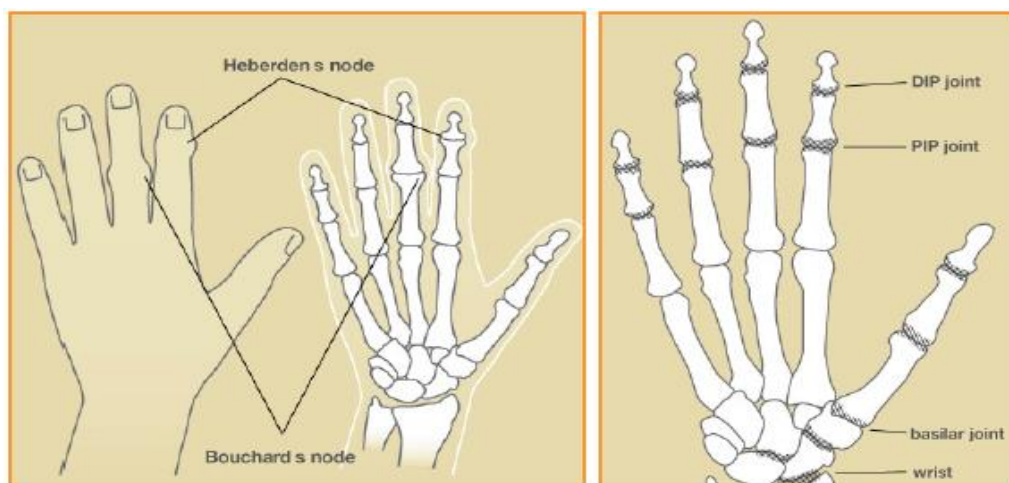


Figura 2. Tipos de nódulos y articulaciones (Artrosis De La Mano - Osteoarthritis, 2014)

Estos ganglios pueden ser dolorosos al inicio de la enfermedad (Gill Glass, 2006). Son marcadores clínicos útiles para el diagnóstico de OA de mano, especialmente cuando se utilizan en combinación con otras características de la enfermedad (Zhang, y otros, 2009).

1.2.1.- Diagnóstico diferencial de OA de mano

El diagnóstico diferencial para la OAm es amplio e incluye artritis psoriásica, artritis reumatoide, gota y hemocromatosis. Se deben considerar una combinación de características clínicas, como edad, sexo, distribución articular, hinchazón ósea, cambios radiográficos y hallazgos de laboratorio para llegar a un diagnóstico concluyente. La característica diferencial más notoria es la presencia de deformidad y tumefacción dura en los nódulos interfalángicos artrósicos, comparado con la tumefacción blanda de la sinovitis en la artritis. La distribución distal también es típica de la artrosis, aunque se da también en la artritis psoriásica (Zhang, y otros, 2009).

1.2.2.- Fenotipos de OAm: Artrosis Erosiva o Inflamatoria (OAE)

El término de artrosis erosiva o inflamatoria hace referencia a una forma de artrosis caracterizada por episodios agudos de inflamación y graves deformidades, que afecta fundamentalmente a las articulaciones interfalángicas de las manos. El adjetivo de erosiva describe las típicas erosiones de localización yuxtaarticular y/o intraarticular que caracterizan a la enfermedad (Resnick, 2001).

Ciertos autores han intentado definir la OAE como un tipo de artrosis de manos, con diagnóstico basado en los criterios del ACR de 1990, junto a: presencia de erosiones radiológicas en al menos dos articulaciones interfalángicas distales, ausencia de FR y de AACP, elevación de reactantes de fase aguda, e historia personal y familiar negativa para artropatías como la artritis psoriásica y las artritis provocadas por el depósito de microcristales, como se observa en la **tabla I** (Anandarajah, 2010).

La artrosis erosiva o inflamatoria afecta con mayor frecuencia al sexo femenino que al masculino (Ehrlich, 2001). Se trata de un tipo infrecuente de artrosis que aparece generalmente en mujeres de raza blanca en edad peri o postmenopáusica (40 – 50 años) (Banks, 2010).

Las articulaciones más afectadas desde un punto de vista erosivo son las IFD, seguidas, aunque con una frecuencia muy inferior, por las IFP. Las articulaciones MCF, raramente se ven erosionadas (Haugen, y otros, 2011).

Tabla I. Criterios de diagnóstico propuestos para la artrosis erosiva (Anandarajah, 2010)

Criterios de diagnóstico del ACR para la OA de mano erosiva.
<ul style="list-style-type: none">• Erosiones en al menos 2 articulaciones interfalángicas, una de las cuales debe ser una articulación IFD.
<ul style="list-style-type: none">• Factor reumatoide negativo y/o anticuerpo anti-proteína / anti-péptido citrulinado negativo.
<ul style="list-style-type: none">• Ausencia de antecedentes personales y familiares de artritis psoriásica.
<ul style="list-style-type: none">• Ausencia de antecedentes de gota y condrocalcinosis que afectan las manos.
<ul style="list-style-type: none">• Presencia de erosiones subcondrales centrales.
<ul style="list-style-type: none">• VSG normal (o casi normal).
<ul style="list-style-type: none">• Proteína C-reactiva de rango amplio normal (o casi normal).
<u>Nota:</u> Los primeros 2 puntos son esenciales para el diagnóstico de OAE. Los 3 últimos puntos indicarán la especificidad del diagnóstico.

1.3.- Biomarcadores

Una de las principales limitaciones en el diagnóstico de la OA es que ésta tiene una primera fase cuya duración se desconoce y en la que la enfermedad es clínicamente asintomática, pese a que ya ha generado daños metabólicos a nivel de tejido.

Con estas limitaciones que existen en el diagnóstico, en los últimos años se ha profundizado el interés por el estudio de biomarcadores que denoten cambios en la remodelación de la articulación y de esta manera nos permitan realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad, valorar el pronóstico de la misma y vigilar terapias alternativas y personalizadas por cada paciente (Lourido, 2015).

Los biomarcadores son moléculas que sirven como indicadores del estado fisiológico, así como de los cambios que se producen durante el proceso de una enfermedad y que desembocan en el desarrollo y establecimiento de un padecimiento. Los requisitos fundamentales de los biomarcadores son una alta especificidad y sensibilidad, como se describe en la **tabla II** (Kulasingam & Diamandis, 2008).

validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva

Tabla II. Requisitos fundamentales de un biomarcador ideal. Adaptado de (Dickie, 1994) y (Casal & Vivanco, 2014).

REQUISITOS DE UN BIOMARCADOR IDEAL			
Sensibilidad	Especificidad	Poder predictivo	Fácilmente detectable
Es la proporción de verdaderos positivos identificados correctamente por el biomarcador.	Es la proporción de verdaderos negativos que son correctamente identificados por el biomarcador.	Pronostica cambios y monitoriza diferentes fases de una enfermedad, para que sea verdaderamente útil debe superar el 80% del valor.	Requisito fundamental para ser utilizado en la práctica clínica, ser detectable en muestras rutinarias en un hospital.
↓	↓	↓	↓
Presencia de enfermedad	Ausencia de enfermedad	Seguimiento De enfermedad	Sangre – Fluido biológico

Respecto a la fácil detección en fluidos biológicos, una de las desventajas del uso del suero o plasma para la búsqueda y validación de biomarcadores es su elevado rango dinámico. Éste es debido a que posee proteínas muy abundantes que, en primera instancia, impiden la detección de proteínas en menor concentración como los biomarcadores, que suelen aparecer en cantidades muy bajas. Dada la elevada complejidad de enfermedades como la OA, hay que tener en cuenta todos los factores que pueden aumentar la variabilidad entre muestras, afectando la reproducibilidad de las mediciones, tales como: edad, sexo, índice de masa corporal, severidad de la enfermedad, entre otras (Matson, Baliog, & Reginato, 2010).

Los biomarcadores pueden ser moléculas biológicas como proteínas, metabolitos, carbohidratos y ácidos nucleicos. En este proyecto centraremos el estudio en marcadores proteicos (Chatterjee & Zetter, 2005). En este campo, el desarrollo de la proteómica ha abierto grandes expectativas para la identificación de biomarcadores con utilidad clínica. En el caso de la OA, los mejores biomarcadores son proteínas estructurales o fragmentos del cartílago, hueso o compartimento sinovial que reflejan cambios en el metabolismo o degradación de la articulación, y que pueden ser detectados en fluidos biológicos que se obtengan mediante estrategias no invasivas.

Las muestras utilizadas normalmente para el descubrimiento de nuevos biomarcadores en artrosis son: los condrocitos, el cartílago, las proteínas liberadas por el cartílago (o fracción denominada "secretoma"), el líquido sinovial, el suero y la orina (Kraus, y otros, 2011).

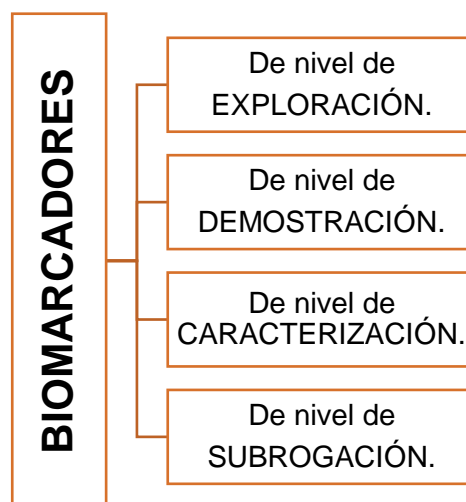
1.3.1 Clasificación de los biomarcadores

El hecho de que exista una clasificación de biomarcadores en OA permite abarcar información en las primeras etapas del desarrollo del biomarcador y facilitar el diseño de estudio de validación de marcadores potenciales (Kraus, y otros, 2011). Una de las ventajas más importantes es que esta clasificación permite el uso de un vocabulario común en todos los campos de estudio, respecto a los biomarcadores.

Existen dos sistemas prioritarios de clasificación de biomarcadores:

- a) Clasificación según los niveles de calificación de biomarcadores. Existen cuatro categorías, como se observa en la **tabla III**.

Tabla III. Clasificación de biomarcadores según niveles de calificación (Bauer, y otros, 2006)



- b) Sistema BIPEDS: que clasifica los principales tipos de biomarcadores en seis categorías y se detalla en la **tabla IV**.

Tabla IV. Clasificación de biomarcadores, BIPEDS (Bauer, y otros, 2006)

B	<ul style="list-style-type: none">• Burden (carga) de la enfermedad, evalúa la gravedad o extensión de la enfermedad, entre pacientes con OA, por tal motivo se lo considera útil para estadificación de la misma.
I	<ul style="list-style-type: none">• Investigación, es un biomarcador para el cual no hay información suficiente o evidencia acumulada para ser asignados a una categoría
P	<ul style="list-style-type: none">• Pronóstico, indica probabilidades de progresión de la enfermedad, tiene la capacidad de predecir el comienzo futuro de OA entre aquellos pacientes sin OA en un inicio del estudio.
E	<ul style="list-style-type: none">• Eficacia de la intervención, este biomarcador proporciona información sobre la eficacia del tratamiento en pacientes con OA o en individuos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad.
D	<ul style="list-style-type: none">• Diagnóstico, es un biomarcador que tiene la capacidad de catalogar a un sujeto como enfermo o no, puede clasificar un subtipo específico de la enfermedad, pero, no refleja la gravedad de ella.
S	<ul style="list-style-type: none">• Seguridad del sistema BIPED, aquellos biomarcadores que pueden emplearse en la aplicaciones preclínicas y clínicas; este umbral de seguridad puede ser diferente entre individuos.

1.3.2 Biomarcadores en OA de mano

El hallazgo de un biomarcador idóneo en OAm y su implementación en la práctica clínica, son herramientas sumamente útiles en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Estos biomarcadores podrían permitir la discriminación entre pacientes con OA erosiva y no erosiva, así como contribuir en el rastreo de individuos con mayor probabilidad de padecer esta enfermedad. En la **figura 3** se puede observar una representación gráfica de las principales moléculas y marcadores de inflamación propuestos actualmente como posibles biomarcadores de OAm.

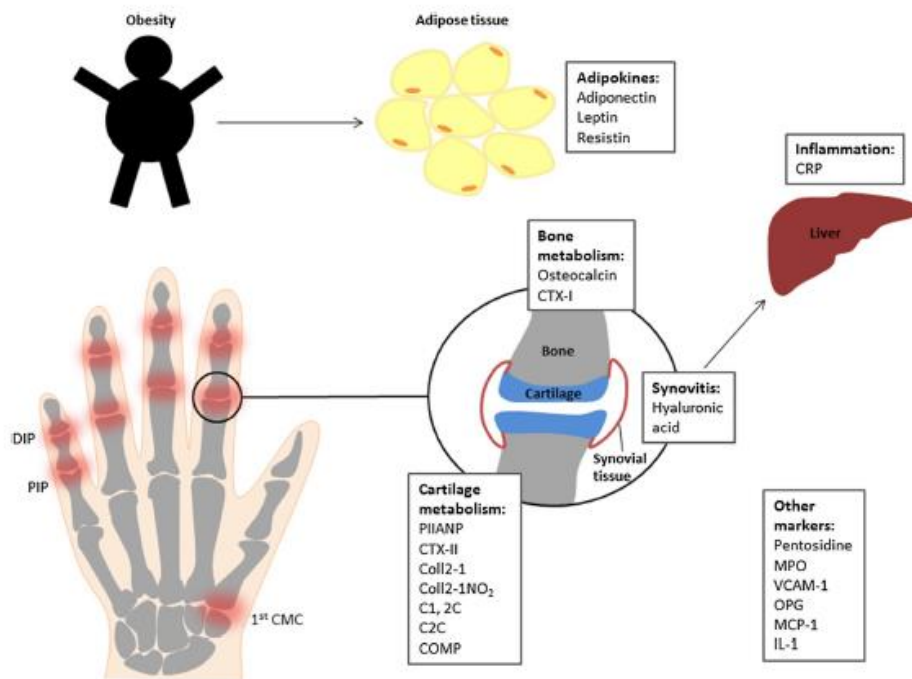


Figura 3. Biomarcadores en OA de mano (Lennerová, Pavelka, & Šenolt, 2017).

Existen otros tipos de biomarcadores cuya intervención en la OA de mano ha sido analizada. Dichas moléculas pueden ser determinadas en diferentes fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido sinovial u orina. En el **Anexo I** se clasifican dichos biomarcadores según su fuente de procedencia, tipo de muestra y categoría del biomarcador según los criterios BIPEDS (Lennerová, Pavelka, & Šenolt, 2017).

1.4.- Estrategias proteómicas para la identificación de biomarcadores de OA

La proteómica es la rama que estudia los proteomas, es decir, la identificación de las proteínas, el conocimiento de su estructura, la identificación de sus modificaciones postraduccionales, su localización y la cuantificación de la expresión proteica. El proteoma está formado de todas las proteínas que se expresan a partir del genoma de un organismo. Las proteínas son biomoléculas formadas por secuencias concretas de aminoácidos y son las encargadas de ejecutar las funciones encriptadas por el código genético.

El desarrollo de estrategias de diagnóstico temprano (antes del inicio de la enfermedad, o en fases aún asintomáticas) es actualmente uno de los focos principales de investigación en OA.

validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva

Las limitaciones en las pruebas de diagnóstico que se encuentran disponibles impulsan el interés en determinar nuevos marcadores biológicos específicos de degeneración del cartílago, que incurran tanto en favorecer el diagnóstico temprano de la degradación articular, como para reestablecer el pronóstico y evaluación de la enfermedad (Ruiz-Romero & Blanco, 2010). El descubrimiento de un biomarcador puede resumirse en un proceso compuesto por dos etapas fundamentales: una primera etapa de descubrimiento o **identificación**, en la que se reconocen las posibles moléculas o genes candidatos a convertirse en biomarcadores, y una fase de **validación** clínica del biomarcador obtenido en la fase previa. Entre ambas etapas pueden existir una serie de pasos intermedios cuyo objetivo es incrementar al máximo la utilidad del ensayo (Kurian, y otros, 2007).

Actualmente, existen nuevas estrategias para el descubrimiento y validación de biomarcadores, que incluyen tecnologías genómicas, proteómicas y metabolómicas. Una de las estrategias más utilizada en la actualidad es el análisis transcriptómico empleando microarrays de ADN, la cual identifica genes candidatos inmiscuidos posiblemente en la degradación del cartílago. La desventaja principal de esta técnica es que los niveles de expresión génica no vaticinan los niveles de proteínas, al contrario de lo que sucede con las técnicas de proteómica, cuya principal ventaja es que abordan el estudio sobre las moléculas funcionales de la célula, revelando así una imagen real de lo que está aconteciendo en el tejido.

Es importante manifestar que los niveles de expresión de todas las proteínas deparan un conjunto de datos únicos que caracterizan un sistema biológico. Por ello, la proteómica se ha convertido en una técnica enormemente valiosa para la investigación de biomarcadores. En este contexto, existen diferentes técnicas, unas basadas en la *spectrometría de masas* y por el otro las basadas en anticuerpos como son los *arrays* de proteínas, sobre los que centraremos nuestro estudio.

1.4.1.- Técnicas proteómicas basadas en *arrays* de proteínas

Un array de proteínas está formado por soportes (planos o tridimensionales) de distintos materiales, en los que anticuerpos o proteínas pueden inmovilizarse para capturar y cuantificar la presencia de proteínas específicas. Sus ventajas y desventajas se contemplan en la **tabla V** (Habb, Dunham, & Brown, 2001).

Tabla V. Ventajas y desventajas de los arrays de proteínas (Habb, Dunham, & Brown, 2001)

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Miniaturización	Pérdida de la funcionalidad de las proteínas
Automatización	Dificultad para la impresión de proteínas
No fraccionamiento de la muestra	Falta de anticuerpos específicos
Menor consumo de muestra	Deshidratación de las proteínas en el <i>array</i>
Alta sensibilidad y especificidad	Reactividad cruzada
Ensayos multiplex	Falsos positivos
Rapidez	Instrumentación muy específica

En los arrays de proteínas pueden inmovilizarse péptidos, proteínas o complejos proteicos. Podemos catalogar los arrays como un inmunoensayo en miniatura. Esta miniaturización favorece la disminución de costes.

Una de las ventajas fundamentales de la tecnología de arrays es su capacidad para medir cientos de proteínas simultáneamente usando pequeños volúmenes de muestras, de esta manera apoyando el contexto de su miniaturización. No obstante, pese a un avance significativo en esta técnica, existen algunas limitaciones, siendo uno de los principales inconvenientes mantener la estabilidad y funcionalidad de las proteínas inmovilizadas en el array. Sin embargo, en los últimos años han surgido arrays de proteínas sintetizados *in situ* que permiten sintetizar las proteínas justo en el momento de la ejecución del ensayo (Lourido, 2015). La alta versatilidad en el diseño ha conducido a múltiples formatos de los arrays, los mismos que están relacionados con los procesos de marcaje e hibridación. El método de detección es complementario al diseño del formato del array, al tipo de molécula de inmovilización, y a la superficie donde son inmovilizadas. Así, pueden ser *arrays planos* y *arrays en esferas* o también llamados *arrays en suspensión*.

a) En los **arrays planos**, la inmovilización de proteínas se produce sobre una superficie plana y sólida, de vidrio habitualmente. Los sistemas de impresión o “*printing*” de las proteínas en el array se pueden clasificar en dos grupos: el *printing de contacto*, que utiliza agujas que pulsan la superficie del array para la inmovilización de las proteínas y el *printing de inyección*,

validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva

que elabora gotas que contienen la muestra proteica, que se lanzan y se depositan en la superficie del array sin involucrar algún tipo de contacto (Chandra, Reddy, & Srivastava, 2011) (Lourido, 2015).

b) En los **arrays en formato esfera** o **arrays en suspensión**, se cubren superficies esféricas con el anticuerpo de captura que se une a la proteína, para posteriormente ser separadas e identificadas utilizando un sistema de tipo citometría de flujo gracias a los fluorocromos que se encuentran dentro de la esfera. Estas poblaciones de microesferas individuales actúan por tanto como soporte en el array (Pang, y otros, 2005).

Las técnicas de detección múltiple de alto rendimiento están diseñadas para el análisis rápido, sensible y específico de grandes cantidades de analitos en una sola muestra biológica. La tecnología **Luminex xMAP** (x= desconocidos y MAP= perfil de múltiples analitos) es la tecnología puntera para ensayos multiplex; se inventó a fines de la década de 1990, y desde ahí ha sido una plataforma que beneficia todos los avances en investigación.

1.4.1.1.- Clasificación de los arrays de proteínas

Generalmente se los clasifica de acuerdo a la característica de la proteína inmovilizada en la superficie del array, así tenemos dos tipos: arrays de antígenos y arrays de anticuerpos.

Los **arrays de antígenos** permiten realizar tanto ensayos analíticos para observar la abundancia de la proteína de interés en la muestra, así como también, ensayos funcionales para la detección de interacciones, modificaciones postraduccionales o actividad enzimática. Los antígenos que se inmovilizan en el array suelen ser proteínas completas o fragmentos proteicos. La inmovilización de los antígenos en el array, permite detectar los anticuerpos del propio antígeno. Dicha interacción se visibiliza a través del uso de un anticuerpo secundario conjugado con una etiqueta que facilite amplificar la señal de fluorescencia (Hu, Xie, Qian, Blackshaw, & Zhu, 2011).

Los **arrays de anticuerpos** son arrays analíticos cuya principal aplicación es la detección de proteínas diferencialmente expresadas y su abundancia. Al contrario de los arrays de antígenos, lo que se inmoviliza sobre la superficie sólida son los anticuerpos con el fin de detectar antígenos. Se clasifican en relación con el número de anticuerpos utilizados para detectar la proteína diana:

- Directos: Array basado en la utilización de un solo anticuerpo, la señal de la proteína se detecta mediante el marcaje de la muestra. Este marcaje puede ser *directo*, donde las proteínas se marcan con un fluorocromo tipo Cianina, normalmente; o indirecto en donde las proteínas son marcadas a través de moléculas intermedias como la Biotina o Digoxigenina con distinta especificidad que luego serán detectadas por un anticuerpo marcado con un fluorocromo. Este tipo de marcaje mejora significativamente la amplificación de señal (Casal, Microarrays de proteínas., 2014). Los arrays basados en el marcaje utilizando un solo anticuerpo permiten la incubación de dos muestras diferentes, cada una de ellas marcada con un fluorocromo distinto. Este tipo de arrays permite el uso de muestras control que son incubadas simultáneamente con la muestra a analizar. Su principal ventaja es que son *ensayos competitivos*, lo que conduce, a la mejora de la linealidad de la respuesta. La principal desventaja radica en la posible ruptura de la interacción del analito con el antígeno, por el marcaje, lo cual podría también limitar la detección, así como también la sensibilidad y especificidad del ensayo (Miller, y otros, 2003).
- Sándwich: en este tipo de ensayo se utilizan dos anticuerpos diferentes para detectar la proteína de interés. Se selecciona un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección marcado que dará lugar a la señal. De esta manera se incrementa la especificidad del ensayo, comparado con los arrays de marcaje con un solo anticuerpo. El reducido ruido de fondo de estos ensayos también incrementa la sensibilidad. Este formato sólo permite *ensayos no – competitivos*, ya que únicamente una muestra puede ser incubada sobre cada array. Esto resulta en curvas sigmoideas para evaluar la unión del antígeno al anticuerpo comparado con la linealidad de los arrays competitivos. Además, requiere de curvas de calibración utilizando estándares de concentración conocida. Los arrays tipo sándwich son más difíciles de desarrollar de manera múltiple ya que es necesario disponer de pares de anticuerpos y antígenos purificados específicos para cada diana, que en ciertas ocasiones no pudieran estar disponibles. La reactividad cruzada también puede incrementarse al incorporar una mayor cantidad de proteínas a determinar. En la **figura 4** se observan los diferentes tipos de arrays (Pang, y otros, 2005).

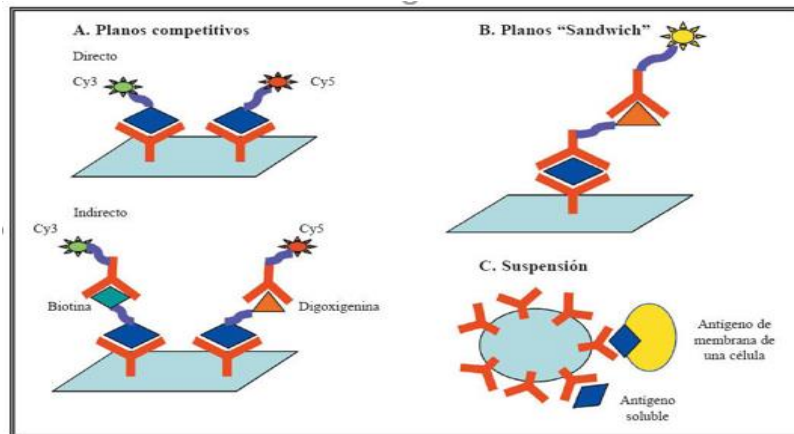


Figura 4. Formatos principales de arrays de anticuerpos (Angeloni, y otros, 2014)

1.4.1.2.- Aportación de la Proteómica a la OA

Sabemos que las proteínas se presentan como posibles biomarcadores de enfermedad, ya que, mediante la comparación de perfiles proteicos de individuos sanos y enfermos, se puede llegar a determinar las proteínas que están relacionadas con el curso de una patología, bien sea por su presencia, ausencia o mal funcionamiento. Las tecnologías englobadas dentro del campo de la proteómica, permiten analizar de forma simultánea la presencia de un elevado número de proteínas en una muestra, lo que ha proporcionado a la práctica clínica, nuevos biomarcadores. El Instituto de investigación Biomédica de A Coruña, desde la unidad de Proteómica del grupo de Reumatología, dirigida por el Dr. Francisco Blanco García y coordinada por la Dra. Cristina Ruiz Romero, trabajan constantemente en la búsqueda de Biomarcadores proteicos para el diagnóstico, pronóstico y estudio de respuesta terapéutica en Enfermedades Reumáticas. Los primeros trabajos realizados han permitido un avance en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad, así como la predicción de posibles biomarcadores proteicos útiles en el diagnóstico y tratamiento de la OA (Fernández-Puente, y otros, 2011).

La mayoría de las investigaciones en este campo, usan los métodos basados en espectrometría de masas (Fernández-Puente, y otros, 2017). Sin embargo, una herramienta de gran utilidad usada como alternativa y que presenta un campo de acción con gran aplicabilidad en clínica es el uso de microarrays de anticuerpos (De Ceuninck, Dassencourt, & Anract, 2004).

En el presente proyecto de investigación, utilizaremos la tecnología **xMAP de Luminex** para desarrollar un procedimiento metodológico que permita la validación de potenciales biomarcadores proteicos circulantes asociados a la **Artrosis de mano con fenotipo erosivo**.

validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva

2.- HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis Nula H (0)

Los diagnósticos de OA de mano erosiva no presentan asociación con las Citoquinas IL-1 beta, IL 6, IL 12, IL 17 y TNF alfa.

2.2 Hipótesis Alternativa

Los diagnósticos de OA de mano erosiva presentan asociación con las Citoquinas IL-1 beta, IL 6, IL 12, IL 17 y TNF alfa.

3.- OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto es la identificación de biomarcadores proteicos circulantes asociados a la artrosis de mano con fenotipo erosivo, empleando técnicas proteómicas basadas en arrays de proteínas.

Para lograr el objetivo general se han planteado los siguientes objetivos secundarios:

- Organizar una base de datos de pacientes con OA de mano.
- Desarrollar un sistema de microesferas para la detección y cuantificación de las siguientes citoquinas que han sido previamente relacionadas con el proceso artrósico, y pueden tener valor biomarcador de la enfermedad: IL-1 beta, IL 6, IL 12, IL 17 y TNF alfa.
- Analizar las muestras de sueros de la cohorte de pacientes con OA de mano (**PROCOAC**), usando la plataforma **Luminex xMAP**.
- Analizar los datos obtenidos y estudiar el grado de asociación entre los niveles de citoquinas y los distintos fenotipos de OAm.
- Crear modelos estadísticos combinando datos clínicos y moleculares que permitan un diagnóstico diferencial entre OAm erosiva y no erosiva.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

a) Diseño de estudio

Se realizará un desarrollo metodológico y su posterior aplicación para un estudio observacional de casos y controles sobre la cohorte PROCOAC.

b) Ámbito de estudio

El presente estudio se desarrollará en el área de Proteómica del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

El INIBIC es un Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) constituido por la Consellería de Sanidade, el Servicio Gallego de Salud (SERGAS), la Universidad de A Coruña (UDC) y la Fundación Profesor Novoa Santos. Tras un periodo de desarrollo de su actividad y mejora de sus procesos, obtuvo la acreditación como IIS por parte del Instituto de Salud Carlos III el 10 de marzo de 2015 para promover intercambio de conocimientos entre investigadores y grupos de investigación de distintos centros de la gerencia de gestión integrada de A Coruña (XXIAC).

c) Período de estudio

El periodo de estudio será de 1 año, comenzando en septiembre del 2020 hasta agosto del 2021.

d) Tamaño de la muestra

Considerando que en España el 7.73% de la población sufre de OA de mano (Blanco & et al., 2020), se estudiarán 200 participantes (OA erosiva y no erosiva). El tamaño de la muestra se estimó con un intervalo de confianza del 95% y una precisión ± 0.04 , suponiendo una proporción de asignación de 1.3 entre la OA de mano erosiva y no erosiva en toda la cohorte **PROCOAC** y un **AUC** de 0.7 para las 5 proteínas de estudio.

e) Selección de la muestra

La muestra que se usará para el presente proyecto de investigación será de la cohorte **PROCOAC**, cohorte prospectiva española para el estudio de la OA. Se trata de un tipo de cohorte dinámica ya que se siguen reclutando pacientes y por tal motivo se realizan seguimientos cada dos años, recogiendo datos demográficos, clínicos, analíticos y radiográficos.

Las muestras biológicas (sueros) de la cohorte **PROCOAC** pertenecen a la colección de muestras para la investigación de enfermedades reumatológicas del Servicio de Reumatología del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (**CHUAC**). Esta colección, creada bajo la responsabilidad del Dr. Francisco J. Blanco García, está autorizada por el Comité de Ética de Galicia, con Código Registro: 2013/107 e inscrita en el Registro Nacional de Biobancos, Sección de Colecciones, Código de Registro C.0000424. Cuenta en la actualidad con alrededor de 8000 muestras de suero de pacientes con distintas patologías reumáticas y controles sanos, de los cuales un promedio de 1300 muestras corresponde a OAm (Oreiro-Villar, y otros, Manuscrito en preparación, 2020).

Los criterios de inclusión de la mencionada cohorte son:

- Pacientes mayores de 55 años de edad atendidos en el Servicio de Urgencias por un cuadro de dolor abdominal y a los que se les realizó una radiografía simple de abdomen (incluidas ambas caderas).
- Pacientes con dolor a nivel de manos y con un diagnóstico de OA según los criterios de la ACR.
- Pacientes con dolor de rodilla y con un diagnóstico de OA radiográfica de rodilla siguiendo los criterios de la ACR.
- Pacientes con dolor en la cadera y con diagnóstico de OA radiográfica de cadera siguiendo los criterios de la ACR (Oreiro-Villar, y otros, Manuscrito en preparación, 2020).

4.1.- Procedimientos

4.1.1.- Constitución del grupo de trabajo

Coordinador: El presente proyecto de investigación estará bajo la coordinación de la señora Andrea Macías Cedeño, Licenciada en Laboratorio de Análisis Clínico, laboratorista con experiencia en análisis clínicos, tanto en su planificación como ejecución. Entre las tareas a desarrollar constarán las siguientes:

- Actividades de gestión: Realizar gestiones en los organismos legales competentes y de salud, coordinar los recursos económicos, contacto con los jefes de los distintos servicios y plataformas implicados.
- Coordinación con las plataformas de apoyo que participarán en el presente proyecto (Plataforma de Proteómica, Biobanco, Plataforma de Bioestadística).
- Creación de la base de datos y selección de las muestras (en colaboración con el Grupo de Reumatología y el Biobanco).
- Ejecución de los arrays desarrollados para el proyecto con las muestras seleccionadas (en colaboración con la Plataforma de Proteómica).
- Análisis de los resultados y datos obtenidos (en colaboración con la Plataforma de Bioestadística).
- Difusión de resultados: redacción de artículos científicos relacionados con el proyecto de investigación y participación en congresos o cualquier medio relacionado con la salud.

4.1.2.- Reunión informativa con los jefes de servicio y plataformas

Una vez obtenidos los permisos correspondientes, se solicitará una reunión de trabajo con la/el jefe y/o el/la coordinador/ora de las áreas de reumatología, proteómica, biobanco y bioestadística donde se llevará a cabo el presente proyecto.

4.1.3.- Selección de los participantes y firma de consentimiento informado

Como se mencionó anteriormente, los participantes serán seleccionados de la cohorte de pacientes **PROCOAC**. Esta cohorte forma parte de la Colección de muestras para la

validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva

investigación de Enfermedades Reumatológicas, autorizada por el Comité de Ética de Galicia con Código Registro: 2013/107 y que cuenta con el consentimiento informado respectivo de los pacientes reclutados (Oreiro-Villar, y otros, Manuscrito en preparación, 2020).

4.2.- Variables

Las variables de estudio para el procedimiento de recogida de datos, utilizadas en la descripción de la cohorte **PROCOAC**, son las siguientes:

- Historia clínica y cuestionario dirigido al paciente.
- Información demográfica y clínica, para completar el historial médico de los pacientes.
- Recogida de muestras biológicas para estudios de análisis generales, genéticos y/o serológicos que se consideren oportunos, incluidas radiografías de ambas manos, rodillas y caderas. (Oreiro-Villar, y otros, Manuscrito en preparación, 2020)

4.3.- Desarrollo de las técnicas Proteómicas

4.3.1.- Tecnología Luminex XMAP

Luminex Corporation desarrolla, fabrica y comercializa innovadoras tecnologías de pruebas diagnósticas con diversas aplicaciones, en diferentes campos de estudio. Una de sus tecnologías más relevantes es la tecnología **Luminex xMAP**, que posibilita el análisis simultáneo de múltiples analitos de la misma muestra, característica que la convierte en una técnica de elección en ámbitos de investigación y otros. Es la primera plataforma en usar microesferas teñidas diferencialmente (**Fig. 5**) para lograr múltiples perfiles para proteínas y ácidos nucleicos.

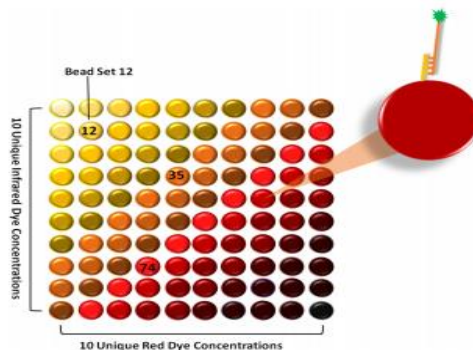


Figura 5. Tecnología Luminex xMAP. Basada en el marcaje interno de las microesferas con diferentes concentraciones de fluorocromos (Angeloni, y otros, 2014)

Esta tecnología cuenta con microesferas de poliestireno que definen el soporte del array (**Fig. 6**). Las microesferas están internamente teñidas con dos o tres marcadores fluorescente con una emisión espectral única para cada esfera, determinada por diferentes concentraciones de colorantes internos. Este conjunto de microesferas espectralmente distintas permite su posterior detección e identificación (**Fig. 5**). Las microesferas están recubiertas por grupos carboxilos que deber ser activados mediante la interacción de EDC y sulfo-NHS para que se genere la unión con el anticuerpo. Los anticuerpos de captura formarán mediante un producto intermedio, carbodiimide, un enlace covalente entre sus grupos amino y los grupos carboxilos activados en la superficie de la microesfera. (**Fig. 6**)

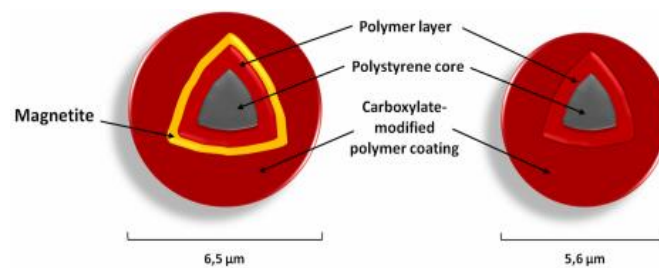


Figura 6. Composición de las microesferas. El núcleo de poliestireno, rodeado por una capa de polímero. La presentación magnética, tiene una capa adicional de magnetita dentro de la capa de polímero, por eso su tamaño es mayor (Angeloni, y otros, 2014).

Esta unión formada por la esfera y el anticuerpo debe ser constatada, debido a la unión aleatoria de los anticuerpos a los grupos aminos que se encuentran en la superficie de la microesfera. Puesto que hay una cantidad abundante de lisinas en los anticuerpos, se debe certificar que la cantidad suficiente de anticuerpos se haya asociado a la superficie de la esfera en una colocación que sea funcional para que se produzca con eficacia el inmunoensayo, **figura 7**.

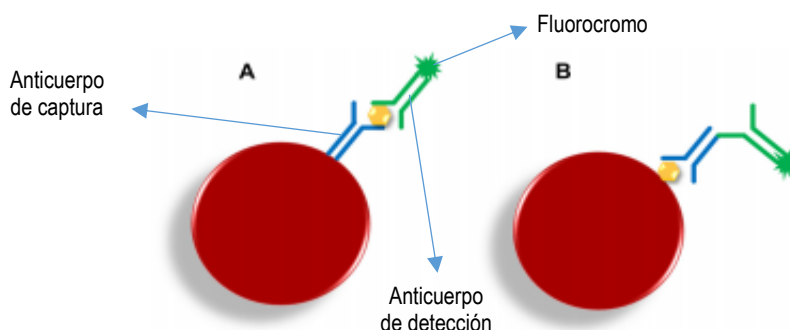


Figura 7. Principio de las esferas en un ensayo inmunológico. A) Captura Sándwich. B) Ensayo indirecto (Angeloni, y otros, 2014)

Un método para confirmar la eficacia de la unión del anticuerpo de captura a la esfera, se lleva a cabo a través de la incubación de las microesferas con un anticuerpo de detección anti-especie marcado con ficoeritrina (PE), como se observa en la **figura 8**, la misma que solo emitirá señal cuando se produzca eficientemente la unión del anticuerpo de detección al anticuerpo de captura. El correcto acoplamiento al menos generará una intensidad de fluorescencia media de 1000 MFI.

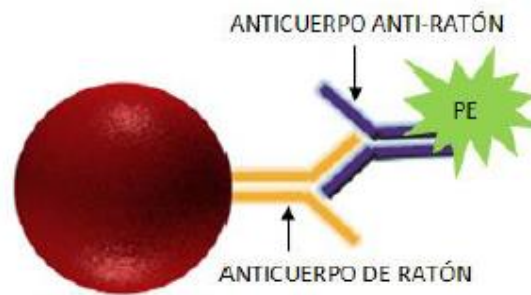


Figura 8. Esquematización de la confirmación del acoplamiento del anticuerpo de captura a la superficie de la esfera (Angeloni, y otros, 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, en el mercado se disponen de varios tipos de esferas. Para este proyecto utilizaremos microesferas magnéticas MagPlex. El uso de dichas microesferas ofrece la ventaja de mejorar la eficiencia del lavado debido a que en el momento de la separación magnética se produce la eliminación de aquellos componentes no deseados de la muestra, de esta manera mejoramos indiscutiblemente la reproducibilidad del método.

4.3.2.- Instrumento para la lectura

La lectura del inmunoensayo se lleva a cabo en equipo **MAGPIX**, es un instrumento sencillo que permite la multiplexación compacta de hasta 50 analitos diferentes en un solo volumen de reacción, realizando la lectura de una placa de 96 pocillos en una hora. Dispone de rutinas de mantenimientos autolimpiables y es compatible con las microesferas magnéticas **MagPlex**. De acuerdo a las instrucciones del proveedor en lo que se refiere al mantenimiento preventivo, cada vez se inicia el equipo se ejecuta una rutina de lavado con un líquido llamado *System initialitation* compuesto por agua, sosa 0.1N y etanol al 70%. Antes de apagar el equipo, se ejecuta otra rutina de lavado con agua y lejía al 20%, compuesto denominado *System shutdown*. Para casos de contaminación o retención de restos de esferas en el quipo existen otros tipos de

mantenimientos específicos que implican lavados más profundos para tratar de remover posibles contaminaciones.

4.3.3.- Mecanismo de detección de señal

El análisis de las cuentas es realizado por dos láseres. El láser LED rojo de 635 nm excita el fluorocromo interno de las microesferas, identificando el perfil de emisión espectral clasificándola en una población específica. Si el analito de interés está presente el láser LED verde de 525 nm reconoce el reportero fluorescente unido al analito de captura en la superficie de las microesferas.

Como en el presente proyecto realizaremos un inmunoensayo tipo sándwich, una vez se dé la incubación de las esferas acopladas al anticuerpo de captura con la muestra biológica, se añade un anticuerpo de detección marcado con biotina, razón por la cual se amplificará la señal con el sistema ficoeritrina-estreptavidina (SAPE), **figura 9**.

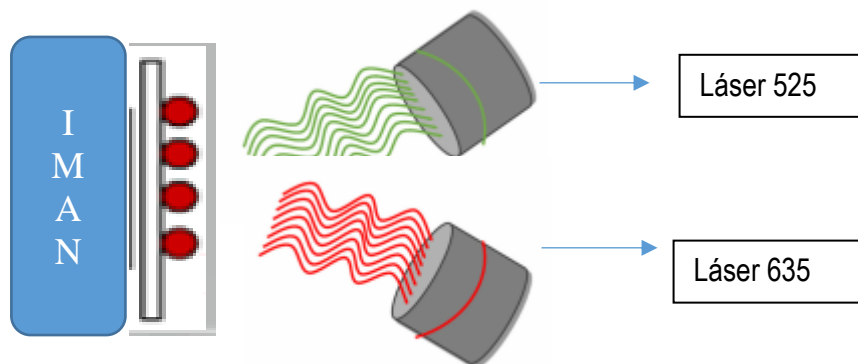


Figura 9. Representación del sistema de detección del equipo MAGPIX. Adaptada de (Angeloni, y otros, 2014)

4.3.4.- Protocolos para ejecución de las técnicas

Los siguientes protocolos son los propuestos para el presente proyecto en base a las tecnologías a utilizar. Debido a que se trabajará con microesferas magnéticas, es indispensable realizar todos los lavados sobre soportes especiales imantados para tubos o placas (**Fig. 10**).

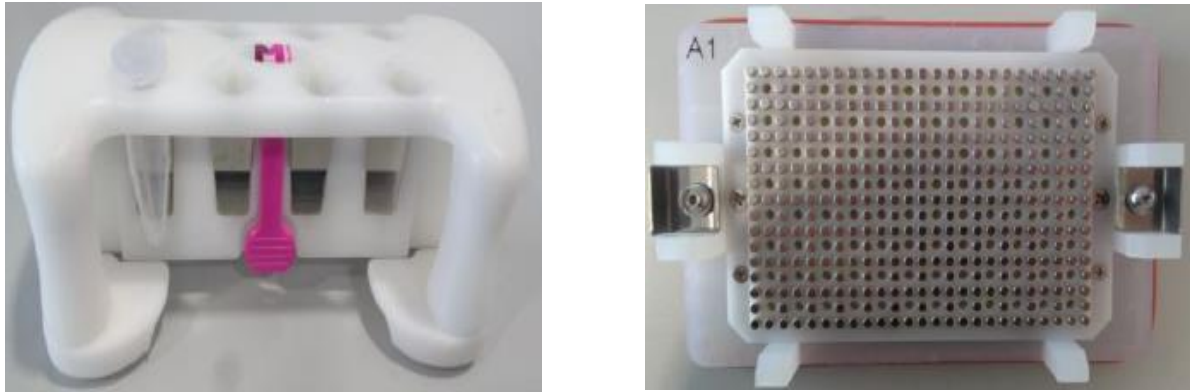


Figura 10. Soportes imantados. A la derecha, soporte imantado para lavados de placas de 96 pocillos. A la izquierda, soporte imantado para lavado de tubos, tipo eppendorf (Lourido, 2015).

4.3.5.- Activación de las microesferas

Activación basada en la actuación de EDC y sulfo-NHS, ambos fácilmente hidrolizables, motivo por el cual es indispensable la rápida añadidura de la solución activadora a las esferas. Se activarán 7 poblaciones de esferas diferentes para las cinco proteínas de interés (IL1beta, IL6, IL12, IL17, TNF alfa) y dos controles negativos (*bare bead*, esferas activadas sin anticuerpos, e IgG de ratón).

Pasos a seguir:

- Añadir a un eppendorf $5 \cdot 10^5$ esferas (*beads*) de cada región. Colocar el eppendorf en el imán para poder retirar el tampón de almacenaje (PBS, 1% BSA, 0.05% NaN_3 , pH 7.4).
- Retirar el eppendorf del imán y lavar las esferas con 80 μl del tampón de activación (0.1M NaH_2PO_4 , pH 6.2). Retirar el tampón en el imán y añadir de nuevo 50 μl de tampón de activación. Guardar en oscuridad hasta su uso.
- Preparar la solución de activación a una concentración final de 10 mg/ml en un volumen final de 50 μl . Para esto, pesar 50 mg de NHS y 50 mg de EDC, colocar en un matraz y enrasar a un volumen final de 50 μl con el tampón de activación.
- Añadir 50 μl de la solución de activación a los 50 μl del tampón de activación donde están preparadas las *beads*.
- Incubar durante 20 minutos en agitación a temperatura ambiente.

4.3.6.- Acoplar el anticuerpo de captura a una población de microesferas.

Después de la activación de las esferas, se debe añadir la cantidad de anticuerpo de captura que se desee acoplar, generalmente 1.6 µg. Se emplearán preferentemente anticuerpos monoclonales de ratón frente a: IL1beta, IL6, IL12, IL17, TNF alfa humanas e IgG de ratón.

Para este fin, debemos realizar los siguientes pasos:

- Hacer dos lavados con 100 µl de tampón de acoplamiento (50 mM Ácido 2-N-MES, pH 5), asegurándose de eliminarlo todo antes de adicionar el anticuerpo.
- Añadir 1.6 µg de anticuerpo de captura diluido en tampón de ensayo (PBS-TWEEN al 0.05%) hasta un volumen final de 100 µl. Incubar 2 horas en agitación a temperatura ambiente.
- Realizar un lavado con 100 µl de tampón de lavado (PBS-TWEEN al 0.05%). Conservar en 50 µl de tampón de bloqueo (PBS, 0.1% BSA, 0.02% TWEEN-20, 0.05% NaN₃, pH 7.4). Mantener en oscuridad entre 2°C y 8°C.

4.3.7.- Verificar el acoplamiento

Además de utilizar para este fin un anticuerpo de detección anti ratón marcado con estreptavidina, se adiciona también un control negativo en el que se reemplaza el anticuerpo de detección por PBS-TWEEN 0.05%. Todas las condiciones se realizan por triplicado.

Pasos a seguir:

- Las esferas acopladas se preparan a una dilución de 1:50 en tampón de bloqueo. Sonicar las esferas durante 2 minutos antes de su uso.
- Preparar el anticuerpo de detección a una dilución de 1:1000 en PBS-TWEEN 0.05%.
- Añadir a cada pocillo de la placa 5 µl de la dilución de esferas (103 esferas) y 50 µl del anticuerpo de detección, en el caso del control negativo antes mencionado, se reemplazan las 50 µl de la dilución del anticuerpo de detección por PBS-TWEEN 0.05%. Incubar durante 20 minutos en agitación y oscuridad.
- Lavar 3 veces con 100 µl de tampón de lavado.
- Añadir 100 µl de PBS-TWEEN 0.05% y leer en el equipo **MAGPIX**.

4.3.8.- Inmunoensayo de tipo sándwich

Para llevar a cabo una cuantificación absoluta se necesita crear una curva estándar de concentraciones conocidas con las proteínas recombinantes para extrapolar los resultados obtenidos en las muestras biológicas analizadas. En este tipo de ensayo se incorporan como controles negativos una región de esferas que han sido activadas, pero a las que no se les ha acoplado ningún anticuerpo (bare beads) y otra región de esferas acopladas con anticuerpo anti-IgG de ratón.

Para ello:

- Preparar una dilución 1:50 con todas las regiones de esfera que se desee analizar simultáneamente en tampón de bloqueo. Sonicar durante 2 minutos las esferas. Añadir 5 µl de esta dilución a cada pocillo (10^3 esferas de cada región).
- Preparar cada punto de la curva estándar en un volumen final de 45 µl.
- Añadir 45 µl de suero en una dilución oportuna, a cada pocillo.
- Incubar la placa durante 2h y 30 minutos en agitación y oscuridad a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con 100 µl de tampón de lavado.
- Añadir el anticuerpo de detección Biotinilado (uno para cada proteína que se quiera detectar, preferiblemente policlonal) a cada pocillo en un volumen final de 45 µl. La concentración óptima de anticuerpo de detección debe ser ajustada, generalmente a 1 µg/ml. Incubar la placa durante 1 hora en agitación y oscuridad a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con 100 µl de tampón de lavado. Añadir 50 µl de SAPE a una dilución de 1:1000 en PBS-TWEEN 0.05%. Incubar la placa durante 20 minutos en agitación y oscuridad a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con 100 µl de tampón de lavado.
- Añadir 100 µl a cada pocillo de PBS-TWEEN 0.05%.
- Introducir la placa en el equipo **MAGPIX** para leer la fluorescencia.

Una vez completado el proceso, para la lectura de los resultados, el analizador usa el software **xPONENT**. Luego los datos se exportan al programa estadístico **GraphPad**.

4.4.- Limitaciones del estudio

Sesgo de selección:

Es derivado de la selección de sujetos para el estudio. Al momento de la selección de la muestra podría existir la posibilidad que un posible participante no cumpla los criterios de inclusión mencionados y desconozca sus antecedentes patológicos personales, confundiendo involuntariamente la OAm con otro tipo de enfermedad infamatoria.

Sesgo de información

Se derivan de la forma en que son obtenidos los datos durante el estudio. Este sesgo de información radica en que los pacientes seleccionados para este proyecto derivan de una cohorte de pacientes cuyas características, variables, criterios, etc, no serán verificados durante la planificación del proyecto. Las muestras biológicas y datos clínicos que se emplearán en este proyecto se encuentran ya recogidos en la base de datos SIMON, del Hospital Universitario A Coruña.

Sesgo de confusión

Pueden ser derivados de la existencia de variables no consideradas en el estudio. Se realizará un análisis multivariado de regresión múltiple para ajustar por todas las posibles variables de confusión.

4.5.- Análisis de datos

Para analizar los datos se utilizará el paquete estadístico R-Commander y el paquete estadístico SPSS. En este análisis se ofrecerá:

- La descripción de las variables cuantitativas: Media (M), Desviación típica, Desviación Estándar (DE) y Rango.
- La descripción de las variables ordinales: frecuencias totales y porcentajes.
- La comparación de las variables cualitativas: test T de Student para las muestras relacionadas; si no es una variable normal U de Mann Whitney.

- La comparación de las variables ordinales: tablas de contingencia, aplicando como estadístico el X^2 de Pearson.
- Un análisis multivariante, mediante regresión logística, ajustado por las variables de confusión, para evitar problemas de multicolinealidad.
- Un análisis de las métricas de los biomarcadores analizados: especificidad, sensibilidad, área bajo la curva y valores predictivos.

5.- PLAN DE TRABAJO

El proyecto tendrá una duración total de 1 año. El desarrollo del proyecto se llevará a cabo siguiendo los tiempos que se describen a continuación:

Tabla VI. Plan de trabajo previsto.

ACTIVIDADES	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
Solicitudes de permisos.												
Reunión informativa con coordinadores y diferentes plataformas (Biobanco, bioestadística)												
Selección de muestras, crear base de datos. Coordinación con plataforma biobanco												
Desarrollo de los arrays Luminex												
Ejecución de los ensayos arrays Luminex												
Seguimiento de los resultados												
Análisis de los resultados												
Redacción de los resultados												
Difusión de resultados												

6.- ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio se llevará a cabo siguiendo los principios éticos marcados por las pautas internacionales que a continuación se presentan.

Se seguirán los principios éticos para la investigación médica en seres humanos recogidos en la Declaración de Helsinki de 1964 y en Convenio de Oviedo relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina, así como la normativa sobre la protección de datos personales.

Asimismo, se solicitarán los permisos correspondientes para la realización del trabajo:

validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva

- DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN (CEI) de A Coruña-Ferrol: es el órgano competente y el encargado de la valoración ética, metodológica y legal de los estudios de investigación con seres humanos, su material biológico o sus datos de carácter personal que tienen lugar en el Área Sanitaria de Ferrol y de A Coruña. (**Anexo II**).
- PERMISO AL RESPONSABLE DE LA COHORTE **PROCOAC** DEL SERVICIO DE REUMATOLOGÍA DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE A CORUÑA: debido a que la selección de muestras se realizará a partir de dicha cohorte, se ha de solicitar el uso de la misma al Dr. Francisco Blanco García, responsable de la colección y tutor de este TFM (**Anexo III**).

7.- APLICABILIDAD

En la actualidad, los cambios sociodemográficos y cambios en los hábitos de vida en la población de España, han inclinado a profundizar el estudio de las enfermedades reumáticas, dentro de ellas, la OA de mano, una enfermedad que en ciertas circunstancias resulta altamente incapacitante para quienes la padecen.

Una vez obtenidos los resultados del presente trabajo, podría tener las siguientes aplicaciones:

- Crear una base de datos de potenciales biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad, así como para su seguimiento y pronóstico.
- Proponer un perfil sérico de biomarcadores disponibles para el campo médico, con el que se identificarán a pacientes en estadios tempranos de la enfermedad. Esto beneficiará directamente al paciente debido a que, por lo general, cuando éste llega a la consulta, la enfermedad ya está muy avanzada, situación causada por las actuales limitaciones del diagnóstico.
- Generar modelos estadísticos útiles para mejorar el diagnóstico, pronóstico y monitorización del fenotipo erosivo de OAm, basados en la medición de biomarcadores moleculares y su combinación con variables clínicas.

8.- DIFUSIÓN DE RESULTADOS

8.1.- Colectivos de interés

Los resultados obtenidos serán de interés para profesionales sanitarios implicados en las especialidades de Atención Primaria de Salud, Medicina Interna y Reumatología.

- El colectivo médico mencionado de Atención Primaria de Salud, Medicina Interna y Reumatología, intervienen en el diagnóstico y tratamiento de un alto número de enfermedades reumáticas. Por ello consideramos fundamental hacer llegar estos resultados a los profesionales implicados.

8.2.- Estrategias de difusión

Con lo antes mencionado, una vez obtenidos los resultados del presente estudio de investigación, se divulgarán a través de revistas nacionales e internacionales de las especialidades citadas; del mismo modo se difundirán los resultados en congresos y jornadas por medio de formatos de comunicación tipo poster.

Publicación en revistas científicas: para la selección de las revistas, y con el fin de dar la mayor visibilidad posible a nuestro estudio hemos tenido en cuenta dos criterios.

A) Factor de impacto/Cuartil.

B) Algunas de ellas son revistas de jerarquía en el territorio español y son descritas en castellano con acceso abierto para la lectura y conocimiento científico. Se detalla a continuación el nombre de las revistas, su factor de impacto y cuartil según datos del **JCR** (Journal Citation Reports 2018).

Tabla VII. Difusión de resultados a través de revistas científicas y cuartil JCR

Revista	Factor de Impacto	Cuartil
Nature Reviews Rheumatology	18.545	Q.1
Rheumatology	5.149	Q.1
Journal of Rheumatology	3634	Q.1
Revista Clínica Española	1.043	Q.4
Revista Atención Primaria	1.148	Q.3
Revista Española de Reumatología	ND	ND

Congresos científicos: con el fin de llegar a los colectivos mencionados, se presentarán los resultados de nuestro estudio en los congresos que a continuación se detallan:

Tabla VIII. Difusión de resultados a través de congresos científicos.

<p>Congresos nacionales</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna. Santiago de Compostela. Pendiente de fecha de publicación. • Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología. Madrid. Pendiente de fecha de publicación. • Congreso Nacional de la Sociedad Gallega de Medicina Interna. Santiago de Compostela. Pendiente de fecha de publicación
<p>Congresos internacionales</p>	<ul style="list-style-type: none"> • EULAR. European Congress of Rheumatology. Frankfurt. Pendiente de fecha de publicación. • American College of Rheumatology. ACR. Washington DC. Pendiente de fecha de publicación.

En este proyecto se plantean también diferentes acciones de comunicación y diseminación de sus avances y resultados dirigidas al público general: organizaciones de charlas divulgativa y talleres informativos en centros socio-culturales, encuentros en los que se promueva la interacción bilateral investigador-paciente y también visitas presenciales de pacientes al centro de investigación con el objetivo de fomentar la Participación de Pacientes en la Investigación.

9.- FINANCIACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

9.1.- Infraestructura necesaria

El proyecto se realizará íntegramente en el INIBIC (Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña). Este centro cuenta con la infraestructura necesaria para la realización de todo el proyecto. Además, el grupo de investigación de Reumatología participa en la red nacional de Proteómica (ProteoRed-PRB3/ISCIII), y por lo tanto cuenta con respaldo altamente especializado en el área de Proteómica.

En concreto, y en relación con las técnicas que se van a realizar, se dispone de:

validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva

- 1) Infraestructura para el almacenamiento y procesamiento de muestras biológicas (neveras, congeladores de -20°C y -80°C, centrífugas y micro centrífugas refrigeradas, contenedores de nitrógeno líquido, micropipetas). Instalaciones del Biobanco de A Coruña (subcontratación dentro del proyecto).
- 2) Equipos de proteómica: la Plataforma de Proteómica del INIBIC (www.inibic.com/inv_apoyo_proteomica.html), posee la infraestructura necesaria para la realización de todo tipo de técnicas en esta área. Para la realización de este proyecto en concreto dispone de un de placas de ensayos múltiple MagPix (Luminex Corporation), así como de lector de placas de ELISA.
- 3) Otros equipos disponibles para su utilización en el desarrollo del proyecto: balanzas, incubadores, espectrofotómetro para cuantificación de proteínas, equipo de digitalización de imágenes de quimioluminiscencia y fluorescencia.
- 4) Los análisis estadísticos se realizarán en colaboración con la Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística del INIBIC (subcontratación dentro del proyecto). Se trata de una unidad de apoyo a la investigación que proporciona asesoramiento metodológico y estadístico a los grupos de investigación del INIBIC, grupos externos, hospitales y empresas. Cuenta con los recursos humanos, software e infraestructuras necesarios para la realización de análisis estadísticos de datos a gran escala.

9.2.- Fungibles necesarios

- a) Material plástico para el almacenamiento y procesamiento de muestras: tubos, puntas de pipeta, placas multipocillos, etc.
- b) Material necesario para el desarrollo de los ensayos Luminex: anticuerpos, proteínas estándar, poblaciones de microesferas magnéticas para cada proteína a cuantificar y controles.
- c) Reactivos para el funcionamiento del MagPix: Drive Fluid, kits de calibración y verificación.

9.3. Otros gastos necesarios para la realización del proyecto

- a) Subcontratación de servicios:
 - Biobanco del CHUAC, en concepto de gestión y almacenamiento de muestras, asesoramiento legal y ético para el establecimiento de colecciones.

- Plataforma de Bioestadística del INIBIC, para el análisis estadístico de los resultados.
 - Plataforma de Bioinformática del INIBIC, para el desarrollo de los algoritmos para el diagnóstico y seguimiento de la OAm en base al perfil de citoquinas.
- b) Gastos derivados de la publicación de los resultados en revistas científicas de acceso libre.

9.4 Presupuesto

Tabla IX. Presupuesto del proyecto de investigación.

PRESUPUESTO DE PROYECTO			
Recursos y materiales	Cantidad	Costo unitario	Subtotal
Inventariable	0	0	0
Fungible			
Anticuerpos	10	450	4500€
Proteínas estándar	5	400	2000€
Microesferas magnéticas	7	600	4200€
Material funcionamiento MagPix (Drive fluid, Kits de calibración y verificación)	1	1500	1500€
Material plástico (tubos, puntas de pipeta, placas...)	Estimado para el análisis de toda la cohorte	750	750€
Subcontración de servicios			
Biobanco (almacenamiento de muestras)		500	500€
Plataforma de Bioestadística		750	750€
Plataforma de Bioinformática		750	750€
Publicación y difusión de resultados		2500	2500€
		Total	17.450€

10.- BIBLIOGRAFÍA

- Anandarajah, A. (2010). Erosive Osteoarthritis. *Discovery Medicine*(48), 468-477.
- Angeloni, S., Cordes, R., Dunbar, S., Garcia, C., Gibson, G., Martin, C., & Stone, V. (2014). *xMAP® Cookbook. A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP Technology.* (Segunda ed.). (L. Corporation, Ed.)
- Arden, N., & Nevitt, M. C. (2006). Osteoarthritis: Epidemiology. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*(20), 3-25.
- Artrosis De La Mano - Osteoarthritis.* (2014). Recuperado el 1 de 06 de 2020, de American Society For Surgery of the Hand: <http://www.HandCare.org>
- Banks, S. E. (2010). Erosive osteoarthritis: a current review of a clinical challenge. *Clinical Rheumatology*(29), 697-706.
- Bauer, D. C., Hunter, D. J., Abramson, S. B., Atturx, M., Corr, M., Felson, D., . . . Kraus, B. V. (2006). Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis and Cartilage*(14).
- Belmonte-Serrano, M. A., Beltrán-Fabregat, J., & Lerma-Garrido, J. (2005). Artrosis. Hospital General Castellón.
- Blanco, F. J. (2018). Osteoarthritis and atherosclerosis in joint disease. *Reumatología Clínica*(14), 251-253.
- Blanco, F. J., & et al. (2020). Prevalencia de artrosis sintomática en España: Estudio EPISER2016. *Reumatología Clínica*(16), 90-96.
- Blanco, F. J., Vázquez-Martul, E., De Toro, F. J., Galdo, F., & Guitian, R. (1998). Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. *Arthritis & Rheumatism.*(2), 284-289.
- Busija, L., Bridgett, L., Williams, S. R., Osborne, R. H., Buchbinder, R., March, L., & Fransen, M. (2010). Osteoarthritis. Best practice & research. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology.*(6), 757-768.
- Casal, J. L. (2014). Microarrays de proteínas. En F. Corrales, & J. J. Calvete (Edits.), *Manual de proteómica* (págs. 687-700).
- Casal, J. L., & Vivanco, F. (2014). Proteómica clínica. Biomarcadores y dianas terapéuticas. *Manual de proteómica . SEPRO*(9), 583-601.
- Chandra, H., Reddy, P. J., & Srivastava, S. (2011). Protein microarrays and novel detection platforms. *Expert Reviews.*(8), 61-79.

- Chatterjee, S. K., & Zetter, B. R. (2005). Chatterjee SK, Zetter BR. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Medicine. Future Oncology*(1), 37-50.
- De Ceuninck, F., Dassencourt, L., & Anract, P. (2004). The inflammatory side of human chondrocytes unveiled by antibody microarrays. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.(323), 960-969.
- Dickie, G. L. (1994). Statistical notes. Defining sensitivity and specificity. *BMJ Journal*(309), 509.
- Dunbar, S. A., & Li, D. (2010). Introduction to Luminex[®] xMAP[®] Technology and Applications for Biological Analysis in China. *Asia Biotech*.(14), 26-30.
- Edwards, B. S., Oprea, T., Prossnitz, E. R., & Sklar, L. A. (2004). Flow cytometry for high-throughput, high-content screening. *Current Opinion in Chemical Biology*(8), 392-398.
- Ehrlich, G. E. (2001). Erosive Osteoarthritis: Presentation, Clinical Pearls, and Therapy. *Current Rheumatology reports*(6), 484-488.
- Fernández-Puente, P., Calamia, V., González-Rodríguez, L., Lourido, L., Camacho-Encina, M., Oreiro, N., . . . Blanco, F. J. (2017). Multiplexed mass spectrometry monitoring of biomarker candidates for osteoarthritis. *Journal of Proteomics*(152), 216-225.
- Fernández-Puente, P., Mateos, J., Fernández, C., Oreiro, N., Ruiz-Romero, C., & Blanco, F. J. (2011). Identification of a panel of novel serum osteoarthritis biomarkers. *Journal of Proteome Research*.(10), 5095-5101.
- Gill Glass, G. (2006). Osteoarthritis. *Disease-a-Month*(52), 343-362.
- Glimm, A. M., Werner, S. G., Burmester, G. R., Backhaus, M., & Ohrndorf, S. (2016). Analysis of distribution and severity of inflammation in patients with osteoarthritis compared to rheumatoid arthritis by ICG-enhanced fluorescence optical imaging and musculoskeletal ultrasound: a pilot study. *Clinical and epidemiological research*(75), 566-570.
- Habb, B. B., Dunham, M. J., & Brown, P. O. (2001). Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biology*.(2), 1-13.
- Haugen, I. K., Englund, M., Aliabadi, P., Niu, J., Clancy, M., Kvien, T. K., & Felson, D. T. (2011). Prevalence, incidence and progression of hand osteoarthritis in the general population: the Framingham Osteoarthritis Study. *Annals of the rheumatic diseases*(9), 1581-1586.

- Hu, S., Xie, Z., Qian, J., Blackshaw, S., & Zhu, H. (2011). Functional protein microarray technology. *Systems biology and medicine*(3), 255-268.
- Kloppenburg, M., & kwok, W. Y. (2012). Hand osteoarthritis—a heterogeneous disorder. *Natures Reviews Rheumatology*(8), 22-31.
- Kraus, V. B., Burnett, B., Coindreau, J., Cottrell, S., Eyre, D., Gendreau, M., . . . Todman, M. (2011). Application of Biomarkers in the Development of Drugs Intended for the Treatment of Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society*(19), 515-542.
- Kulasingam, V., & Diamandis, E. P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature reviews clinical oncology*(5), 588-599.
- Kurian, S., Grigoryev, Y., Head, S., Campbell, D., Mondala, T., & Salomon, D. R. (2007). Applying genomics to organ transplantation medicine in both discovery and validation of biomarkers. *International Immunopharmacology*(7), 1948-1960.
- Lennerová, T., Pavelka, K., & Šenolt, L. (2017). Biomarkers of hand osteoarthritis. *Rheumatology International*(2).
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R., & Goldring, M. B. (2012). Osteoarthritis: A disease of the joint as an Organ. *Arthritis Reumatology*(6), 1697-1707.
- López-Armada, M. J., Carames, B., Cillero-Pastor, B., & Blanco-García, F. J. (2004). Physiopathology of asthrosis: what is the state of tha art? *Revista Española de Reumatología*(6), 379-393.
- Lourido, L. (2015). Búsqueda de biomarcadores de artrosis mediante técnicas proteómica. En *Tesis doctoral*.
- Matson, E., Baliog, C., & Reginato, A. M. (2010). Papel de los biomarcadores en la artrosis. En A. Alcocer (Ed.), *Artrosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. (págs. 327-353). Médica Panamericana.
- Miller, J. C., Zhou, H., Kwekel, J., Cavallo, R., Burke, J., Butler, E. B., & Teh, B. S. (2003). Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potencial biomarkers. *Proteomics. Proteomics and systems biology*(3), 56-63.
- Neuprez, A., Bruyère, O., Maheu, E., Dardenne, N., Burlet, N., D´Hooghe, P., . . . Reginster, J.-Y. (2015). Aesthetic discomfort in hand osteoarthritis: results from the LIège Hand Osteoarthritis Cohort (LIHOC). *Arthritis Research & Therapy*(17), 2-6.

- Oreiro-Villar, N., Raga, A. C., Rego-Pérez, I., Pértega, S., Silva-Díaz, M., Freire, M., . . . Blanco, F. J. (s.f.). Descripción de la Cohorte PROCOAC (PROspective COhort of A Coruña): Cohorte Prospectiva Española para el estudio de la Osteoartritis. *Reumatología Clínica*.
- Pang, S., Smith, J., Onley, D., Reeve, J., Walker, M., & Foy, C. (2005). A comparability study of the emerging protein array platforms with established ELISA procedures. *Journal of Immunological Methods*,(302), 1-12.
- Resnick, D. (2001). Huesos y articulaciones en imágenes radiológicas. En D. Resnick (Ed.). Madrid: Marbán.
- Rúa-Figueroa, I. (2014). *Manual SER de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas*. (Primera ed.). (J. Calvo Alén, M. J. Cuadrado Lozano, M. M. Freire González, V. M. Martínez-Toboada, S. Muñoz Fernández, & E. Úcar Angulo, Edits.) Madrid: Elsevier España.
- Ruiz-Romero, C., & Blanco, F. J. (2010). Proteomics role in the search for improved diagnosis, prognosis and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*(18), 500-509.
- Ruiz-Romero, C., Fernández-Puente, P., Calamia, V., & Blanco, F. (2015). Lessons from the proteomic study of osteoarthritis. *Expert Rev Proteomics*,(12), 1-11.
- SER, S. E. (2010). *Artrosis* (Primera ed.). (P. Benito-Ruiz, F. J. Blanco-García, J. Tornero-Molina, I. Moller-Perera, J. Monfort-Faure, & E. Batlle-Gualda, Edits.) España: Editorial Médica Panamericana.
- Smith, D., Braunstein, E. M., Brandt, K. D., & Katz, B. P. (1992). A Radiographic Comparison of Erosive Osteoarthritis and Idiopathic Nodal Osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*(6), 896-904.
- Wojdasiewicz, P., Poniatowski, A., & Szukiewicz, D. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*(2014), 1-19.
- Wolski, M., Podsiadlo, P., Stachowiak, G. W., Englund, M., & Haugen, I. K. (2018). Trabecular bone texture detected by plain radiography is associated with MRI-defined osteophytes in finger joints of women without radiographic osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*(26), 924-928.
- Zhang, W., Doherty, M., Leeb, B. F., Alekseeva, L., Arden, N. K., Bijlsma, J. W., . . . Zimmermann-Gorska. (2009). EULAR evidence-based recommendations for the

diagnosis of hand osteoarthritis: report of a task force of ESCISIT. *Annals of the Rheumatic Diseases*(68), 8-17.

Zhang, Y., Niu, J., Kelly-Hayes, M., Chaisson, C. E., Aliabadi, P., & Felson, D. T. (2002). Prevalence of Symptomatic Hand Osteoarthritis and Its Impact on Functional Status among the Elderly. The Framingham Study. *American Journal of Epidemiology*(156), 1021-1027.

ANEXOS

Anexo I. Biomarcadores de OA de mano.

Fuente del Biomarcador	Biomarcador	Tipo de muestra	Categoría del Biomarcador
Cartílago	PIIANP	Suero	Diagnóstico
	CTX-II	Orina	Puede ser un marcador de diagnóstico, carga de la enfermedad, eficacia de la intervención, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tales como: radiografías, tratamientos, estadio de la enfermedad, etc.
	COMP	Suero	Puede ser un marcador de diagnóstico, carga de la enfermedad, eficacia de la intervención, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tales como: radiografías, tratamientos, estadio de la enfermedad, etc.
	Coll2-1	Suero	Diagnóstico
	Coll2-1NO2	Suero	Diagnóstico
	C1, 2C	Suero	Diagnóstico
	C2C	Suero	Diagnóstico
Hueso	Osteocalcin	Suero	Puede ser un marcador de diagnóstico o carga de la enfermedad, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tal como: radiografías.
	CTX-I	Suero	Puede ser un marcador de diagnóstico, carga de la enfermedad, eficacia de la intervención, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tales como: radiografías, tratamientos, estadio de la enfermedad, etc.
Inflamación	Hyaluronan	Suero	Puede ser un marcador de diagnóstico, carga de la enfermedad y de pronóstico, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tales como: radiografías, tratamientos,

validación de biomarcadores proteicos para el diagnóstico y seguimiento de la artrosis de mano erosiva

			seguimiento del avance de la enfermedad, etc.
	CRP	Sangre	Puede ser un marcador de diagnóstico y de carga de la enfermedad, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tales como: radiografías, tratamientos, estadio de la enfermedad, etc.

Tejido Adiposo	Leptin	Suero	Carga de la enfermedad
	Adiponectin	Suero	Puede ser un marcador de diagnóstico, carga de la enfermedad y de pronóstico, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tales como: radiografías, tratamientos, seguimiento del avance de la enfermedad, etc.
	Resistin	Suero	Puede ser un marcador de diagnóstico y de carga de la enfermedad, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tales como: radiografías, tratamientos, estadio de la enfermedad, etc.
Otros	Pentosidine	Suero/Orina	Puede ser un marcador de diagnóstico, carga de la enfermedad y de pronóstico, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tales como: radiografías, tratamientos, seguimiento del avance de la enfermedad, etc.
	MPO	Suero	Diagnóstico
	VCAM-1	Suero	Puede ser un marcador de diagnóstico y de carga de la enfermedad, dependiendo del tipo de resultado relacionado, tales como: radiografías, tratamientos, estadio de la enfermedad, etc.
	MCP	Suero	Carga de la enfermedad
	OPG	Suero	Carga de la enfermedad
	IL-1	Suero	Carga de la enfermedad

Anexo II. Carta de presentación al comité Ético de Investigación Clínica De Galicia.

Señora Andrea Macías Cedeño, con DNI.....con Dirección postal.....Teléfono de contacto..... y correo electrónico: andrea.macias1@udc.es, solicita la evaluación por parte del Comité de:

- Protocolo nuevo de investigación

Del estudio:

- Título: VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES PROTEICOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE LA ARTROSIS DE MANO EROSIVA.

Investigador principal: Andrea Macías Cedeño

(Confirma que cumple los requisitos para la exención de tasas según el art. 57 de la Ley 16/2008, de 23 de diciembre, de presupuestos generales de la Comunidad Autónoma de Galicia para el año 2009 (DOGA de 31 diciembre de 2008).

- Código:
- Versión:
- Tipo de estudio:
- EPA-SP estudio post-autorización con medicamentos seguimiento prospectivo
- Otros estudios no incluidos en las categorías anteriores
- Listado de centros de Galicia con sus investigadores correspondientes

Se adjunta la documentación necesaria en base a los requisitos que figuran en la web del CEIC de Galicia.

En La Coruña a..... de..... de.....
Fdo.:

Anexo III: Permiso al responsable de la Cohorte PROCOAC (Dr. Francisco Blanco)

Estimado Dr. Blanco,

Mi nombre es Andrea Macías Cedeño y en la actualidad soy el responsable del proyecto de investigación para estudiar la artrosis de mano con fenotipo erosivo.

El objetivo de este estudio es determinar biomarcadores proteicos circulantes asociados a la artrosis de mano con fenotipo erosivo, empleando técnicas proteómicas basadas en arrays de proteínas.

Para ello, nos hemos planteado llevar a cabo dicho proyecto en el área de proteómica, el cual ha sido aprobado satisfactoriamente para su apoyo económico y ejecución del mismo en el INIBIC.

El presente proyecto tendrá una duración de 1 año (2020 - 2021) y se ha pensado utilizar una muestra de 200 pacientes de la cohorte **PROCOAC**, de la cual es usted responsable. Para tal fin, requiero tener el permiso correspondiente de su parte para poder trabajar con las muestras antes mencionadas durante el proyecto.

Este proyecto aportará conocimientos muy valiosos para futuras estrategias encaminadas al diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la Artrosis de mano con fenotipo erosivo.

Esperando una respuesta positiva a esta solicitud,

Atentamente,

Andrea Macías Cedeño
Coordinador de proyecto.